

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E DA AÇÃO NA  
EXPRESSÃO DE GENES EM LINHAGENS DE TECIDOS HUMANOS  
TRATADOS COM EXTRATO *DE Luffa operculata* Cogn.

NATASHA COSTA DA ROCHA GALUCIO

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat

BELÉM-PARÁ  
MAIO / 2022

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS**

Universidade Federal do Pará - UFPA

Núcleo de Pesquisa em Oncologia – NPO

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

Laboratório de Bioensaios e Química de Microorganismos - LaBQuiM

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

## AGRADECIMENTOS

Alguns podem achar clichê, outros podem questionar o poder ou mesmo a existência de Deus, mas eu posso afirmar que se até aqui cheguei, devo tudo a Ele, e não me importo com julgamentos a esse respeito, pois mesmo nos momentos de grande desesperança, fui sustentada e amparada por pessoas diversas e nelas pude senti o amor Dele. E a ajuda veio quando menos esperei e através de pessoas que eu não tinha expectativas. Gratidão a Deus por tudo que aprendi, e por me fazer descobrir que eu podia mais, que as minhas limitações poderiam e podem ser superadas. Como diz a música de Raul, “não pense que a cabeça aguenta se você parar, tente outra vez! ”.

E Ele me presenteou com minha família e amigos que são mais chegados que irmãos! Agradeço aos meus pais, avós e tia Cy que sempre foram muito zelosos com minha educação e com o amor que me proporcionam, em especial a minha mãe Cláudia e esposo Geremias que nesses seis anos e até muito antes disso, foram incansáveis em ouvir minhas lamúrias e me ajudaram a superar os problemas, e vamos combinar que foram muitos. Minha mãe que muito abençoada, também é minha melhor amiga e cúmplice desde sempre. Geremias, outro cúmplice, deveria até participar do meu “et al” porque foi quem achou e coletou minha amostra testemunho da planta e ainda vestiu o jaleco e foi para o laboratório ajudar a processar o material vegetal, nem da área é, e mostrou seu amor e toda sua proatividade, mas eu sabia que era homem para casar! Rrs

Na minha família acadêmica tudo começou com um pai científico me adotando, professor André Khayat, gratidão por sua vida. No mundo científico aprendi, infelizmente, que os títulos, vaidades e soberba prevalecem, e sofri algumas vezes pela falta de empatia, humanidade e ética pessoal, mas mesmo assim, percebi que eu não precisava ser assim, e tive exemplos que confirmaram isso, e o professor André com certeza é um deles, obrigada professor, por me acolher e permitir que eu aprendesse com seu exemplo.

Não vou deixar de citar os meus irmãos acadêmicos, com destaque para minha irmã caçula Daniele Moysés, a ciência me trouxe essa irmã e ficou em minha vida desde o mestrado, são anos de parcerias, vivendo derrotas e saboreando as pequenas vitórias, gratidão por sua vida! No meio do doutorado apareceu um IC enxerido muito bom de bancada que também mora no meu coração, obrigada Elie! Quantos aperreios heim?! Obrigada por me oferecer sua ajuda sem eu pedir, por mostrar que eu podia confiar em suas mãos, etapas do processo experimental. Amandinha também mostrou sua empatia ao oferecer sua ajuda, a apoptose não teria sido a mesma sem você! Junto com a Marcelli! Outros também sempre me ajudaram de alguma forma, seja com uma palavra de incentivo, ou orientação técnica, ou ainda um momento de descontração, por isso, obrigada Taissa, Antônio, Ingrid e muitos outros!!

Na área da química tive um apoio técnico maravilhoso do professor Andrey Marinho, que inclusive corrigiu artigo comigo em pleno natal e mês de julho! Gratidão também ao Jeferson que esteve à frente do isolamento da cucurbitacina e me apoiou na escrita dos resultados. Ao Valdicley que entrou nos “49 do segundo tempo” com a docagem molecular para me ajudar a emplacar a publicação e revisão do artigo na Arabian jornal, e vamos combinar que quase “enfartei” com os cinco referees dessa revista, mas professor Andrey, Valdicley, Daniele e professor André foram minha artilharia para derrubar todos os argumentos negativos! Foi inesquecível! Foi muita emoção!

Por fim, afirmo que mesmo que no futuro a distância me separe dessas pessoas maravilhosas da minha vida de doutorado, os momentos que vivemos juntos já foram meus presentes, e presentes como esses, ficarão registrados em meu coração. Gratidão!

“Por isso sinto prazer nas fraquezas, nas injúrias, nas necessidades, nas perseguições, nas angústias por amor de Cristo. Porque quando estou fraco então sou forte. ”  
(2 Coríntios 12:10)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	Pág. 6
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	8
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	8
1.2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS, FITOQUÍMICAS E AÇÕES FARMACOLÓGICAS DE <i>Luffa operculata</i> Cogn	10
1.3 EVIDÊNCIAS SOBRE AÇÃO DAS CUCURBITACINAS EM ALVOS E VIAS QUE ATUAM NA MORTE E NA PROGRESSÃO CELULAR	13
<b>2 OBJETIVOS</b>	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>3 CAPÍTULO I</b>	19
<b>4 CAPÍTULO II</b>	31
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b>	76
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	83

## RESUMO

O presente estudo realizou a avaliação da *Luffa operculata*, uma planta medicinal, para a busca de novas substâncias terapêuticas no tratamento do câncer gástrico. Essa planta pertence à família Cucurbitaceae, que é rica em cucurbitacinas, triterpenos estudados para ação anticâncer. Ela é popularmente conhecida como “cabacinha” ou “buchinha do Norte” e na literatura relata que é utilizada para o tratamento da sinusite, congestão nasal, além de ser utilizada como abortivo, devido sua ação citotóxica. A avaliação da fitoquímica do extrato do fruto de *Luffa operculata* confirmou a presença de cucurbitacina B (CB) como componente majoritário. O ensaio com MTT nas linhagens de câncer gástrico AGP01, ACP02 e ACP03, confirmou a alta citotoxicidade de CB e do extrato dessa planta, com destaque para a maior seletividade do extrato na linhagem de câncer gástrico ACP03. O ensaio de necrose e apoptose mostraram que o Extrato Etanólico do Fruto (EEF) e CB provocaram alto índice de morte, principalmente por apoptose. A avaliação do ciclo celular por citometria verificou que EEF e CB induziram o aumento do percentual de células na fase G2/M, principalmente na AGP01. O ensaio de migração celular também verificou que EEF e CB inibiram essa atividade, com destaque para ACP03. Também se avaliou a expressão gênica de MYC, BCL2, CCND1 e EPCAM nos modelos celulares AGP01, ACP03 e MRC-5 expostos aos produtos de *L. operculata* e se verificou que tanto EEF quanto CB impactaram na diminuição da expressão de MYC na ACP03, esse achado corroborou com os resultados fenotípicos deste estudo, visto que a baixa expressão desse gene está relacionada tanto à redução da progressão celular quanto à baixa sobrevivência das células neoplásicas. Acredita-se que CB, componente majoritário de EEF, atua como inibidor de STAT3, e que essa inibição pode estar associada tanto a diminuição da expressão de MYC, assim também como à capacidade de CB inibir proteínas da família Janus quinase, o que inclusive foi verificado no estudo docking molecular já que CB foi capaz de interagir favoravelmente com JAK1 e JAK2. Essa interação poderia impedir que JAK se autofosforilar, logo, não atuaria na via JAK/STAT, que atua na ativação de STAT3. Outro resultado interessante foi do ensaio de micronúcleos, onde a exposição a EEF e CB que não resultou em indução da genotoxicidade significativa. Portanto, a alta indução da morte de células do câncer gástrico, a influência na baixa expressão de MYC, e o baixo risco genotóxico, são evidências muito favoráveis de que o extrato e a cucurbitacina de *Luffa operculata* são promissoras para novos estudos que possam confirmar a utilização deles na terapia no câncer, inclusive com a possibilidade da formulação de um fitoterápico.

Palavras chave: Cucurbitacina; *Luffa operculata*; MYC; citotoxicidade; STAT3.

## ABSTRACT

The present study carried out the evaluation of *Luffa operculata*, a medicinal plant, for the search for new therapeutic substances in the treatment of gastric cancer. This plant belongs to the Cucurbitaceae family, which is rich in cucurbitacins, triterpenes studied for anticancer action. It is popularly known as "cabacinha" or "buchinha do Norte" and in the literature reports that it is used for the treatment of sinusitis, nasal congestion, in addition to being used as an abortifacient, due to its cytotoxic action. The phytochemical evaluation of the *Luffa operculata* fruit extract confirmed the presence of cucurbitacin B (CB) as the major component. The assay with MTT in the gastric cancer lines AGP01, ACP02 and ACP03, confirmed the high cytotoxicity of CB and the extract of this plant, highlighting the greater selectivity of the extract in the gastric cancer lineage ACP03. The necrosis and apoptosis assay showed that the Ethanol Fruit Extract (EEF) and CB caused a high rate of death, mainly by apoptosis. Cell cycle assessment by cytometry verified that EEF and CB induced an increase in the percentage of cells in the G2/M phase, mainly in AGP01. The cell migration assay also found that EEF and CB inhibited this activity, especially ACP03. The gene expression of MYC, BCL2, CCND1 and EPCAM in cell models AGP01, ACP03 and MRC-5 exposed to *L. operculata* products was also evaluated and it was found that both EEF and CB impacted the decrease in MYC expression in ACP03, this finding corroborated the phenotypic results of this study, since the low expression of this gene is related to both reduced cell progression and low survival of neoplastic cells. It is believed that CB, the major component of EEF, acts as an inhibitor of STAT3, and that this inhibition may be associated with both the decrease in MYC expression, as well as the ability of CB to inhibit Janus kinase family proteins, which has even been verified in the molecular docking study since CB was able to interact favorably with JAK1 and JAK2. This interaction could prevent JAK from autophosphorylating, therefore, it would not act in the JAK/STAT pathway, which acts on STAT3 activation. Another interesting result was from the micronucleus assay, where exposure to EEF and CB did not result in significant genotoxicity induction. Therefore, the high induction of gastric cancer cell death, the influence on the low expression of MYC, and the low genotoxic risk are very favorable evidence that *Luffa operculata* extract and cucurbitacin are promising for further studies that can confirm their use in cancer therapy, including the possibility of formulating a phytotherapeutic.

**Keywords:** Cucurbitacin; *Luffa operculata*; MYC; cytotoxicity; STAT3.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A pesquisa com plantas medicinais para a busca de novas substâncias terapêuticas é uma estratégia na descoberta de novos fármacos, inclusive é continuamente incentivada pelas políticas públicas como a Política Nacional de Medicamentos em 1998, que estabelece em sua diretriz o desenvolvimento científico e tecnológico para apoiar as pesquisas que visem o aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais, enfatizando a necessidade de certificação de suas propriedades medicamentosas; e é ratificada pela Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de 2006 que tem o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (Brasil, 1998; Brasil, 2006).

As plantas medicinais também são fonte significativa de drogas sintéticas e medicamentos fitoterápicos e muitas descobertas são resultados de estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos onde são observadas comunidades ou grupos de pessoas em relação ao uso de plantas e a correlação desse uso com o objetivo de melhorar algum sintoma ou mesmo tratar alguma doença. A partir dessas observações, desenvolvem-se estudos químicos, avaliação biológica, toxicológica para que se possa compreender a veracidade da indicação terapêutica, se é possível modular essa ação para outro objetivo, e se há segurança no uso de substâncias advindas da diversidade natural, ou seja, a ampla diversidade e a compreensão do conhecimento popular nos trazem muitas hipóteses, muitas

possibilidades de investigação científica (Elisabetsky, 2003; Sakarkar; Deshmukh, 2011).

A *Luffa operculata* é popularmente conhecida como “cabacinha” ou “buchinha do norte” (Menon-Miyake et al., 2005), e utilizada para o tratamento da sinusite, congestão nasal, além de ser utilizada como abortivo (Caribé, 2008; Lanini et al., 2009). O interesse em estudá-la surgiu após levantamento na literatura, onde foi possível compreender que os efeitos relatados pelos usuários dessa planta medicinal estava relacionado a sua ação citotóxica. Vale ressaltar que o presente grupo de pesquisa (Núcleo de Pesquisas em Oncologia - NPO) trabalha com investigações relacionadas ao câncer, portanto, era necessário haver uma associação da *L. operculata* com possível efeito citotóxico em linhagens do câncer, e foi possível encontrar essa evidência em estudos que mostravam o isolamento de cucurbitacinas a partir do extrato da *Luffa operculata*, e que a essas cucurbitacinas foram atribuídas propriedades citotóxicas na terapia do câncer através de inibição da expressão do gene do fator de osteoclastogênese sobre células humanas Saos-2 (Kawahara et al., 2001; Kawahara et al., 2004; Sousa Neto, 2006).

O interesse do grupo de pesquisa no estudo do câncer está relacionado a alta prevalência dessa doença na população, inclusive a Organização Mundial de Saúde ressalta que o câncer é uma das quatro doenças não transmissíveis – DNT mais prevalentes, é a segunda causa de mortes no mundo, sendo que os tipos de câncer mais incidentes são de pulmão, próstata, mama, colo do útero, tireoide, colorretal, câncer de estômago e fígado. Vale ressaltar que uma grande preocupação sobre esse assunto, decorre da maior prevalência de óbitos em

países de média e baixa renda, pois geralmente não estão preparados para gerenciar o grande número de casos, assim como garantir o acesso ao diagnóstico e tratamento eficiente e em tempo hábil. Em 2018, por exemplo, o câncer causou 9,6 milhões de óbitos na população mundial (WHO, 2022).

Nesse estudo o câncer gástrico foi o escolhido, e avaliando-se os índices dos diferentes tipos de câncer, percebe-se que o câncer gástrico no Brasil aparece em quarto lugar na incidência entre homens e em sexto, entre as mulheres. Porém, quando avaliamos estimativa de novos casos para 2020 no estado do Pará, a estimativa era de 12,71 (taxa bruta) para homens e 7,05 para mulheres, logo, o segundo mais frequente entre homens e o terceiro entre mulheres (INCA, 2020). Esses índices no estado do Pará justificam o interesse na escolha do tipo de câncer da presente pesquisa, inclusive as linhagens de câncer utilizadas nesse estudo foram estabelecidas a partir de amostras de paciente paraense.

## 1.2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS, FITOQUÍMICAS E AÇÕES FARMACOLÓGICAS DE *Luffa operculata* Cogn

*Luffa operculata* Cogn. é uma planta angiosperma e dicotiledônea da família Cucurbitaceae (figura 1), é nativa da América do Sul especialmente do Brasil. É popularmente conhecida como cabacinha, buchinha e é empregada na medicina popular no tratamento de sinusite, rinite (Caribé, 2008), também é utilizada como purgativo e como emenagogo. Os extratos dos frutos indicam a presença de flavonóides, taninos, saponinas, esteróides e/ou triterpenóides (Brock et al., 2003).

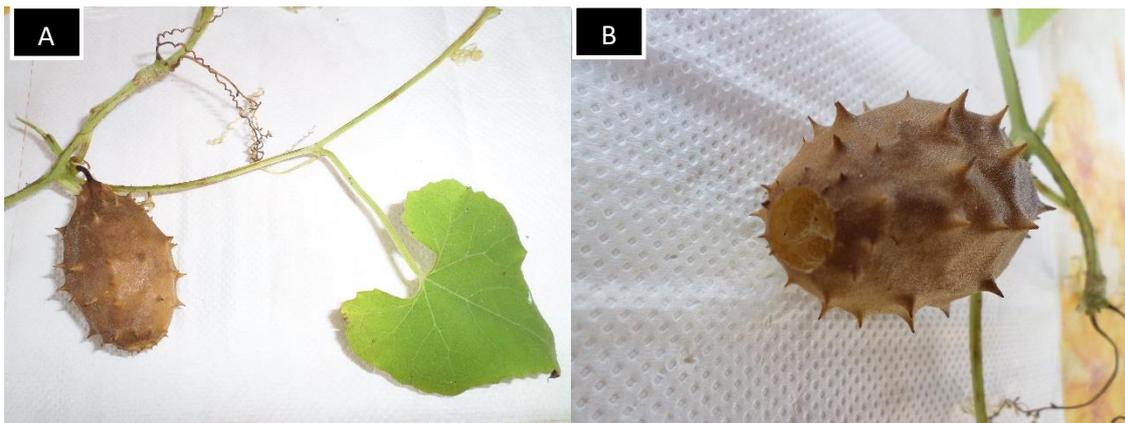


Figura 1: A: Fruto, folha e caule com gavinha de *Luffa operculata*; B: Fruto de *Luffa operculata* em imagem mais aproximada.

Os flavonóides têm atividade anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, e muitas outras atividades, como a inibição de atividade enzimática; possui também estrutura ideal para o sequestro de radicais, atuando como importantes antioxidantes (Barreiros et al., 2006; Oliveira et al., 2009). Os taninos possuem aplicações relacionadas, principalmente, com propriedades adstringentes, podem exercer efeito antidiarréico e anti séptico (via interna) e podem impermeabilizar as camadas mais expostas da pele e mucosas (via externa). Por ter a capacidade de precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico; também são hemostáticos e, sua atividade de precipitação de alcalóides pode resultar em antídoto em casos de intoxicações (Monteiro et al., 2005).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Tem uma estrutura com caráter anfipático, ou seja, parte da estrutura com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares). Essa característica determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes (Schenkel, et al., 2001). Os triterpenos de modo geral

são tem diversas atividades biológicas como ação anti-inflamatória, gastroprotetora, hepatoprotetora, antitumoral (Oliveira, 2005).

Sabe-se que a família Cucurbitaceae é rica em cucurbitacinas, que são triterpenos oxidados com esqueleto carbônico modificado. Os triterpenos, juntamente com seus derivados glicosilados são considerados os agentes responsáveis pela toxicidade potente observado nos extratos dos frutos de *L. operculata* (Feitosa, 2011). A cabacinha age sobre as mucosas por efeito das cucurbitacinas e de seus glicosídeos, e a saponina presente nesta espécie colabora com esta ação, emulsificando compostos lipossolúveis ativos, o que facilita o contato e absorção da isocucurbitacina pelas mucosas e resulta em ação cáustica sobre as mesmas (MATOS, 1979; Feitosa, 2011).

Geralmente, a infusão de *L. operculata* é inalada ou instilada na cavidade do nariz, liberando assim, grande quantidade de muco e aliviando sintomas nasossinusais, porém pode causar irritação da mucosa nasal, epistaxe ou anosmia. Diante destas consequências, Menon-Miyake (2005) e colaboradores avaliaram no modelo *ex vivo* do palato isolado de rã, os efeitos da infusão, e concluíram a infusão de *L. operculata* promove alterações significativas no epitélio mucociliar, que estas alterações eram dose-dependente e manifestavam-se após curto período de exposição.

A partir do extrato bruto da *Luffa operculata* foram isoladas as duas primeiras cucurbitacinas tipo lactona (neocucurbitacinas A e B), este estudo visava rastrear e obter compostos naturais para serem utilizados como sondas para estudos farmacológicos sobre a via de transdução de sinal intracelular que dirige a expressão do gene da proteína PEBP2 $\alpha$ A (proteína 2 $\alpha$ A de ligação do

intensificador de polioma) e do fator inibidor da osteoclastogênese - OCIF. A estas cucurbitacinas foram atribuídas propriedades citotóxicas na terapia do câncer, conforme dito anteriormente (Kawahara et al., 2001; Sousa Neto, 2006).

Há ainda, evidência da atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de *L. operculata*, especialmente para *Streptococcus pyogenes*, seguido dos *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Scalia, 2015).

### 1.3 EVIDÊNCIAS SOBRE AÇÃO DAS CUCURBITACINAS EM ALVOS E VIAS QUE ATUAM NA MORTE E NA PROGRESSÃO CELULAR

Uma longa série de ensaios *in vitro* e em modelos de células de câncer *in vivo* têm demonstrado que cucurbitacinas podem inibir a proliferação celular e induzir a apoptose. Geralmente as cucurbitacinas são consideradas inibidores seletivos das vias de JAK / STAT, porém não se pode descartar que outros mecanismos podem estar envolvidos nos seus efeitos apoptóticos, incluindo a via MAPK (conhecida por ser importante para a proliferação e sobrevivência de células neoplásicas); a clivagem de PARP; a expressão da caspase-3 ativa; a diminuição dos níveis p-STAT3 e JAK3; a diminuição em vários alvos de STAT3, tais como Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, e ciclina D3, todos os quais estão implicados na apoptose e o controle do ciclo celular (Alghasham, 2013).

Ao investigar o efeito antitumoral de cucurbitacina B em células HEp2 verificou-se que cucurbitacina B promoveu eficácia significativa na inibição do crescimento celular, na parada do ciclo celular na fase G2 / M, e na indução de apoptose de uma maneira dependente da dose e do tempo. O estudo verificou a modulação de reguladores do ciclo celular, apoptose e transdução de sinal por

análise de transferência de Western, observou-se que o efeito da cucurbitacina B ocorreu devido à supressão da expressão de p-STAT3, Bcl-2 e ciclina B1 (Liu et al., 2008).

Um estudo com cucurbitacinas B da planta *Trichosanthes cucumerina* Linn. em linhagens SKBR-3 e MCF-7 de câncer de mama evidenciou citotoxicidade, e a inibição do crescimento foi atribuída a parada do ciclo celular na fase G2 / M e a apoptose. Também foi verificado aumento da clivagem de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e diminuição das moléculas de sinalização Wnt associados a  $\beta$ -catenina, a galectina-3, ciclina D1 e c-Myc, e as correspondentes alterações nos níveis de GSK-3 $\beta$  fosforilado. O trabalho sugeriu que a cucurbitacina B pode, em parte, induzir a apoptose e exercer efeito inibidor do crescimento através de interrupção da sinalização Wnt (Dakeng et al., 2012).

Os estudos acima despertaram o interesse nos alvos MYC, BCL-2, CCND1 visto que estão associados a apoptose e ciclo celular, já a escolha de EPCAM está relacionada ao câncer gástrico, pois a superexpressão de EPCAM é associada à metástase e tumores maiores, logo, a um pior prognóstico no câncer gástrico (Dai et al., 2017).

O proto-oncogene MYC está relacionado a regulação de importantes processos celulares como controle de crescimento, metabolismo, proliferação, diferenciação e apoptose, mas além dos efeitos diretos nas células de câncer já há evidências de que também é responsável por coordenar a comunicação entre células neoplásicas e células imunes e devido a essa reação permite iniciação, progressão e metástase dos tumores (Hartl & Bister, 2021; Dhanasekaran et al., 2022).

O oncogene Bcl-2 é considerado anti-apoptótico e está relacionado ao desenvolvimento de resistência a agentes quimioterápicos, por isso, é um alvo de grande importância na terapia do câncer. Sabe-se que as proteínas BCL-2 participam do controle da via intrínseca ou mitocondrial da apoptose, logo, a promoção do câncer aconteceria devido a limitação da morte celular (Ebrahim et al., 2016; Schenk et al., 2017).

O último alvo escolhido foi o gene CCND1, e a sua ciclina D1 está associada a ativação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), as CDK4 e CDK6, que conduzem a progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S. Esse gene frequentemente tem uma superexpressão em tumores, logo, a elevada expressão da sua ciclina é considerada como um biomarcador do câncer e da progressão da doença, ou seja, pode resultar em atividade CDK desregulada, que provoca crescimento celular acelerado, com desvio de pontos de verificação celulares importantes, desta forma, estimulando o crescimento do carcinoma (Musgrove et al., 2011; Qie & Diehl, 2016; Xu & Lin, 2018).

Diante das informações desta planta amplamente utilizada na medicina popular realizou a avaliação da fitoquímica do extrato do fruto de *Luffa operculata* e do componente majoritário (cucurbitacina isolada), assim como a realização de docking molecular para avaliar via de ligação da cucurbitacina B, também foram realizados ensaios *in vitro* de viabilidade celular, necrose e apoptose para elucidar o potencial citotóxico do extrato do fruto de *Luffa operculata* e da cucurbitacina B em linhagens neoplásicas humanas gástricas, em comparação com linhagem humana não neoplásica; avaliou-se também se havia evidências de genotoxicidade, ademais, se havia alguma influência no processo metastático, no

ciclo celular e na expressão de genes relacionados à regulação do ciclo celular e apoptose. O maior entendimento sobre a atividade e os possíveis efeitos adversos dos produtos da *L. operculata* se justifica pela gama de aplicações potenciais do uso desta na saúde humana. Inclusive, tal abordagem pode elucidar se tumores gástricos podem reagir de formas distintas à ação do extrato e não somente a cucurbitacina B, de modo que se fez necessária uma correlação entre estes resultados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a fitoquímica dos extratos e componente majoritário do fruto de *Luffa operculata*, a interação molecular da cucurbitacina B, a ação deles nos processos de viabilidade celular, necrose, apoptose, ciclo celular, genotoxicidade, migração celular e expressão gênica em linhagens de tecidos humanos para avaliar potencial anticarcinogênico dessa espécie vegetal.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a fitoquímica dos extratos das sementes e dos frutos de *Luffa operculata*, assim como do componente majoritário do fruto;
- Analisar o modo de interação da cucurbitacina B com as proteínas JAK1 e JAK2 através de *docking* molecular *in silico*;
- Determinar a viabilidade das linhagens celulares humanas perante a exposição aos extratos do fruto e sementes, e componente majoritário de *Luffa operculata*;
- Avaliar necrose e apoptose celular e comparar os resultados entre todas as linhagens tratadas com o extrato e substância isolada de *L. operculata*;
- Investigar o potencial genotóxico do extrato e da substância isolada de *L. operculata*;
- Verificar se o extrato e a substância isolada de *L. operculata* podem influenciar no processo metastático;

- Observar se o extrato e substância isolada de *L. operculata* podem modular a expressão de genes associados ao processo de carcinogênese.

### 3 CAPÍTULO I

#### **Antiproliferative, genotoxic activities and quantification of extracts and cucurbitacin B obtained from *Luffa operculata* (L.) Cogn**

Natasha Costa da Rocha Galucio, Daniele de Araújo Moysés, Jeferson Rodrigo Souza Pina, Patrícia Santana Barbosa Marinho, Paulo Cardoso Gomes Júnior, Jorddy Neves Cruz, Valdicley Vieira Vale, André Salim Khayat, Andrey Moacir do Rosário Marinho.

O artigo foi publicado na revista Arabian Journal of Chemistry em fevereiro de 2022.

ISSN: 1878-5352

Fator de impacto (2021 – 2022): 5.165



## ORIGINAL ARTICLE

## Antiproliferative, genotoxic activities and quantification of extracts and cucurbitacin B obtained from *Luffa operculata* (L.) Cogn



Natasha Costa da Rocha Galucio<sup>a,\*</sup>, Daniele de Araújo Moysés<sup>a</sup>,  
 Jeferson Rodrigo Souza Pina<sup>b</sup>, Patrícia Santana Barbosa Marinho<sup>b</sup>,  
 Paulo Cardoso Gomes Júnior<sup>b</sup>, Jorddy Neves Cruz<sup>c</sup>, Valdicley Vieira Vale<sup>d</sup>,  
 André Salim Khayat<sup>a</sup>, Andrey Moacir do Rosario Marinho<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (BIONORTE), Universidade Federal do Pará, Brasil

<sup>d</sup> Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

Received 25 August 2021; accepted 23 November 2021

Available online 27 November 2021

## KEYWORDS

Cucurbitacin B;  
 MTT;  
 Micronucleus;  
 Anticancer

**Abstract** The medicinal plant *Luffa operculata* (L.) Cogn. has therapeutic properties in the treatment of sinusitis, rhinitis and abortifacient conditions. Ethnopharmacological studies report that the antitumor potential can be attributed to the presence of cucurbitacin-like compounds in the plant. This study consisted of measuring cucurbitacin in different *L. operculata* extracts, evaluating the antiproliferative and genotoxic activity of the extracts and the isolated substance in gastric cancer cells line, and evaluating the possible mechanism of action. The extracts were obtained by maceration, and both the acquisition of the chemical profile of the extracts and the determination of cucurbitacin were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). For the isolation of cucurbitacin B, column chromatography was used, and molecular identification was carried out by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) assay evaluated the antiproliferative activity, and the genotoxic activity was determined by the micronucleus method with cytokinesis blocking. The investigation of the possible mechanism of action was carried out by molecular docking. All tested samples caused cell death in a dose-dependent manner, but the fruit extracts were more selective for the ACP02 gastric cancer cells line than the isolated substance. The micronucleus results did not show

\* Corresponding author.

E-mail address: natashagalucio@gmail.com (N.C.d.R. Galucio).

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103589>

1878-5352 © 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

that genomic instability reflects the greater cytotoxicity of the fruit ethanolic extract (EEF). In addition, the EEF proved to be the most selective for ACP02. The docking results showed that the isolated substance favorably inhibited the Janus kinase family proteins JAK1 and JAK2. The present work demonstrated that the use of ethanol extract can be a good alternative to fight gastric cancer.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

In Brazil, there are botanical records in the flora of Pará, Amazonas, Maranhão, Rio de Janeiro and Minas Gerais of *Luffa operculata* (L.) Cogn., which is an angiosperm and dicotyledonous plant of the Cucurbitaceae family. It is distributed throughout the Americas, and there are distribution records in Mexico, Venezuela, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Panama, Nicaragua, Peru, Ecuador, Colombia, Guyana, Suriname and Brazil (Tropicos.org, 2020). It is popularly known as buchinha, cabacinha, and buchinha-do-norte and is used in folk medicine to treat sinusitis and rhinitis as well as an abortifacient (Alves et al., 2018). Fruit extracts generally indicate the presence of flavonoids, tannins, saponins, steroids and/or triterpenoids (Brock et al., 2003).

The Cucurbitaceae family is rich in cucurbitacins, which belong to the class of triterpenes and comprise a wide class of natural products from the secondary metabolism of several organisms, among which plants stand out as their major producers. Due to the wide variety of triterpenes, they are grouped into subclasses according to similar structural characteristics, which leads to a better systematic structural chemical characterization (Silva et al., 2020). Cucurbitacins are characterized as triterpenoids with a tetracyclic nucleus of highly oxidized cucurbitan. They are well known for their bitterness and toxicity, in addition to having pharmacological activities such as antitumor, anti-inflammatory and hepatoprotective effects (Chen et al., 2005; Chen et al., 2012).

Cucurbitacin B, a triterpene isolated from the plant, has shown good results of antitumor activity as it acts on proteins of the Janus kinase family, which are mainly expressed in tumor cells and has a direct relationship with the apoptosis of these cells when inhibited (Yar-Saglam et al., 2016).

Promising results for cancer treatment have been observed in research with medicinal plants. There is evidence of the antitumor activity of cucurbitacins in lung, liver, breast, and prostate cancer (Garg et al., 2018), and this anticancer activity occurs from several antiproliferative mechanisms, such as the inhibition of cell migration and invasion capacity, stimulation of death by apoptosis, promotion of cell cycle arrest and production of signaling pathway inhibitors (Cai et al., 2015).

*In silico* approaches have been used to investigate the interaction between compounds of natural origin and molecular targets of pharmacological interest (Santos et al., 2021; Oliveira et al., 2020; Araújo et al., 2020; Costa et al., 2020). Therefore, molecular docking was used to assess the interaction of cucurbitacin B with JAK1 and JAK2 proteins. These proteins were selected because they are related to the JAK/STAT pathway, which is associated with the promotion of cell life (Yar-Saglam et al., 2016; Garg et al., 2018). Studies reporting the anticancer activity of cucurbitacins in gastric cancer cells are considered insufficient (Zhang et al., 2018). Therefore,

the aim of this study was to measure the major metabolites of *L. operculata* extracts, evaluate the antiproliferative activity of the extracts and the isolated substance in gastric, normal and cancer cells, and evaluate the genotoxic activity of the most promising extract and the isolated substance as well as its possible mechanism of action.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental procedures

#### 2.1.1. Plant material and extraction procedure

The fruits of *Luffa operculata* (Fig. 1) were collected in Soure-PA, Brazil, Lat. 0°7'26.8"S, Log. 48°5'09.2"W, in the month of August 2016, and confirmation of botanical identification was performed by depositing a witness sample in the herbarium of the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) under registration IAN194413. The fruits were washed with water, sanitized, and separated from the seeds. The materials were dried to a constant weight and then crushed.

The crushed fruits and seeds of *L. operculata* were macerated with 70% H<sub>2</sub>O:EtOH (3:7, water:ethanol, v/v) (Dynamics, BRA) and MeOH (methanol 100%) (Merck S/A, DE) for 144 h to obtain the extracts, which was performed three times. After the maceration period, simple filtration was performed, and ethanol and methanol solutions were obtained. The solutions were evaporated under reduced pressure in rotaevaporador (40 °C), from which methanol fruit extract (EMF), ethanol fruit extract (EEF), methanol seed extract (EMS) and ethanol seed extract (EES) were obtained.

#### 2.1.2. Chromatographic profile of extracts

The extracts of *L. operculata* were analyzed by quaternary pump high-performance liquid chromatography (HPLC - Alliance e2695, Waters) using a C18 Sunfire™ chromatographic column (150 × 4.6 mm, 5 μm), injected with a 20 μL sample volume in a linear gradient elution of H<sub>2</sub>O:ACN (water Milli-Q® IQ 7003: acetonitrile Merck S/A, DE; v/v, 90:10 to 0:100) in 60 min a flow rate of 1.0 mL/min, and a photodiode array detector (PAD) length of 210–600 nm, and temperature of 40 °C.

#### 2.1.3. Isolation of cucurbitacin B of the EEF extract

The EEF (500 mg) was subjected to exclusion chromatography on Sephadex LH-20 (Merck S/A, DE) using methanol (Merck S/A, DE) as the eluent in an isocratic system, resulting in fourteen fractions (1 to 14), which were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) (Merck S/A, DE). Fraction 4 (0.150 g), which had the highest purity, was submitted to chromatographic separation by preparative HPLC-PAD Binary

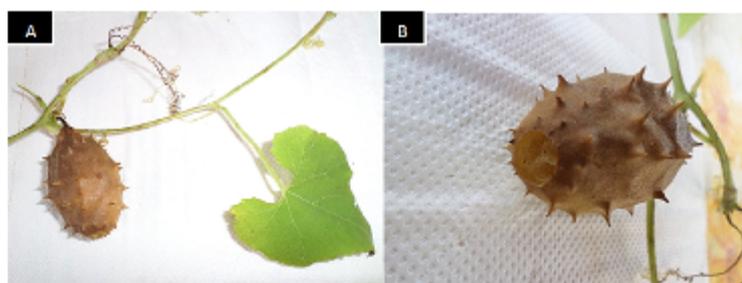


Fig. 1 A: Fruit, leaf and stem with tendril of *Luffa operculata*; B: More detailed image of the fruit of *L. operculata* (fruit size: 3.0 x 5.5 cm).

Pump 1525 (Waters) for isolation using a Sunfire octadecyl silane (C18) reversed-phase column (19 mm x 150 mm, 5  $\mu$ m) in the isocratic mode of H<sub>2</sub>O:ACN (water: acetonitrile, v/v, 70:30) with a flow rate of 8 mL/min, and it was monitored at 230 nm at room temperature.

#### 2.1.4. Identification of cucurbitacin B

The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Ascend 400 (400 MHz) spectrometer (Karlsruhe, DE) using the solvent signal (chloroform-d<sub>3</sub>) as a reference. The chemical shifts are given in delta ( $\delta$ ) values, and the coupling constants ( $J$ ) are given in Hertz (Hz).

#### 2.2. Quantification of cucurbitacin B

##### 2.2.1. Standard solutions

Cucurbitacin B (CB) used in the preparation of the standard solutions was obtained from the EEF of *Luffa operculata* by HPLC isolation (item 2.1.3). The CB stock solution was diluted in acetonitrile in the linear range of 1  $\mu$ g/mL to 100  $\mu$ g/mL for the construction of the calibration curve.

##### 2.2.2. Instrumentation and analytical conditions

The quantification analysis were carried out using a Alliance e2695 HPLC (Waters) equipped with a photodiode array detector (PAD) and a SunFire® C18 column (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) as the stationary phase, a mobile phase of H<sub>2</sub>O:ACN (water: acetonitrile, v/v, 70:30) eluted isocratically for 15 min and detection at 230 nm, column heater at 40 °C.

##### 2.2.3. Quantification of cucurbitacin B by HPLC

Quantifications of the CB in EMF and EEF extracts were performed by the standard curve method using the following equation:  $[CB, \mu\text{g/mL}]_{\text{SAMPLE}} = PA(\text{CB, SAMPLE}) - b/\delta$ , where PA(CB, SAMPLE) is area of the CB peak found in the extracts, b the linear coefficient and  $\delta$  the angular coefficient of the standard analytical curve. In addition, the limits of detection (LD) and quantification (LQ) were calculated as follows:  $LD = 3 \times SD/\delta$  and  $LQ = 10 \times SD/\delta$ , where SD is the white standard deviation and  $\delta$  the slope of the analytical curve. All analysis was performed in triplicate.

#### 2.3. In vitro experiments

##### 2.3.1. Cell culture

The gastric adenocarcinoma cell line ACP02 was established from a sample of a tumor removed from the cardiac region of the stomach from a cancer patient in northern Brazil (Leal et al., 2009), whereas MNP01 is a non gastric mucosa cell culture established from a sample of ten patients without gastric cancer or any other gastric disease (Maués et al., 2018). These cells were cultivated in DMEM/F12 medium (Dulbecco/F12 Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) and penicillin (60  $\mu$ g/mL) - streptomycin (100  $\mu$ g/mL) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) in a humidified atmosphere at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> (CO2 incubator Laboven, BRA) The experiments were carried out between the fourth and the tenth passage.

##### 2.3.2. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated in cells lines ACP02 and MNP01 in the concentration range of 0.0019, 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.125  $\mu$ g/mL for ethanol and methanol fruit extracts (EMF and EEF) and 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0  $\mu$ g/mL for ethanol and metabolic seed extracts (EES and EMS); on the other hand, for the isolated substance, the range was from 0.0008, 0.0016, 0.0031, 0.0062 0.0125, 0.025, 0.050  $\mu$ g/mL, as determined by the MTT colorimetric assay (Mosmann, 1983). Inhibitory concentrations that decreased cell viability by 50% (IC<sub>50%</sub>) at 24, 48 and 72 h (1x10<sup>4</sup>, 0.6x10<sup>4</sup>, 0.3x10<sup>4</sup> cells per well, respectively) were evaluated. The plates were incubated at 37 °C in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Sample absorbances were measured in a SpectraMax i3 multi well scanning spectrophotometer (Molecular Devices, USA) using a reference wavelength of 570 nm. IC<sub>50%</sub> values were calculated using dose-response curves from three independent experiments.

##### 2.3.3. Selectivity index (SI)

To calculate the selectivity index (SI), the IC<sub>50%</sub> of MNP01 was divided by the IC<sub>50%</sub> of ACP02 (Bézivin et al., 2003), according to the equation:

$$SI = IC_{50\%} \text{ MNP01} / IC_{50\%} \text{ ACP02}$$

### 2.3.4. Cytokinesis-block micronucleus - CBMN

The MNP01 cell line was incubated with two concentrations of EEF (0.0022 µg/mL and 0.0011 µg/mL) and CB (0.0021 µg/mL and 0.0011 µg/mL). The ACP02 cell line was also incubated with two concentrations of EEF (0.0010 µg/mL and 0.0005 µg/mL) and CB (0.0027 µg/mL and 0.0014 µg/mL) that is, was used at  $IC_{50\%}$  and  $1/2 IC_{50\%}$  of 72 h. For the positive control (CP), 0.2 µg/mL doxorubicin (Sigma, USA) was used. After 24 h, 3 µg/mL cytochalasin-B (CtB; Sigma, USA) was added. The samples were treated with a hypotonic solution of trisodium citrate dihydrate 1% (Merck S/A, DE) and fixed with methanol (Merck S/A, DE) and acetic acid (Merck S/A, DE) at a proportion of 5:1 v/v with the addition of 37% formaldehyde (Merck S/A, DE). Later, the samples were fixed at a ratio of 3:1 v/v. Fixed samples were stained with 1% Giemsa (Merck S/A, DE) for 4 min. Finally, the analysis of the conventional micronucleus was performed using a Leica DME optical light microscope (Leica Microsystems Inc., USA) at 1000X magnification. The analysis was performed in a double-blind test with three independent experiments. (Fenech, 2000; Salvadori et al., 2003; Castro et al., 2021).

### 2.3.5. Statistical analysis

Analyses were performed using the GraphPad Prism 5.000 software, the data were evaluated by the Shapiro-Wilk test and, in view of the result of this analysis, they were transformed to fit the normal curve. P values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant. All tests were performed in triplicate. For cell viability assays (MTT), data analysis was performed using the percentage of inhibition  $\times$  log of the concentration; thus, it was possible to determine the  $IC_{50\%}$  from nonlinear regression, followed by Tukey's test, with a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ). To compare the  $IC_{50\%}$  between the samples, the *t* test was used, and for comparisons of the selectivity index, two-way ANOVA followed by Bonferroni test for multiple comparisons was used. For the micronucleus assay, statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons.

## 2.4. In silico methodology

### 2.4.1. Molecular docking

The molecular structure of cucurbitacin B was designed using GaussView 5 software (Dennington et al., 2009). Then, the molecule was optimized with B3LYP/6-31G\* (Becke, 1993) using Gaussian 09 software (Frisch et al., 2009). To assess the interaction mode of cucurbitacin B with JAK1 and JAK2 proteins, the Molegro Virtual Docker (MVD) software was used (Thomsen and Christensen, 2006; Mascarenhas et al., 2020; Leão et al., 2020). For the construction of the complexes, the crystal structures of the proteins were collected in the Protein Data Bank using the PDB IDs 3EYH and 6VNK for JAK1 and JAK2 (Williams et al., 2009), respectively.

## 3. Results

### 3.1. Obtaining *Luffa operculata*

Maceration with organic solvents resulted in the methanol fruit extract (EMF; 1.167 g), ethanol fruit extract (EEF; 1.199 g), methanol seed extract (EMS; 2.771 g) and ethanol

seed extract (EES; 5.974 g). The four extracts presented the following yields: 11.67%, 11.99%, 2.77% and 5.97%.

### 3.2. HPLC chromatographic profile of extracts of *Luffa operculata* and isolation of cucurbitacin B

The chromatographic profiles of the analyzed EMF and EEF showed similar pattern. The band at a  $t_R$  of 29.3 min ( $\lambda_{max}$ : 230.1 nm) was observed for the extracts with high intensity, showing a predominant major compound in the EMF and EEF, which was identified as the triterpene cucurbitacin B (Fig. 2). For EMS and EES, no characteristic bands were detected for cucurbitacin B. Subsequently, the EEF was fractionated, and the compound cucurbitacin B was isolated by semi-preparative HPLC-PAD mode, giving 38.5 mg of a white crystalline solid (cucurbitacin B,  $\lambda_{max}$ : 230.1 nm).

### 3.3. Identification of cucurbitacin B

The compound cucurbitacin B (1) was isolated (38.5 mg) in the form of a white crystal soluble in chloroform and showed maximum absorption in UV-Vis at  $\lambda_{max}$  230.1 nm. The  $^1H$  NMR spectrum showed hydrogen signals typical of the triterpene skeleton at  $\delta$  H 2.39 (ddd, 2H, H-1),  $\delta$  H 1.28 (s, 3H, H-28),  $\delta$  H 1.37 (s, 3H, H-29),  $\delta$  H 2.38 (ddd, 1H, H-7a),  $\delta$  H 1.96 (ddd, 1H, H-7b) and  $\delta$  H 2.00 (dd, 1H, H-8), referring to methyl hydrogens. Signals referring to oxymethine hydrogens were found at  $\delta$  H 4.41 (dd, 1H, H-2); signals in the region of olefinic hydrogens were found at  $\delta$  H 5.78 (d, 1H, H-5/H-6). The spectral pattern presented in the  $^1H$  NMR spectrum is typical of a substance from the class of cucurbitane triterpenes (Valente, 2004).

Through  $^{13}C$  NMR analysis, 32 signals referring to carbons attributed to the structure of (1) were observed, with three signals referring to C-3, C-11 and C-22 carbonyl carbons with respective chemical shifts of  $\delta$  C 213.3, 212.1 and 202.3, with C-3 being adjacent to the OH group. Characteristic carbon signals of  $sp^2$ -type C-5/C-6 with  $\delta$  C 140.1 and 120.3 were also observed. There were also oxymethine carbon signals at  $\delta$  C 71.6 (C-2),  $\delta$  C 79.1 (C-20),  $\delta$  C 71.0 (C-16) and  $\delta$  C 78.1 (C-25). For the methyls at positions C-18, C-19, C-21, C-26, C-27, C-28, C-29, and C-30, the signals were found at  $\delta$  C 19.7, 19.9, 23.5, 25.6, 26.6, 29.1, 21.1 and 18.7, respectively. In addition, there were signals referring to methylene carbons at  $\delta$  C 35.8 (C-1),  $\delta$  C 50.2 (C-4),  $\delta$  C 23.7 (C-7),  $\delta$  C 48.3 (C-12),  $\delta$  C 45.1 (C-15),  $\delta$  C 120.1 (C-23) and  $\delta$  C 151.8 (C-24). The  $^1H$  and  $^{13}C$  S1 NMR experimental data (Supplementary material Figure S1, Table S1) were compared with the literature and showed complete similarity for cucurbitacin B (Ayyad et al., 2011).

### 3.4. Quantification of cucurbitacin B by HPLC

HPLC analysis showed CB were present in the EMF and EEF extracts as compared their chromatograms (Supplementary material Figure S2). Thus, quantification of the CB in these extracts was performed in order to determine CB amount in µg/mL present in each extract studied. The data (Table 1) showed that CB are present in large amounts in the EMF and EEF of *Luffa operculata*, 44.2 µg/mL and 79.1 µg/mL, respectively. Furthermore, the adjustments obtained in the cal-

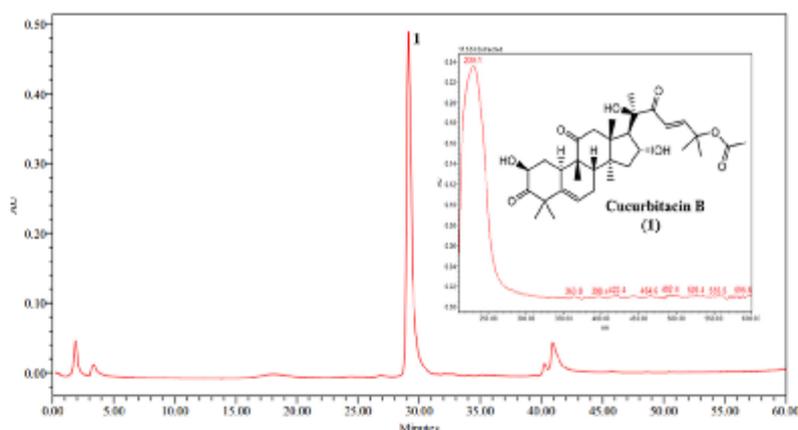


Fig. 2 Chromatogram obtained by HPLC-PAD of the ethanol extract of the fruit of *Luffa operculata*. (I) cucurbitacin B.

Table 1 Adjustments obtained for the CB calibration curve and quantification in EMF and EEF extracts.

Curve equation	R <sup>2</sup>	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	Range (µg/mL)	[CB, µg/mL] <sub>Extract</sub>
(PA) <sub>(CB)</sub> (AU <sup>1</sup> ) = 29216.4 [CB, µg/mL] + 22136.5	0.999	0.03	0.10	1.0 – 100	EMF 44.2 (± 0.16) EEF 79.1 (± 0.57)

<sup>1</sup> Arbitrary Units. Legend: LQ – Limit of Quantification and LD – Limit of Detection.

ibration curve (Fig. 3) showed satisfactory linearity in the working range with good limits of detection and quantification.

### 3.5. Cytotoxicity assay and selectivity index (SI)

The extracts of the fruits of *Luffa operculata* caused significant cell death in the two cell lines tested (Table 2) in a dose- and time-dependent manner. The EMF and EEF were more selective for the ACP02 cell line, demonstrating greater cytotoxicity at all times of treatment than the other extracts. The EEF (Table 2) showed a 50% lower IC in the 48 h exposure for both the MNP01 (0.00905 µg/mL) and ACP02 (0.00288 µg/mL), and in the 72 h period for the MNP01 (0.00444 µg/mL) and ACP02 (0.00210 µg/mL), compared to EMF in the same treatment period, thus demonstrating a more cytotoxic activity.

Cucurbitacin B (CB) isolated in this study caused cell death in a dose-dependent manner, as observed in *L. operculata* extracts, but no selectivity was observed for ACP02 (Table 2).

Statistically comparing the EEF IC<sub>50%</sub> values between the two cell lines, EEF showed significantly lower cytotoxicity for MNP01 and higher cytotoxicity for ACP02 ( $p < 0.05$ ), but when comparing the IC<sub>50%</sub> CB values between the different cell types, it did not there was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ), highlighting the biological activity of the extract, as the cytotoxic concentration was three times lower for the cancer cells than for the nonneoplastic cells. The selectivity index (SI) corroborates this observation (Supplementary

material Figure S3; Figure S4), as the EEF presented a selectivity  $> 3$  for the 48 h treatment (SI = 3.14) (Bézivin et al., 2003).

### 3.6. Cytokinesis-block micronucleus

The micronucleus tests (MNs) showed a statistically significant difference for the two cell lines (MNP01 and ACP02) for all concentrations (of the extract and isolated substance) when compared to the positive control, and all induced a lower formation of MNs, as shown in Fig. 4. The results for EEF and CB showed that as the concentration increased, it induced a small increase in the number of MNs, but there was no statistically significant difference between different concentrations of EEF and CB.

When comparing the results of MNs from the same samples (EEF and CB) in proportional concentrations, no statistically significant difference was observed in the different cells lines (MNP01 and ACP02) ( $p < 0.05$ ).

Legend: EEF- ethanol fruit extract; CB- cucurbitacin B. The MNP01 cell line was incubated with two concentrations of EEF1 = 0.0022 µg/mL, EE2 = 0.0011 µg/mL, CB1 = 0.0021 µg/mL and CB2 = 0.0011 µg/mL. In the ACP02 cell line, EEF1 = 0.0010 µg/mL, EEF2 = 0.0005 µg/mL, CB1 = 0.0027 µg/mL and CB2 = 0.0014 µg/mL.

Along with the frequency of micronuclei, the nuclear division index (NDI) was evaluated, but the results of EEF e CB were not statistically significant ( $p > 0.05$ ; supplementary material Figure S5).

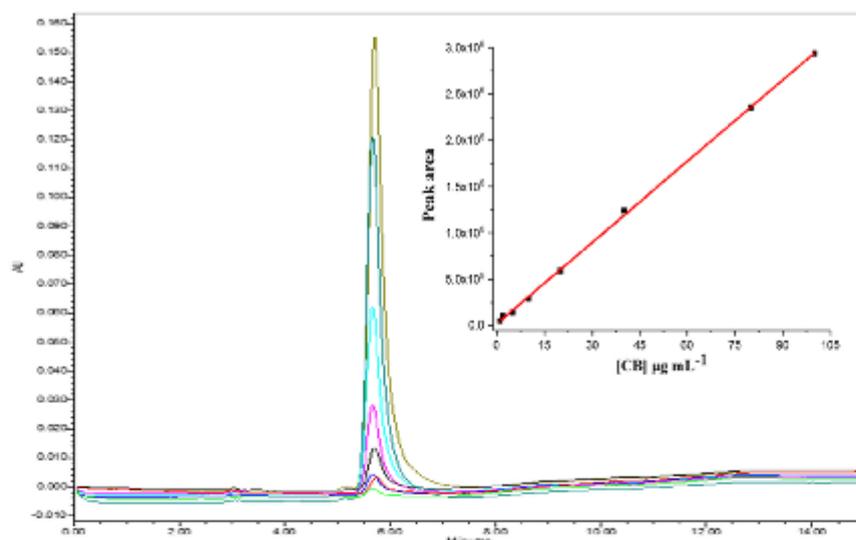


Fig. 3 Analytical curve obtained for CB in the linear range from 1 to 100 µg/mL.

**Table 2** IC<sub>50%</sub> and SI results of extracts and isolated substances tested on human cells MNP01 and ACP02 at different times of treatment.

Time	IC <sub>50%</sub> (µg/mL)		SI
	MNP01	ACP02	
EMF			
24H	0.02229	0.00766	2.91
48H	0.01737	0.00498	3.49
72H	0.00930	0.00328	2.83
EEF			
24H	0.01471	0.00802	1.83
48H	0.00905	0.00288	3.14
72H	0.00444	0.00210	2.11
EMS			
24H	30.66	61.98	0.49
48H	15.71	22.49	0.70
72H	14.49	15.60	0.93
EES			
24H	6.41	11.18	0.57
48H	5.06	8.69	0.58
72H	2.26	5.56	0.41
CB			
24H	0.00978	0.00724	1.35
48H	0.00659	0.00618	1.07
72H	0.00427	0.00548	0.78

Legend: EMF- methanol fruit extract; EEF- ethanol fruit extract; EMS- methanol seed extract; EES- ethanol seed extract; CB- Cucurbitacin B; IC<sub>50%</sub>- inhibitory concentration 50%; SI- selective index. \*p < 0.05 e R<sup>2</sup> > 0.96.

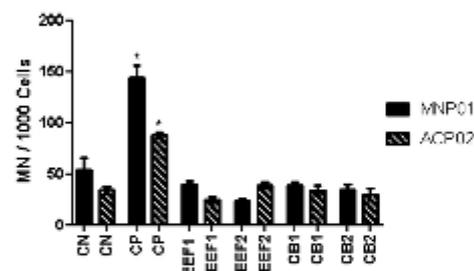


Fig. 4 Frequency of micronuclei observed in cell lines MNP01 and ACP02. \* Statistically significant compared to the positive control in both cell lines p < 0.05;

### 3.7. Molecular docking

The docking results showed that CB binds favorably, forming a stable complex with an affinity energy (Moldock Score) of -123.75 kJ/mol for JAK1, while JAK2 presented an affinity energy of -148.19 kJ/mol.

Fig. 5 shows the interactions between CB and JAK1, showing that the main bonds were hydrogen bonds with the amino acid residues Leu-959, Asp-1021, Glu-883, Gly-962, Ser-963 and Gly-884. Alkyl-type bonds were further visualized with Leu-1010, Leu-881, Ala-906, Val-938, Val-889 and Arg-1007. Fig. 6 shows the molecular interactions with JAK2, revealing hydrogen bonds with Lys-857, Ser-936, and Leu-932 and alkyl-like interactions with Leu-983, Val-911, Ala-880, Met-

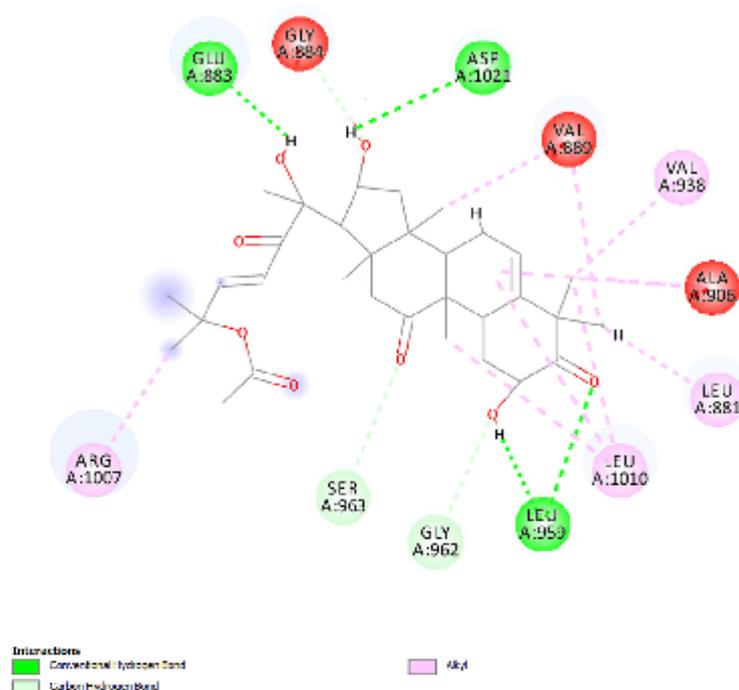


Fig. 5 Molecular interactions established between cucurbitacin B and JAK1.

929, and Val-863. These results confirm that the substance binds to amino acids of interest for protein inhibition (Williams et al., 2009; Davis et al., 2021).

#### 4. Discussion

The chemical compositions of the EMF and EEF analyzed by HPLC-PAD exhibited similarities, with both presenting chromatographic bands suggestive of compounds of the triterpene class, after isolation the majority compound was identified as CB by NMR.

In the EMS and EES extracts, no characteristic cucurbitacin B band was detected in the HPLC-PAD analyses; therefore, the *Luffa operculata* seed from the collected sample did not present in its chemical constitute, the cucurbitacin B triterpene, corroborating the findings of Lang et al. (2012). The choice of fruit extracts over seed extracts was due to the fact that the former presented peaks suggestive of cucurbitacin B, a substance of interest in this study.

A major band at a  $t_R$  of 29.3 min, which in the UV spectrum (Fig. 2) has a  $\lambda_{max}$  of 230.1 nm, was compared with literature data, and it is suggested that band 1 ( $t_R$ : 29.3 min and  $\lambda_{max}$ : 230.1 nm) contains cucurbitacin B (CB) this information was confirmed by NMR analysis (Krepsky et al., 2009; Ayyad et al., 2011; Kaushik et al., 2015). Furthermore, EMF and EEF presented band 1 as the major constituent.

Analyzed by the chromatographic profile, EMF and EEF showed CB contents of 79.1 and 44.5  $\mu\text{g/ml}$  in the EEF and EMF, respectively. Therefore, ethanol is the solvent with the highest yield in the extraction of CB from *Luffa operculata* using the maceration technique, corroborating the findings by Kaushik et al. (2015) on the efficiency of ethanol as a CB extraction solvent, therefore, the EEF was used in the fractionation to obtain CB. Additionally, it is known that ethanol has greater safety for use in humans (Do et al., 2014; USP, 2007).

Given the good cytotoxicity results and the higher yield of CB in this extract, the EEF was selected to perform the cytokinesis-block micronucleus assay due to the good IS presented and taking into account that ethanol was used as an extraction solvent in the EEF. Therefore, from the fractionation of EEF and isolation of the CB substance, the cytotoxicity assay was continued, in addition to a later genotoxicity study.

Cytotoxicity assays are used to screen molecules (Adan et al., 2016). These assays are related to cell proliferative inhibition, and generally the most common type of cell death that occurs is the induction of apoptosis. Apoptosis, consisting of extrinsic and intrinsic pathways, is the main cell death response to chemotherapy (Chan et al., 2010). Other studies usually evaluate isolated substances, but this study chose to carry out a comparison between the precursor extract and the CB; with this, it was possible to discover greater selectivity in relation to the extract.

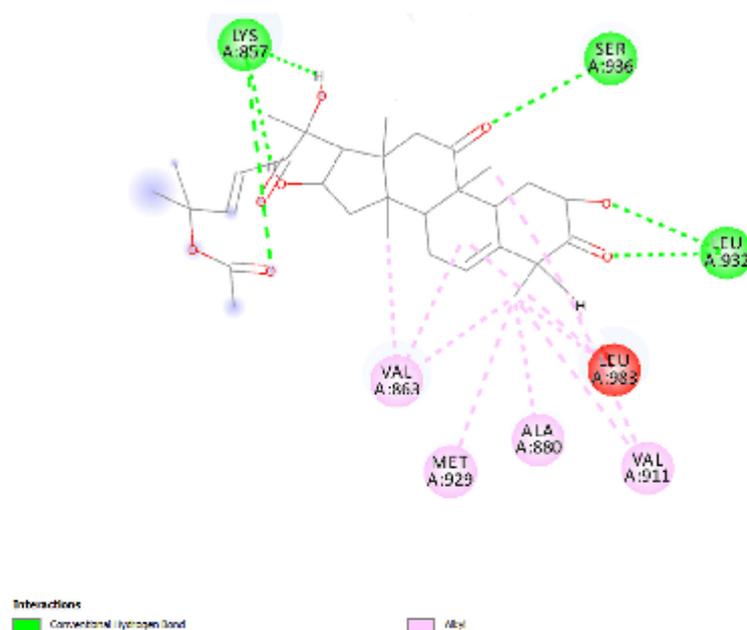


Fig. 6 Molecular interactions established between cucurbitacin B and JAK2.

One of the characteristics of cancer cells is their great proliferative potential and several signaling pathways that act to promote the cell cycle; that is, these cells can adapt to high levels of oncogenic signaling, deactivating their senescence or apoptosis-inducing pathways (Hanahan and Weinberg, 2011). Therefore, substances that induce cell death by apoptosis and cell cycle arrest can be research targets for the treatment of cancer.

The cytotoxic potential induced by extracts containing cucurbitacins and isolated cucurbitacins has been widely researched in several cancer cell models, such as lung (H1975, H820, A549 and H1299) (Feng et al., 2014; Liu et al., 2019), cervical (CaSki and SiHa) (Sikander et al., 2016), breast (Dittharot et al., 2019), colon (SW480) (Feng et al., 2014), hepatocellular (HepG-2) (Ge et al., 2018) (Huh7) (Liu et al., 2020), prostate (He et al., 2017), ovarian (SKOV3) (Li et al., 2018), pancreatic (Sikander et al., 2019), murine intracranial glioma (GL261) (Fujita et al., 2008), mesenchymal glioblastoma multiforme (GBM) (Park et al., 2014) and leukemia (K562) (Chan et al., 2010). A study with CB and its synthesized derivatives evaluated their cytotoxicity in HepG-2 cells with  $IC_{50\%}$  values ranging from 0.033522 to 5.743436  $\mu\text{g/ml}$  (Ge et al., 2018). In another study, the effect of CB on cell proliferation was evaluated in H1975, H820, A549 and H1299 cells, observing a cytotoxic effect for all four cell lines, with an  $IC_{50\%}$  value between 0.106153 and 2.363301  $\mu\text{g/ml}$  (Liu et al., 2019). The  $IC_{50\%}$  results for cell types in these studies demonstrated much higher values than

the results obtained in ACP02 and MNP01 (Table 2). This means that both the extract and CB induced greater cytotoxicity in the gastric cells studied, generating research potential promise for a possible chemotherapy treatment for gastric cancer.

A study (Liu et al., 2017) with gastric cancer cells (SGC7901 and SGC7901/DDP) resulted in high cytotoxicity with  $IC_{50\%}$  values of 0.095 and 0.121  $\mu\text{g/ml}$ ; however, the  $IC_{50\%}$  of the fruit extracts and cucurbitacins in the present study demonstrates a ten times greater cytotoxicity (Table 2). In another study, the antiproliferative effect of CB in the non-neoplastic gastric lineage (GES-1) and neoplastic gastric lines (MKN-74, BGC823, SGC7901 and MGC803) was compared, and the induction of cytotoxicity in neoplastic cells was observed with an  $IC_{50\%}$  of 0.0626 at 0.205  $\mu\text{g/ml}$ , exhibiting a dose-dependent inhibitory effect and being more selective in cancer cells (Xu et al., 2020). Therefore, this study corroborates the findings of the current research, as greater selectivity was also observed in the gastric cancer cell line, but only in the EEF and EMF results. Another pathway associated with the cytotoxic activity of cucurbitacins is the inhibition of STAT3 phosphorylation, which impacts the low expression of genes such as c-Myc and Bcl-xL, resulting in the growth inhibition effect attributed to cell cycle arrest in the G2/M phase and induction of apoptosis (Chan et al., 2010; Xu et al., 2020).

The micronucleus results from unrepaired genomic damage, and it is known that damage such as this can cause cell cycle arrest as well as apoptosis and accumulate mutations in

the genome (Tian et al., 2015; Sylvia et al., 2018). In the present study, the highest concentrations of EEF (MNP01: 0.0022 µg/mL and ACP02 0.0010 µg/mL) and CB (MNP01: 0.0021 µg/mL and ACP02 0.0027 µg/mL) induced a small increase in the formation of MNs in the two cell lines evaluated but without statistical significance. The results of MNs do not show that genomic instability reflects the greater cytotoxicity of EEF, it is believed that the concentrations tested were not sufficient to induce the formation of micronuclei, or the second hypothesis is that if a genomic instability was really induced, the Cell repair mechanisms were efficient before the new cell cycle was concluded, it is noteworthy that the micronucleus only forms if an irreparable DNA break occurs (Fenech, 2020). Also in this assay, the result of the nuclear division index did not show that EEF or CB had cytostatic activity at the concentrations tested.

For the docking study, the choice of target was based on the fact that previous studies stated that CB has the ability to inhibit proteins from the Janus kinase family (Yar-Saglam et al., 2016). Alghasham (2013) reported that cucurbitacins can induce apoptosis of a series of human cancer cells, such as leukemia, lymphomas, liver, breast, lung, pancreas and colon, and this effect is possibly linked to the fact that this molecule inhibits the phosphorylation of JAK2 and consequently activation of the apoptosis cascade and cell cycle arrest.

It is known that proteins from the Janus kinase family are responsible for activating STAT3 before this protein successfully binds to the receptor, and phosphorylated STAT3, when migrating to the cell nucleus, has the ability to activate the transcription of target genes. There is at least ten times more activated STAT3 in gastric cancer cells than in normal stomach epithelial cells (Deng et al., 2010), which supports the claim that the phosphorylation of STAT3 is associated with promoting the survival of cancer cells and the inhibition of apoptosis (Liu et al., 2015).

The results show that CB was able to inhibit the growth of gastric lines with a better result in 48 h, possibly because the pharmacological effect is due to the inhibition of these proteins, since in the docking results, CB was able to interact favorably with JAK1 and JAK2, being able to form bonds with the amino acid residues of interest in the catalytic site. This type of interaction can prevent JAK from having the ability to autophosphorylate, thus causing JAK inhibition, which would prevent STAT3 activation through this pathway (JAK/STAT) (Yar-Saglam et al., 2016). It must also be taken into account that CB belongs to the class of triterpenes, and as such, it has high lipophilicity (Garg et al., 2018), which gives the molecules an ability to passively cross membrane barriers, thus acting in intracellular complexes (Lipinski, 2004).

It is interesting to note that the isolation of CB from the EEF did not generate an important selective effect on the cytotoxicity, which reinforces the idea that crude extracts can often be more effective than their chemical components isolated at an equivalent dose. A possible explanation for this more effective result would be the hypothesis of synergy, that is, other compounds in the extract, despite not being the majority, help the substance with a specific pharmacological effect to reach the target, either by improving solubility, absorption, and distribution or decreasing metabolism and excretion, thereby increasing the bioavailability and effectiveness of this extract (Rasoanaivo et al., 2011; Caesar and Cech, 2019).

## 5. Conclusions

The phytochemical study of *Luffa operculata* resulted in the isolation and identification of cucurbitacin B, whose assay showed a higher concentration in the EEF, being the major chemical compound. Regarding the cytotoxicity index in the cell lines tested, the EEF result was more promising ( $p < 0.05$ ) for antiproliferative activity in the cancer cells due to a selectivity index of 3.14. CB had no significant selectivity index in the cells of this study. The trial to assess the formation of micronucleus showed that the EEF and CB results were not significant, so their cytotoxicity could not be associated with genomic instability. It is suggested that CB is the pharmacological marker of *L. operculata*, and its possible mechanism of action is also related to the inhibition of JAK1 and JAK2 proteins that are associated with the JAK/STAT pathway and related to apoptosis. Given these findings, the EEF, which is rich in cucurbitacin, is considered promising for further studies aimed at the development of a herbal medicine with potential clinical applicability.

## Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and PROPESP-UFPA. To the Human Cytogenetics Laboratory of the Federal University of Pará, for the donation of cell lines ACP02 and MNP01.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103589>.

## References

- Adan, A., Kiraz, Y., Baran, Y., 2016. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 17 (14), 1213–1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>.
- Alghasham, A.A., 2013. Cucurbitacins - a promising target for cancer therapy. *Int. J. Health Sci. (Qassim)*. 7 (1), 77–89. <https://doi.org/10.12816/0006025>.
- Alves, C., Frias, H.V., Kirsten, T.B., Cordiro, F., Bernardi, M.M., Suffredini, L.B., 2018. *Luffa operculata* fruit aqueous extract induces motor impairments, anxiety-like behavior, and testis damage in rats. *J. Ethnopharmacol.* 222, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.044>.
- Araújo, P.H.F., Ramos, R.S., Cruz, J.N., Silva, S.G., Ferreira, E.F.B., Lima, L.R., Macêdo, W.J.C., Espejo-Román, J.M., Campos, J.M., Santos, C.B.R., 2020. Identification of potential COX-2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases using molecular modeling approaches. *Molecules* 25, 4183. <https://doi.org/10.3390/molecules25184183>.
- Ayyad, S.E., Abdel-Lateff, A., Basaif, S.A., Shier, T., 2011. Cucurbitacins-type triterpene with potent activity on mouse embryonic fibroblast from *Cucumis prophetarum*, Cucurbitaceae. *Pharmacognosy Res.* 3 (3), 189–193. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.85006>.
- Becke, A.D., 1993. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* 98, 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>.

- Bézin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., Boustie, J., 2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomed. Int. J. Phytotherapy Phytopharmacol.* 10 (6-7), 499-503. <https://doi.org/10.1078/094471103322331458>.
- Brock, A.C.K., Duarte, M.R., Nakashima, T., 2003. Estudo morfo-anatômico e abordagem fitoquímica de frutos e sementes de *Luffa operculata* (L.) Cogn., Cucurbitaceae. *Visão Acadêmica.* 4 (1), 31-37. <https://doi.org/10.5380/acad.v4i1.520>.
- Caesar, L.K., Cech, N.B., 2019. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat. Prod. Rep.* 36 (6), 869-888. <https://doi.org/10.1039/c9np00011a>.
- Gai, Y., Fang, X., He, C., Li, P., Xiao, F., Wang, Y., 2015. Chen, M. Cucurbitacins: A Systematic Review of the Phytochemistry and Anticancer Activity. *Am. J. Chinese Medicine.* 43(7), 1331-1350. <https://doi.org/10.1142/S0192415X15500755>
- Castro, A.L.G., Cruz, J.N., Sodré, D.F., Correa-Barbosa, J., Azeiteiro, R., Oliveira, M.S., Siqueira, J.E.S., Galucio, N.C.R., Bahia, M.O., Burbano, R.M.R., Marinho, A.M.R., Percario, S., Dolabela, M.F., Vale, V.V., 2021. Evaluation of the genotoxicity and mutagenicity of isoeleutherin and eleutherin isolated from *Eleutheria pilicata* herb, using bioassays and *in silico* approaches. *Arabian Journal of Chemistry.* 14, 103084. <https://doi.org/10.1016/j.arabjoc.2021.103084>
- Chan, K.T., Li, K., Liu, S.L., Chu, K.H., Toh, M., Xie, W.D., 2010. Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer Lett.* 289 (1), 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.07.015>.
- Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A., Qiu, S.X., 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 22 (3), 386-399. <https://doi.org/10.1039/b418841c>.
- Chen, X., Bao, J., Guo, J., Ding, Q., Lu, J., Huang, M., Wang, Y., 2012. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anticancer Drugs* 23 (8), 777-787. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283541384>.
- Costa, E.B., Silva, R.C., Espejo-Román, J.M., Neto, M.F.A., Cruz, J. N., Leite, F.H.A., Silva, C.H.T.P., Pinheiro, J.C., Macêdo, W.J.C., Santos, C.B.R., 2020. Chemometric methods in antimalarial drug design from 1,2,4,5-tetraoxanes analogues. *SAR QSAR Environ. Res.* 31 (9), 677-695. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2020.1803961>.
- Davis, R.R., Li, B., Yun, S.Y., Chan, A., Nareddy, P., Gunawan, S., Ayaz, M., Lawrence, H.R., Reuther, G.W., Lawrence, N.J., Schönbrunn, E., 2021. Structural Insights into JAK2 Inhibition by Ruxolitinib, Fedratinib, and Derivatives Thereof. *J. Med. Chem.* 25,64(4), 2228-2241. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01952>.
- Deng, J.Y., Sun, D., Liu, X.Y., Pan, Y., Liang, H., 2010. STAT-3 correlates with lymph node metastasis and cell survival in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 16 (42), 5380-5387. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i42.5380>.
- Dennington, R., Keith, T., Millam, J., 2009. GaussView, Version 5. Semicem Inc. Shawnee Mission, KS.
- Dennington, R., Keith, T., Millam, J., 2009. GaussView, Version 5, Semicem Inc., Shawnee Mission, KS. Semicem Inc.
- Dittharot, K., Dakeng, S., Suebsakwong, P., Suksamrarn, A., Patmasiriwat, P., Promkan, M., 2019. Cucurbitacin B Induces Hypermethylation of Oncogenes in Breast Cancer Cells. *Planta medica.* 85(5), 370-378. <https://doi.org/10.1055/a-0791-4591>
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limonophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.* 22 (3), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455 (1-2), 81-95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8).
- Fenech, M., 2020. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes* 11 (10), 1203. <https://doi.org/10.3390/genes11101203>.
- Feng, H., Zang, L., Zhao, Z.X., Kan, Q.C., 2014. Cucurbitacin-E inhibits multiple cancer cells proliferation through attenuation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cancer Biother. Radiopharm.* 29 (5), 210-214. <https://doi.org/10.1089/cbr.2014.1614>.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M. A., Cheeseman, J.R., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A. F., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J.J., Brothers, E., Kudin, N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K.A., Rendell, K., Burant, J.C.S., Iyengar, S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J.M., Klene, M., Knox, J.E., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzewski, V.G., Voth, A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J., Gaussian, D.J., Bioinfo, J., Honda, Y., Kudin, K.N., Stratmann, R.E., Voth, G.A. 2009. Gaussian 09, 2-3.
- Fujita, M., Zhu, X., Sasaki, K., Ueda, R., Low, K.L., Pollack, L.F., Okada, H., 2008. Inhibition of STAT3 promotes the efficacy of adoptive transfer therapy using type-1 CTLs by modulation of the immunological microenvironment in a murine intracranial glioma. *J. Immunol.* 180 (4), 2089-2098. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2089>.
- Garg, S., Kaul, S.C., Wadhwa, R., 2008. Cucurbitacin B and cancer intervention: Chemistry, biology and mechanisms (Review). *Int. J. Oncol.* 52 (1), 19-37. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4203>.
- Ge, W., Chen, X., Han, F., Liu, Z., Wang, T., Wang, M., Chen, Y., Ding, Y., Zhang, Q., 2008. Synthesis of Cucurbitacin B Derivatives as Potential Anti-Hepatocellular Carcinoma Agents. *Molecules (Basel, Switzerland).* 23 (12), 3345. <https://doi.org/10.3390/molecules23123345>.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- He, X., Gao, Q., Qiang, Y., Guo, W., Ma, Y., 2017. Cucurbitacin E induces apoptosis of human prostate cancer cells via cofilin-1 and mTORC1. *Oncology letters.* 13 (6), 4905-4910. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6086>.
- Kaushik, U., Aeri, V., Mir, S.R., 2015. Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature. *Pharmacogn. Rev.* 9 (17), 12-18. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.156314>.
- Krepky, P.B., Cervelin, M.O., Forath, D., Peters, R.R., Ribeiro-do-Valle, R.M., Farias, M.R., 2009. High performance liquid chromatography determination of cucurbitacins in the roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19 (3), 715-719. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000500011>.
- Lang, K.L., Silva, I.T., Zimmermann, L.L., Machado, V.R., Teixeira, M.R., Lapuh, M.I., Galetti, M.A., Palermo, J.A., Cabrera, G.M., Bernardes, L.S.C., Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Caro, M.S.B., Durán, F.J., 2012. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. *Química Bioorg. Med.* 20 (9), 3016-3030. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.001>.
- Leal, M.F., Nascimento, J.L.M., Silva, C.E.A., Larmarho, M.F.V., Calagno, D.Q., Khayat, A.S., Burbano, R.R., 2009. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.* 195 (1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.cancerogen.2009.04.020>.
- Leão, R.P., Cruz, J.V., Costa, G.V., Cruz, J.N., Ferreira, E.F.B., Silva, R.C., Lima, L.R., Borges, R.S., Santos, G.B., Santos, C.B.R., 2020. Identification of New Refocoxib-Based Cyclooxygenase-2 Inhibi-

- tor: A Bioinformatics Approach. *Pharmaceuticals (Basel)* 26, 209. <https://doi.org/10.3390/ph13090209>.
- Li, H., Chen, H., Li, R., Xin, J., Wu, S., Lan, J., Xue, K., Li, X., Zuo, C., Jiang, W., Zhu, L., 2018. Cucurbitacin I induces cancer cell death through the endoplasmic reticulum stress pathway. *J. Cell. Biochem.* 1–13, 27570. <https://doi.org/10.1002/jcb.27570>.
- Lipinski, C.A., 2004. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 1 (4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- Liu, P., Xiang, Y., Liu, X., Zhang, T., Yang, R., Chen, S., Xu, L., Yu, Q., Zhao, H., Zhang, L., Liu, Y., Si, Y., 2019. Cucurbitacin B Induces the Lysosomal Degradation of EGFR and Suppresses the CIP2A/PP2A/Akt Signaling Axis in Gefitinib-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (3), 647. <https://doi.org/10.3390/molecules24030647>.
- Liu, X., Duan, C., Ji, J., Zhang, T., Yuan, X., Zhang, Y., Ma, W., Yang, J., Yang, L., Jiang, Z., Yu, H., Liu, Y., 2017. Cucurbitacin B induces autophagy and apoptosis by suppressing CIP2A/PP2A/mTORC1 signaling axis in human cisplatin resistant gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* 38 (1), 271–278. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5648>.
- Liu, Y., Yang, H., Guo, Q., Liu, T., Jiang, Y., Zhao, M., Zeng, K., Tu, P., 2020. Cucurbitacin E Inhibits Huh7 Hepatoma Carcinoma Cell Proliferation and Metastasis via Suppressing MAPKs and JAK/STAT3 Pathways. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (3), 560. <https://doi.org/10.3390/molecules25030560>.
- Liu, Y.F., Lu, Y.M., Qu, G.Q., Liu, Y., Chen, W.X., Liao, X.H., Kong, W.M., 2015. Ponocidin induces apoptosis via JAK2 and STAT3 signaling pathways in gastric carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (1), 1576–1589. <https://doi.org/10.3390/ijms16011576>.
- Mascarenhas, A.M.S., Almeida, R.B.M., Araujo Neto, M.F., Mendes, G.O., Cruz, J.N., Santos, C.B.R., Botura, M.B., Leite, F.H.A., 2020. Pharmacophore-based virtual screening and molecular docking to identify promising dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–10. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796791>.
- Maués, J.H.D.S., Ribeiro, H.F., Pinto, G.R., Lopes, L.O., Lamião, L.M., Pessoa, C.M.F., Moreira-Nunes, C.F.A., Carvalho, R.M.C., Assumpção, P.P., Rey, J.A., Burbano, R.M.R., 2018. Gastric Cancer Cell Lines Have Different *MYC*-Regulated Expression Patterns but Share a Common Core of Altered Genes. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018, 5804376. <https://doi.org/10.1155/2018/5804376>.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Oliveira, M.S., Cruz, J.N., Costa, W.A., Silva, S.G., Brito, M.D.P., Menezes, S.A.F., Chaves-Neto, A.M.J., Andrade, E.H.A., Carvalho-Junior, R.N., 2020. Chemical Composition, Antimicrobial Properties of *Siparuna guianensis* Essential Oil and a Molecular Docking and Dynamics Molecular Study of its Major Chemical Constituent. *Molecules* 25 (17), 3852. <https://doi.org/10.3390/molecules25173852>.
- Park, J.B., Agnihotri, S., Golbourn, B., Bertrand, K.C., Luck, A., Sabha, N., Smith, C.A., Byron, S., Zadeh, G., Croul, S., Berens, M., Rutka, J.T., 2014. Transcriptional profiling of GBM invasion genes identifies effective inhibitors of the LIM kinase-Cofilin pathway. *Oncotarget*, 2014, 9382–9395. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2412>.
- Rasoaivo, P., Wright, C.W., Wilcox, M.L., Gilbert, B., 2011. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar. J.* 10 (1), S4. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S4>.
- Salvadori, D.M.F., Ribeiro, L.R., Fenech, M., 2003. Teste do Micronúcleo em células humanas *in vitro*, in: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K., *Mutagenese Ambiental*. Ed. ULBRA, Canoas, RS, Brazil, 201–210.
- Santos, C.B.R., Santos, K.L.B., Cruz, J.N., Leite, F.H.A., Borges, R. S., Taft, C.A., Campos, J.M., Silva, C.H.T.P., 2021. Molecular modeling approaches of selective adenosine receptor type 2A agonists as potential anti-inflammatory drugs. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 39 (9), 3115–3127. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1761878>.
- Sikander, M., Hafeez, B.B., Malik, S., Alsayari, A., Halawish, F.T., Yallapu, M.M., Chauhan, S.C., Jaggi, M., 2016. Cucurbitacin D exhibits potent anti-cancer activity in cervical cancer. *Sci. Rep.* 6, 3694. <https://doi.org/10.1038/srep36594>.
- Sikander, M., Malik, S., Khan, S., Kumari, S., Chauhan, N., Khan, P., Halawish, F.T., Chauhan, B., Yallapu, M.M., Jaggi, M., Chauhan, S.C., 2019. Novel Mechanistic Insight into the Anti-cancer Activity of Cucurbitacin D against Pancreatic Cancer (Cuc D Attenuates Pancreatic Cancer). *Cells* 9 (1), 103. <https://doi.org/10.3390/cell9010103>.
- Silva, F.C., Ferreira, M.K., Silva, A.W., Matos, M.G., Magalhães, F., Silva, P.T., Bandeira, P.N., Menezes, J.E., Santos, H.S., 2020. Bioactivities of plant-isolated Triterpenes: A brief review. *Revista Virtual de Química* 12, 234–247. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200008>.
- Sylvia, M.T., Baskaran, L., Bhat, R.V., 2018. Micronucleus Study on Breast Cytology Aspirate Smears and its Diagnostic Utility. *J. Cytol.* 35 (1), 22–26. [https://doi.org/10.4103/JOCJOC\\_160\\_16](https://doi.org/10.4103/JOCJOC_160_16).
- Thomsen, R., Christensen, M.H., 2006. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.* 49, 3315–3321. <https://doi.org/10.1021/jm051197e>.
- Tian, H., Gao, Z., Li, H., Zhang, B., Wang, G., Zhang, Q., Pei, D., Zheng, J., 2015. DNA damage response—a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. *Cancer Lett.* 358 (1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.038>.
- Tropicos.org., 2020. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/9200612> (accessed 11 June 2020)
- USP 30-NF 25, 2007. General Chapter USP <467> Residual Solvents / Organic volatile impurities, United States Pharmacopeia. Pharmacopoeia Convention Inc., Rockville, MD, USA, 1–10. [https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Current.pdf](https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Current.pdf) (accessed 03 October 2021).
- Valente, L.M.M., 2004. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. *Quím. Nova* 27 (6), 944–948. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600019>.
- Williams, N.K., Bamert, R.S., Patel, O., Wang, C., Walden, P.M., Wilks, A.F., Fantino, E., Rossjohn, J., Lucet, I.S., 2009. Dissecting specificity in the Janus kinases: the structures of JAK-specific inhibitors complexed to the JAK1 and JAK2 protein tyrosine kinase domains. *J. Mol. Biol.* 20;387(1), 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.041>.
- Xu, J., Chen, Y., Yang, R., Zhou, T., Ke, W., Si, Y., Yang, S., Zhang, T., Liu, X., Zhang, L., Xiang, K., Guo, Y., Liu, Y., 2020. Cucurbitacin B inhibits gastric cancer progression by suppressing STAT3 activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 684, 108314. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108314>.
- Yar-Saglam, A.S., Alp, E., Elmazoglu, Z., Menevse, S., 2016. Treatment with cucurbitacin B alone and in combination with gefitinib induces cell cycle inhibition and apoptosis via EGFR and JAK/STAT pathway in human colorectal cancer cell lines. *Hum. Exp. Toxicol.* 35 (5), 526–543. <https://doi.org/10.1177/0960327115595686>.
- Zhang, Y. Z., Wang, C. F., Zhang, L. F., 2018. Cucurbitacin D impedes gastric cancer cell survival via activation of the iNOS/NO and inhibition of the Akt signaling pathway. *Oncology reports* 39 (6), 2595–2603. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6361>

## 4 CAPÍTULO II

***Luffa operculata* e sua Cucurbitacina B reduzem a expressão do oncogene MYC e apresentam potencial antineoplásico em modelos de câncer gástrico.**

O artigo em preparação e será submetido à revista BMC Biology em junho de 2022.

## ***Luffa operculata* e sua Cucurbitacina B reduzem a expressão do oncogene MYC e apresentam potencial antineoplásico em modelos de câncer gástrico.**

### **RESUMO**

**Background:** *Luffa operculata* é uma planta medicinal conhecida popularmente como cabacinha e buchinha do norte, seu extrato apresenta majoritariamente as cucurbitacinas como fitoconstituintes. Essas substâncias apresentam atividades biológicas, como citotoxicidade, indução de apoptose, modulação do ciclo celular, que são características observadas em antineoplásicos. Desta forma, o presente estudo buscou avaliar o potencial anticarcinogênico do extrato dos frutos de *Luffa operculata* e comparar com os resultados da avaliação da cucurbitacina B em modelos de câncer gástrico (linhagens AGP01 e ACP03).

**Resultado:** Os resultados demonstraram que Extrato Etanólico do Fruto (EEF) de *L. operculata* e a cucurbitacina B (CB - isolada desse extrato) promoveram alta citotoxicidade nas linhagens de câncer gástrico com destaque para elevada seletividade de EEF na linhagem ACP03. Foi observada a indução da apoptose e redução da expressão do gene MYC por EEF e CB. Observou-se que a cucurbitacina B promove ainda o aumento da parada do ciclo celular na fase G2/M. O ensaio de micronúcleo não atestou indução de genotoxicidade.

**Conclusão:** Portanto a ação do extrato e a cucurbitacina B de *Luffa operculata* na redução da expressão do oncogene MYC, e da progressão do ciclo celular, assim como a diminuição da viabilidade das células neoplásicas evidenciaram efeitos importantes nos modelos in vitro. Logo, os resultados deste estudo apontam o potencial terapêutico do extrato e a cucurbitacina B de *Luffa operculata* no câncer gástrico.

### **INTRODUÇÃO**

A *Luffa operculata* (L.) Cogn, objeto deste estudo, foi coletada no arquipélago do Marajó da Amazônia brasileira, é uma planta medicinal popularmente conhecida como cabacinha, buchinha, buchinha do norte, e seus frutos são utilizados principalmente para o tratamento de rinosinusite, mas também há relatos de efeito abortivo (Alves et al. 2018), apresenta também conhecido efeito citotóxico em células de mucosas (Menon-Miyake et al., 2005), o que estimulou a hipótese de que outros tipos celulares poderiam ser suscetíveis a

essa ação citotóxica. A utilização dessa planta medicinal e seus metabólitos na prevenção e tratamento de problemas de saúde está intimamente relacionada à relação antropológica em algumas regiões do mundo, tais como a Amazônia brasileira, o que induz a investigação das ações medicinais dos produtos naturais a partir de relatos e estudos observacionais na etnofarmacologia (Heinrich, 2014).

A *L. operculata* é uma planta da família Cucurbitaceae rica em cucurbitacinas, que são triterpenos oxidados com esqueleto carbônico modificado. Os triterpenos, juntamente com seus derivados glicosilados são apontados como agentes responsáveis pela potente toxicidade observada nos extratos dos frutos dessa planta (Kawahara et al., 2001). Estudos com derivados de vegetais geralmente são focados na investigação da atividade biológica de metabólitos isolados das plantas, ao invés do extrato, pelo fato de permitir uma associação mais direta aos efeitos (Luo et al., 2018; Sallam et al., 2018; Dittharot et al., 2019; Hunsakunachai et al., 2019; Klungsaeng et al., 2019; Dandawate et al., 2020; Kurman et al., 2020; Xu et al., 2020), porém essa preferência exclui a análise de possíveis resultados promissores com os demais componentes encontrados nos extratos de plantas medicinais.

Neste sentido, estudos biológicos que permitam conhecer o comportamento do extrato de plantas medicinais são importantes por apresentar um potencial terapêutico tanto dos extratos quanto seus constituintes, diante disso, a caracterização da ação do extrato dos frutos de *Luffa operculata* nos processos de viabilidade celular, necrose, apoptose, ciclo celular, genotoxicidade, migração celular e expressão gênica em linhagens de tecidos humanos, permite inferir sobre

potencial anticâncer do extrato e comparar estes resultados com os do metabólito majoritário extraído do extrato dos frutos, a cucurbitacina.

Visando compreender sobre os mecanismos moleculares envolvidos nas atividades celulares observadas na exposição ao extrato dos frutos de *L. operculata* e cucurbitacina B, avaliou-se a expressão gênica de MYC, BCL2, CCND1 e EPCAM em linhagens de tecidos humanos. O gene MYC é um dos proto-oncogenes mais frequentemente na carcinogênese humana pois está relacionado à regulação do ciclo celular, proliferação e sobrevivência celular (Yoshida, 2018). Já BCL2 é um gene que está relacionado à inibição da apoptose e costuma ser superexpresso em vários tipos de câncer, incluindo o carcinoma gástrico (Cheng, 2015). CCND1 codifica a ciclina D1, que pertence à família das ciclinas altamente conservadas e sua alta expressão costuma ser verificada em vários tumores malignos, relacionando-se ao aumento da proliferação celular, migração, e metástase (Zhang, 2016). O gene EPCAM expressa uma glicoproteína que está associada à promoção da adesão celular, migração e proliferação de células em tumores (Huang et al., 2018) e sua superexpressão em câncer gástrico está associado a um pior prognóstico (Dai et al., 2017).

A avaliação fitoquímica dos extratos dos frutos de *L. operculata* evidenciou a presença de cucurbitacina B (CB) como componente majoritário (Galucio et al., 2022). À essa substância foi atribuída ação citotóxica em vários modelos de câncer, por exemplo, de pulmão, mama, neurológico, hepatocelular e cólon (Garg et al., 2018). Entre os alvos de estudo em neoplasias humanas, certamente o câncer gástrico merece muita atenção, pois, dentre outros tipos de câncer, frequentemente

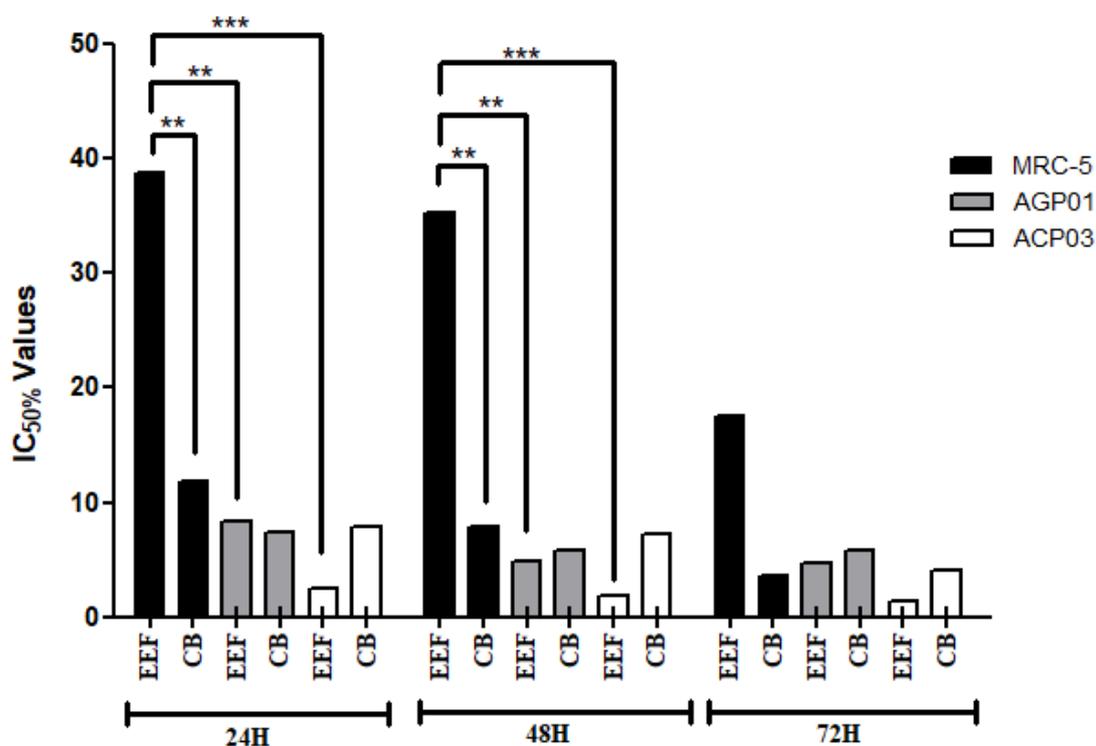
apresenta mau prognóstico e baixas taxas de sobrevida (Díaz Del Arco et al., 2021). Ademais, este câncer, em 2020 foi o quarto tipo de neoplasia maligna que mais causou morte no mundo (WHO, 2021).

No que se refere ao tratamento, a principal escolha para o câncer gástrico é o procedimento cirúrgico, sendo que as terapias não-cirúrgicas apresentam eficiência pouco satisfatória, logo, a quimioterapia tem sido utilizada como tratamento adjuvante com o intuito de melhorar a sobrevida de pacientes com este tipo de câncer (Smyth et al., 2020). Além das dificuldades inerentes a efetiva ação antineoplásica no controle do câncer, um dos motivos da não eficácia das quimioterapias convencionais, muitas vezes está relacionada à sua alta toxicidade (Ranjan et al., 2019), e a quimiorresistência (Zheng, 2017), acentuando a importância pela busca de novas estratégias de terapia.

## **CITOTOXICIDADE E SELETIVIDADE CELULAR**

O extrato do fruto de *Luffa operculata* (extrato etanólico do fruto - EEF) e cucurbitacina B (CB) induziram atividade citotóxica nas três linhagens testadas (figura 01). Na linhagem MRC-5, a comparação entre EEF e CB demonstra diferença ( $p < 0.01$ ) nos tempos de 24h e 48h, nesse caso a  $IC_{50\%}$  de EEF também foi maior que a de CB. A comparação das  $IC_{50\%}$  do EEF e CB nas células de AGP01 não revelou diferença significativa ( $p > 0.05$ ) entre eles. Também não foi verificada diferença estatística significativa ( $p > 0.05$ ) na comparação das  $IC_{50\%}$  entre extrato e CB na linhagem ACP03 (figura 01).

### IC<sub>50%</sub> values in Human Cell Lines



**Figura 01:** Valores de IC<sub>50%</sub> das linhagens celulares MRC-5, AGP01 e ACP03 nos tempos de 24h, 48h, e 72h. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = Cucurbitacina B. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

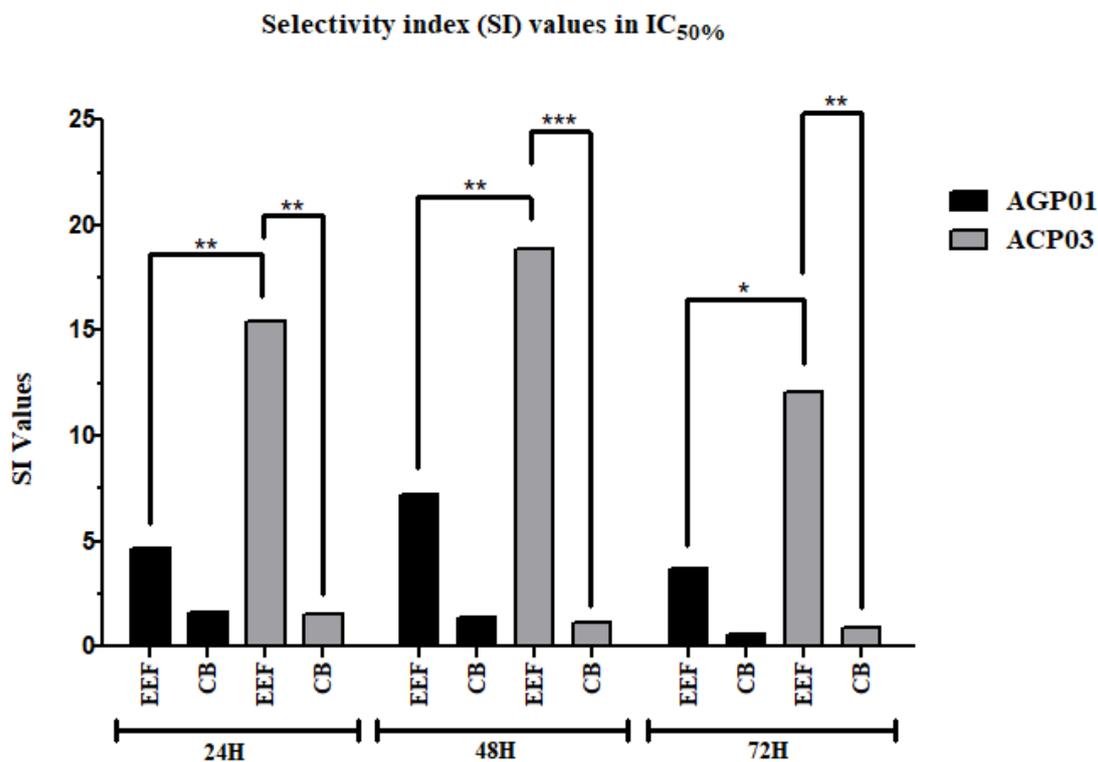
Os valores de IC<sub>50%</sub> do EEF (tabela 01) nos tempos de 24h e 48h são muito menores nas linhagens AGP01 e ACP03 quando comparados à MRC-5 ( $p < 0.001$ ), logo, indicando maior citotoxicidade nas linhagens de câncer gástrico testadas. Porém para a CB não houve diferença estatística significativa ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 1:** Valores de IC<sub>50%</sub> obtidos de linhagens celulares humanas expostas a extratos e substâncias isoladas de *Luffa operculata*.

	Cell Line								
	MRC-5			AGP01			ACP03		
Sample	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
EEF (ng/mL)	38.83	35.25	17.55	8.29	4.90	4.71	2.52	1.87	1.45
CB (ng/mL)	11.90	7.90	3.53	7.44	5.89	5.87	7.83	7.16	4.06

**Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = Cucurbitacina B. \* $p < 0,05$  e  $R^2 > 0,96$ .

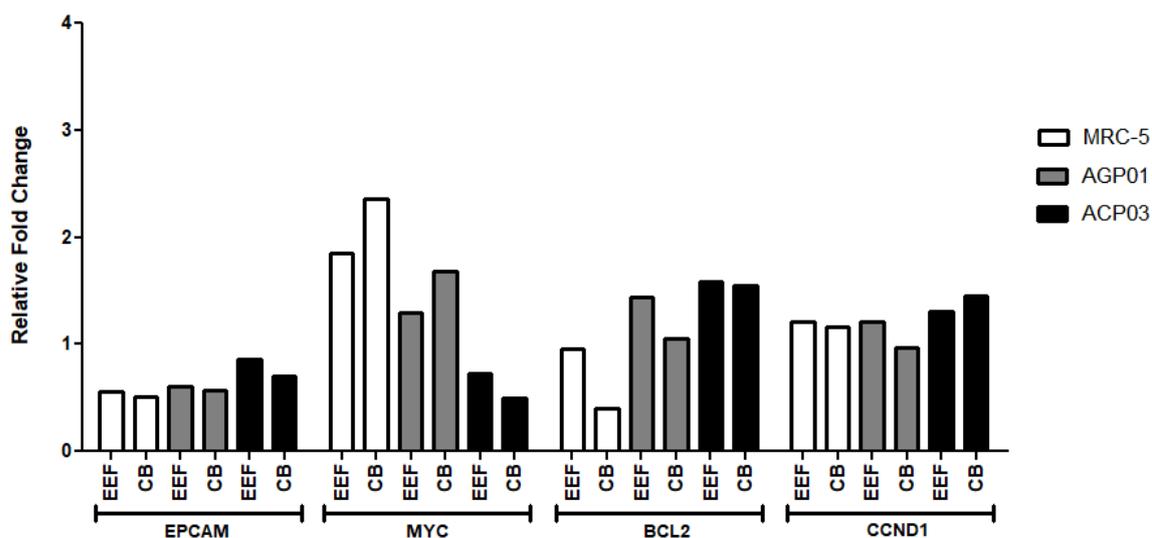
As duas linhagens de câncer gástrico foram sensíveis à exposição de EEF (Supplementary information - table 1), e o resultado do índice de seletividade - IS (figura 02) indicou maior seletividade ( $p < 0.001$ ) na linhagem de câncer ACP03, principalmente no tempo de 48h (IS = 18.85). A avaliação do IS de CB revelou que não houve diferença ( $p > 0.05$ ) nas duas linhagens de câncer gástrico (AGP01 - 24h = 1.60, 48h = 1.34 e 72h = 0.60; ACP03 - 24h = 1.51, 48h = 1.10 e 72h = 0.87) corroborando com o ponto de corte estabelecido na metodologia de IS visto que as  $IC_{50\%}$  da linhagem não neoplásica precisam ser pelo menos três vezes maiores do que as  $IC_{50\%}$  das linhagens neoplásicas, logo, CB não demonstrou seletividade para essas linhagens de câncer gástrico.



**Figura 02:** Valor de Índice de Seletividade com base no IC<sub>50</sub>% das linhagens MRC-5, AGP01 e ACP03 nos tempos de 24h, 48h, e 72h. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = Cucurbitacina B. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## EXPRESSION

Este estudo investigou a expressão dos genes EPCAM, MYC, BCL2 e CCND1 em relação à influência de CB e EEF, como apresentado na figura 03. As análises revelaram que o tratamento das células com CB e EEF reduziu a expressão de EPCAM em MRC-5 e AGP01 ( $p < 0.05$ ). Não foi observada influência significativa ( $p > 0.05$ ) na expressão de CCND1 nas linhagens estudadas.



**Figura 03:** Avaliação da expressão relativa normalizada de diferentes alvos em linhagens celulares humanas. **Legenda:** EEF=Extrato Etanólico do Fruto, CB=cucurbitacina B. Para a linhagem MRC-5 as concentrações foram EEF=17.625 ng/ml e CB=3.95 ng/ml. Na linhagem AGP01 foram EEF=2.45 ng/ml e CB=2.945 ng/ml, e para a linhagem ACP03 as concentrações foram EEF=0.935 ng/ml e CB=3.58 ng/ml.

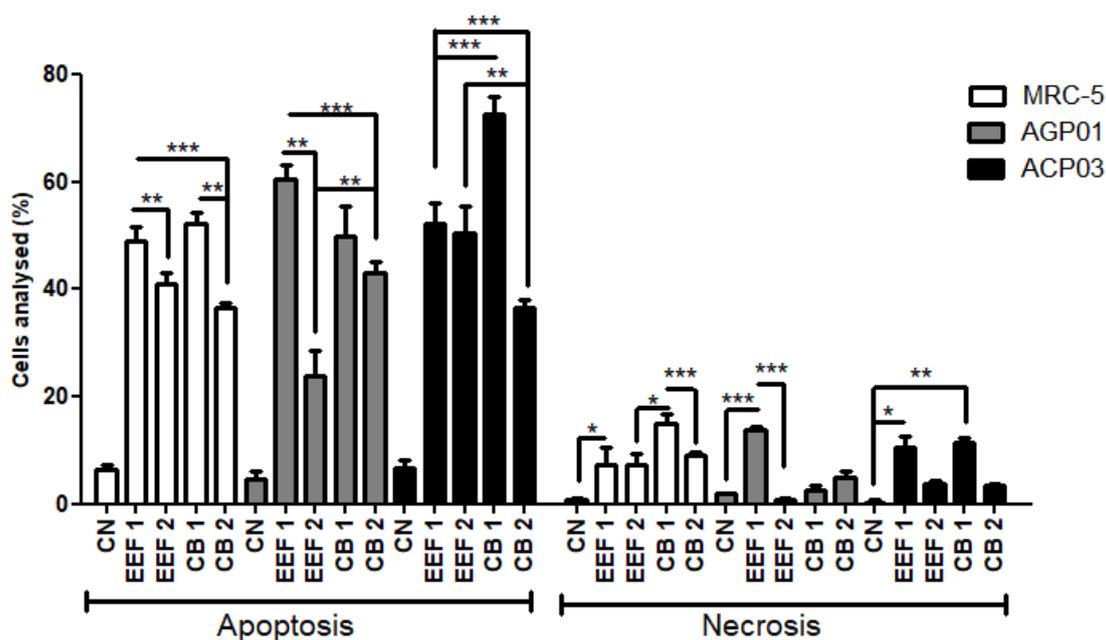
Embora CB tenha elevado expressão de MYC em MRC-5, reduziu em ACP03, e esta redução também foi significativa quando comparada a influência da cucurbitacina B nas outras linhagens ( $p < 0.05$ ). Tal efeito também pode ser notado pela ação do EEF na ACP03 quando comparada a MRC-5 ( $p < 0.05$ ). CB reduziu a expressão de BCL2 em MRC-5 e a elevou em ACP03 ( $p < 0.05$ ). O mesmo efeito pode ser observado com o uso do EEF ( $p < 0.05$ ). O aumento da expressão foi significativamente maior em ACP03 quando comparada a MRC-5, quando avaliada a ação de CB.

Interessantemente a elevação da expressão de MYC está associada a redução de BCL2 em MRC-5, fato este que foi observado de maneira inversa (redução de MYC e aumento de BCL2) na linhagem ACP03 ( $p < 0.05$ ).

## **DETECÇÃO DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE E NECROSE**

A avaliação do tipo de morte celular nas linhagens foi realizada após 24h de tratamento para investigar a viabilidade, apoptose e necrose do extrato e da substância isolada. Para a linhagem MRC-5, EEF e CB, nas duas concentrações testadas, apresentaram diferença significativa em comparação ao controle negativo (figura 04). O EEF1 e EEF2 induziu mais apoptose ( $p < 0.001$ ) e necrose ( $p < 0.05$ ) que o controle negativo. CB1 e CB2 ocasionaram mais morte por apoptose ( $p < 0.001$ ), em comparação ao controle negativo, no entanto, o CB1 causou mais indução de apoptose e necrose que CB2 ( $p < 0.001$ ), relacionado ao aumento da concentração. Ao comparar EEF1 com EEF2, observou-se maior indução de apoptose de forma dose dependente ( $p < 0.05$ ).

### Percentages of apoptotic and necrotic cells



**Figura 04:** Avaliação da morte celular por apoptose e necrose induzida por diferentes concentrações de EEF e CB. **Legenda:** EEF=Extrato Etanólico do Fruto, CB=cucurbitacina B. A amostra CN = controle negativo. Para a linhagem MRC-5 as concentrações foram EEF1=17.625 ng/ml, EEF2=8.8125 ng/ml, CB1=3.95 ng/ml, CB2=1.975 ng/ml. Na linhagem AGP01 foram EEF1=2.45 ng/ml, EEF2=1.225 ng/ml, CB1=2.945 ng/ml, CB2=1.4725 ng/ml e para a linhagem ACP03, as concentrações foram EEF1=0.935 ng/ml, EEF2=0.4675 ng/ml, CB1=3.58 ng/ml, CB2=1.79 ng/ml. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Na linhagem de câncer gástrico AGP01 o EEF1, EEF2, CB1 e CB2 geraram maior morte por apoptose ( $p < 0.001$ ) que o controle negativo, e EEF1 ainda apresentou maior indução de necrose ( $p < 0.05$ ) que o controle negativo (figura 04). Ao confrontarmos os resultados de EEF1 com EEF2 observou-se prevalência de

mortes por apoptose ( $p < 0.001$ ) de forma dependente de dose, inclusive EEF1 gerou mais células necróticas que EEF2.

Na linhagem neoplásica ACP03, as drogas EEF1, EEF2, CB1 e CB2 geraram mais morte por apoptose ( $p < 0.001$ ) que o controle negativo, e CB1 e EEF1 ainda promoveram mais morte por necrose ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ , respectivamente) que o controle negativo (figura 4).

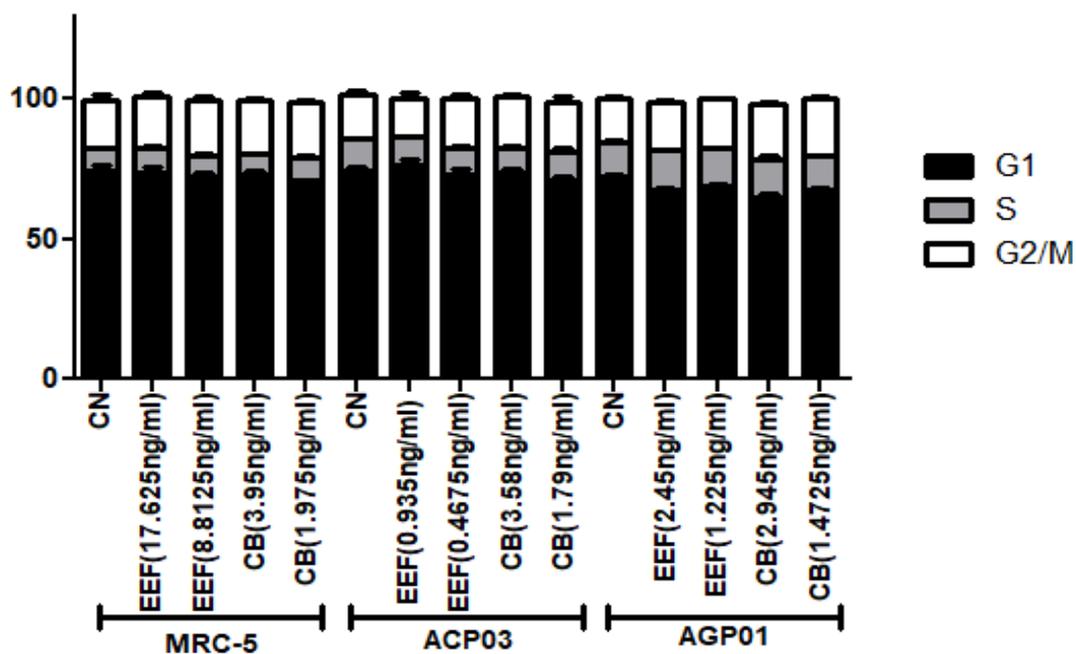
EEF1 induziu mais apoptose ( $p < 0.01$ ) na AGP01 em comparação a MRC-5. Já EEF2 induziu mais morte por apoptose nas células ACP03 que em MRC-5 ( $p < 0.05$ ), e AGP01 ( $p < 0.001$ ).

CB1 induziu ( $p < 0.01$ ) mais morte por necrose na MRC-5 do que na AGP01, e induziu mais morte por apoptose na ACP03 ( $p < 0.001$ ) que na AGP01.

## **ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS NÃO NEOPLÁSICAS E CÂNCER GÁSTRICO TRATADOS COM EEF E CB**

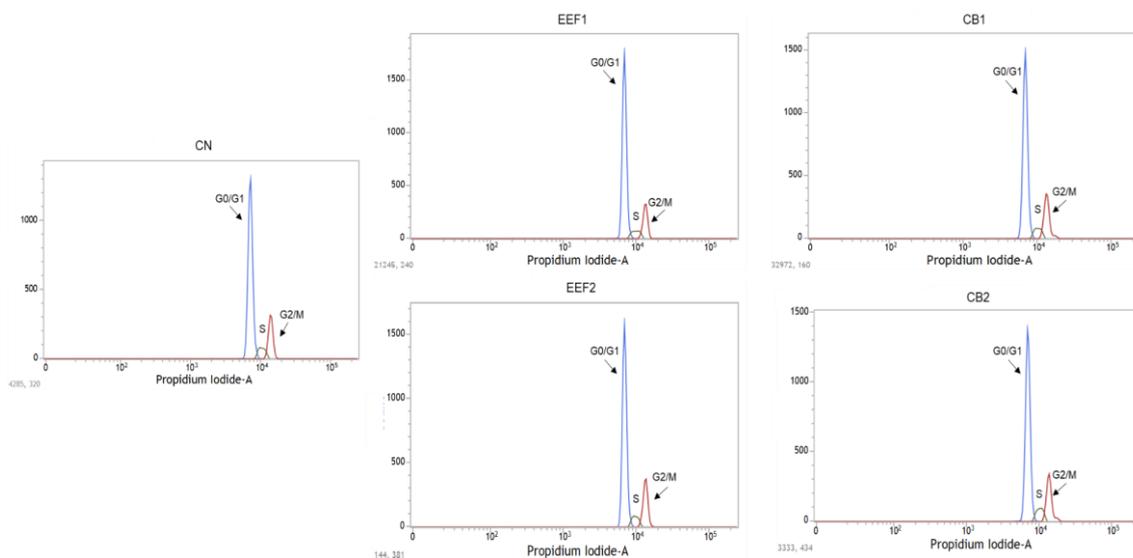
A análise do ciclo celular na linhagem MRC-5 não resultou em diferença estatística entre o controle negativo (CN) e EEF1, EEF2, CB1 e CB2 (figura 05 e 06). Também não foi observada diferença estatística entre EEF1 e EEF2, e entre CB1 e CB2.

### Effect of Extract and cucurbitacin B on cell cycle progression.



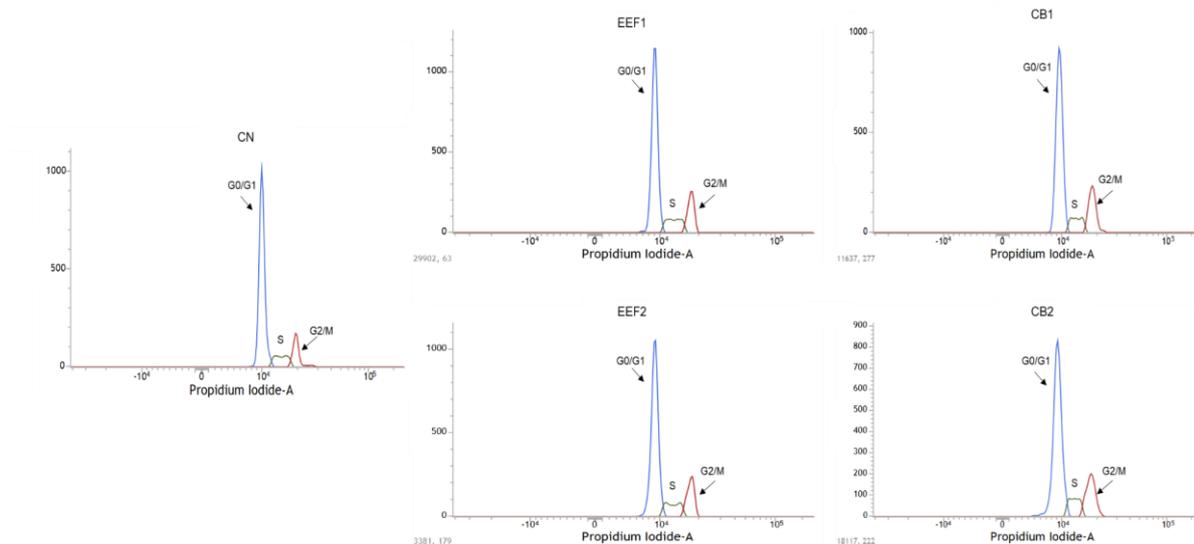
**Figura 05:** Efeito do EEF e CB na distribuição do ciclo celular. Legenda: EEF=Extrato Etanólico do Fruto, CB=cucurbitacina B. A amostra CN = controle negativo.

Não foi evidenciado, entre extrato e substância isolada, alteração nas fases do ciclo celular (figura 05 e 06). Em todas as amostras analisadas (CN, EEF1, EEF2, CB1 e CB2) observou-se, naturalmente, prevalência de células na fase G0/G1 (mais de 70%).



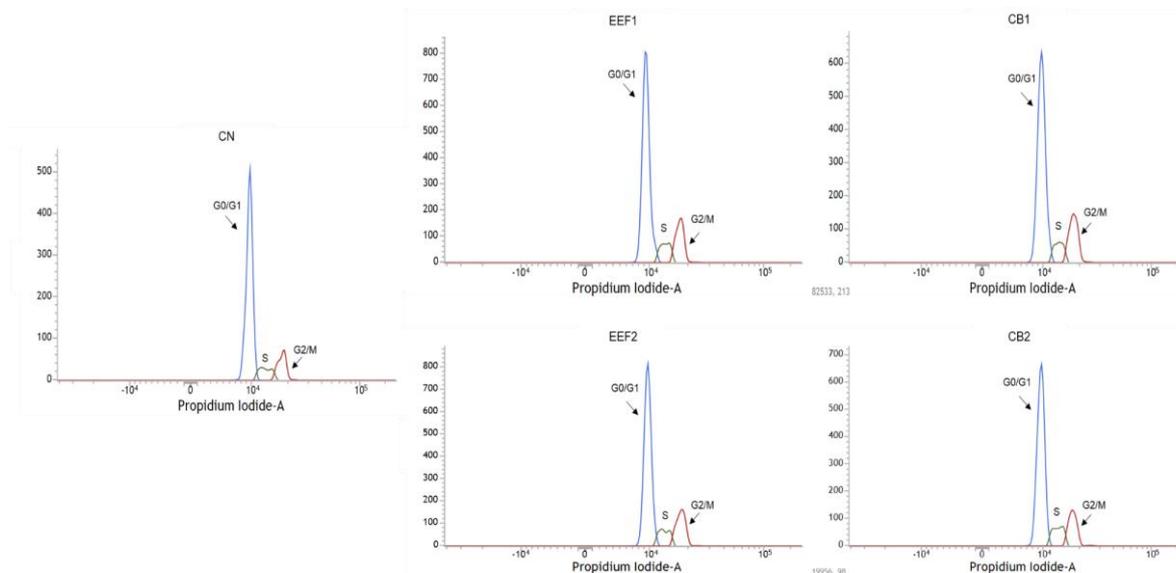
**Figure 06:** Efeito de EEF e CB na distribuição do ciclo celular em MRC-5. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = cucurbitacina B. A amostra CN=controle negativo, EEF1=17.625 ng/ml, EEF2=8.8125 ng/ml, CB1=3.95 ng/ml, CB2=1.975 ng/ml.

EEF1 apresentou maior quantidade de células nas fases S e G2/M ( $p < 0.05$ ) que o controle negativo na linhagem AGP01 (figura 05 e 07). EEF2 ( $p < 0.01$ ), CB1 ( $p < 0.001$ ) e CB2 ( $p < 0.001$ ) apresentaram mais células na fase G2/M. Não foi observada diferença significativa entre as fases do ciclo das células expostas a EEF1 e EEF2, logo, a diferença de concentração não influenciou no ciclo celular. CB2 apresentou mais células na fase G0/G1 quando comparado com CB1 ( $p < 0.001$ ). CB1 e CB2 aumentaram, em relação a EEF1 e EEF2 ( $p < 0.05$ ), o número de células na fase G2/M. Mas vale ressaltar que nas amostras analisadas (CN, EEF1, EEF2, CB1 e CB2) observou-se prevalência de células na fase G0/G1 (mais de 62%).



**Figure 07:** Efeito de EEF e CB na distribuição do ciclo celular em AGP01. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = cucurbitacina B. A amostra CN=controle negativo, EEF1=2.45 ng/ml, EEF2=1.225 ng/ml, CB1=2.945 ng/ml, CB2=1.4725 ng/ml.

Na linhagem ACP03 as amostras analisadas (CN, EEF1, EEF2, CB1 e CB2) apresentaram maior prevalência de células na fase G0/G1 (mais de 69%). Também não houve alteração na cinética do ciclo celular ao compararmos controle negativo com EEF1, EEF2, CB1 e CB2, nem entre as próprias amostras nas diferentes concentrações. Foi observado que a exposição à CB1 elevou a quantidade de células na fase G2/M em comparação ao EEF1 ( $p < 0.05$ ) (figura 05 e 08).

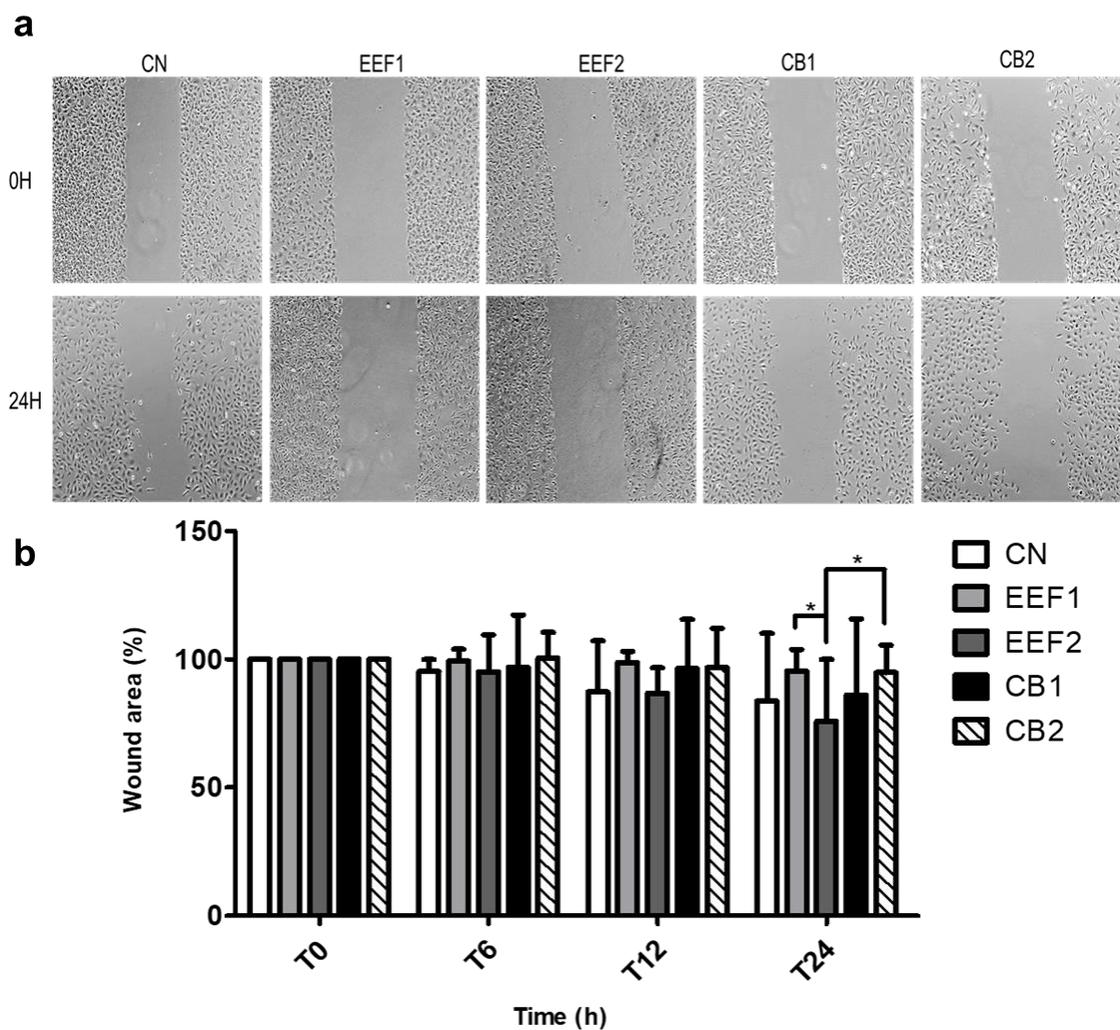


**Figure 08:** Efeito de EEF e CB na distribuição do ciclo celular em ACP03. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = cucurbitacina B. A amostra CN=controle negativo, EEF1=0.935 ng/ml, EEF2=0.4675 ng/ml, CB1=3.58 ng/ml, CB2=1.79 ng/ml.

A linhagem AGP01 exposta a EEF1 apresentou mais células na fase G0/G1 e na fase S do que na MRC-5 ( $p < 0.01$ ). Já na comparação entre AGP01 e ACP03, EEF1 elevou a percentual de células na fase G0/G1 na linhagem ACP03 do que na AGP01 ( $p < 0.001$ ), e induziu mais células na fase S em AGP01 do que na ACP03 ( $p < 0.05$ ). EEF2 resultou em mais células na fase S em AGP01 do que na MRC-5 ( $p < 0.01$ ), e mais células na fase G0/G1 na linhagem ACP03 do que em AGP01 ( $p < 0.05$ ). CB1 apresentou mais células na fase G0/G1 nas linhagens MRC-5 e ACP03 do que na AGP01 ( $p < 0.001$ ), e mais células na fase S em AGP01 do que na MRC-5 ( $p < 0.001$ ) e na ACP03 ( $p < 0.05$ ).

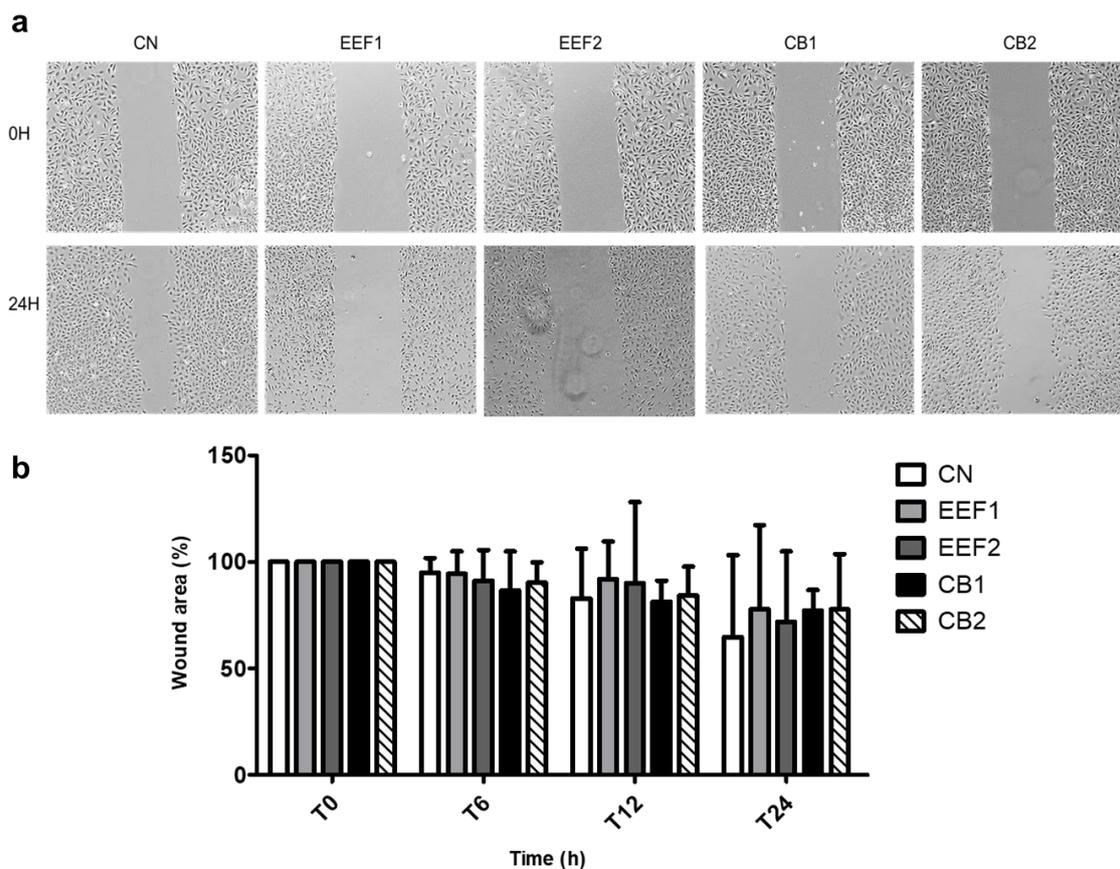
## EEF E CB REDUZ A ATIVIDADE MIGRATÓRIA DE CÉLULAS DE CÂNCER GÁSTRICO

Nas células MRC-5 não foi observada diferença ( $p > 0.05$ ) na atividade migratória após exposição dessas células às diferentes concentrações de EEF e CB em relação ao controle negativo (figura 09). EEF1 em comparação a EEF2 inibiu significativamente ( $p < 0.05$ ) uma maior migração de células no tempo de 24h, logo, foi possível verificar a influência da concentração do extrato na maior inibição. CB2 inibiu mais a migração que EEF2, no tempo de 24h ( $p < 0.05$ ).



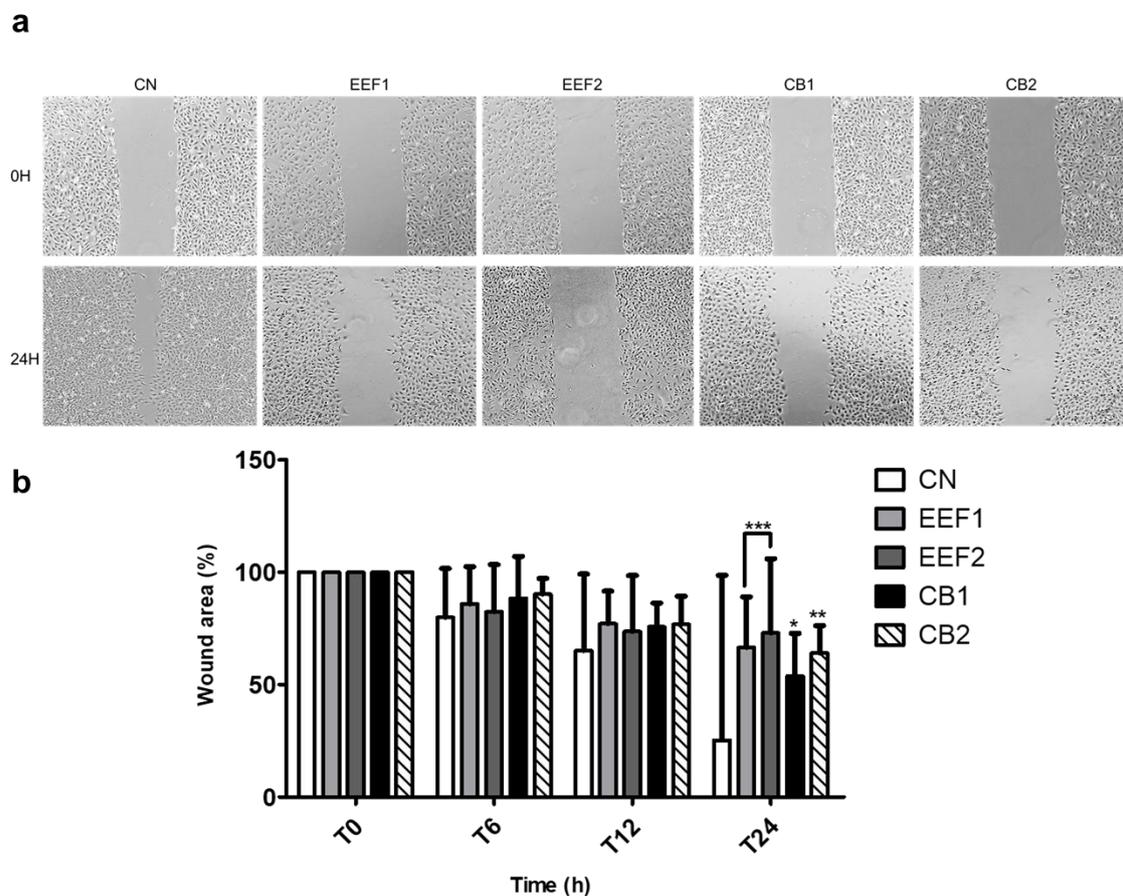
**Figura 09:** Migração celular induzida por EEF e CB na linhagem MRC-5. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = cucurbitacina B. A amostra CN = controle negativo, EEF1=17.625 ng/ml, EEF2=8.8125 ng/ml, CB1=3.95 ng/ml, CB2=1.975 ng/ml. **a)** Micrografia das células com o risco e **b)** Quantificação da área do risco. \* $p < 0.5$ .

Na linhagem AGP01 não foi observada diferença estatística ( $p > 0.05$ ) na migração de células após exposição à EEF1, EEF2, CB1 e à CB2 em relação ao controle negativo (figura 10). Também não foi verificada diferença ( $p > 0.05$ ) na migração de células expostas à mesma droga em concentrações diferentes, e nem na comparação entre extrato e CB.



**Figura 10:** Migração celular induzida por EEF e CB na linhagem AGP01. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = cucurbitacina B. A amostra CN = controle negativo, EEF1=2.45 ng/ml, EEF2=1.225 ng/ml, CB1=2.945 ng/ml, CB2=1.4725 ng/ml. **a)** Micrografia das células com o risco e **b)** Quantificação da área do risco.

Na linhagem ACP03 (figura 11) o EEF1 e o EEF2, em comparação ao controle negativo, inibiram atividade migratória significativamente no tempo de 24h ( $p < 0.001$ ). Também foi observado inibição significativa da atividade migratória das células no tempo de 24h para CB1 ( $p < 0.05$ ) e CB2 ( $p < 0.01$ ).



**Figura 11:** Migração celular induzida por EEF e CB na linhagem ACP03. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = cucurbitacina B. A amostra CN = controle negativo, EEF1=0.935 ng/ml, EEF2=0.4675 ng/ml, CB1=3.58 ng/ml, CB2=1.79 ng/ml. **a)** Micrografia das células com o risco e **b)** Quantificação da área do risco. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

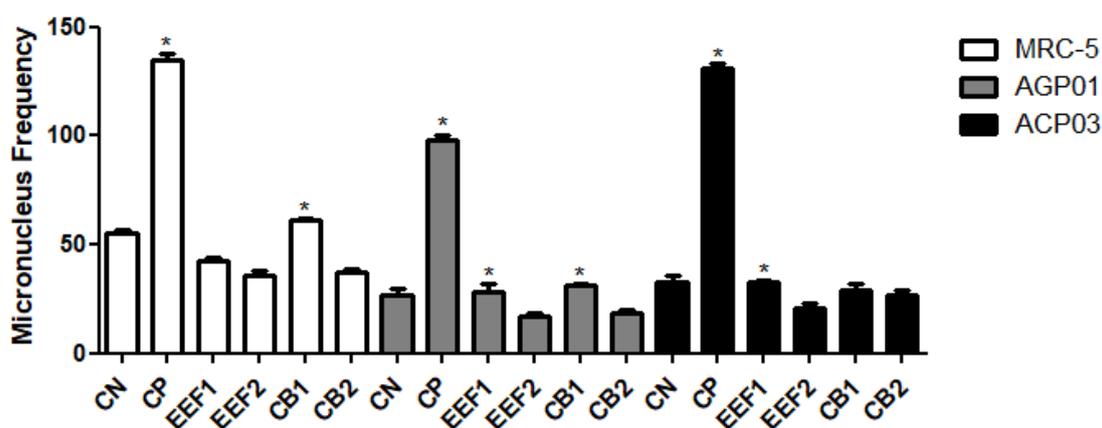
EEF1 provocou maior inibição ( $p < 0.001$ ) da migração de células das linhagens AGP01 e MRC-5 nos tempos de 12h e 24h em comparação a ACP03. EEF2 proporcionou maior inibição da migração de células da linhagem AGP01 nos

tempos de 12h ( $p < 0.001$ ) e 24h ( $p < 0.05$ ) em comparação a ACP03, já entre as linhagens ACP03 e MRC-5 observou-se maior inibição ( $p < 0.01$ ) na MRC-5 nos tempos de 6h e 12h.

CB1 induziu maior inibição da migração de células da linhagem AGP01 no tempo de 24h ( $p < 0.01$ ) em comparação a ACP03, já na MRC-5, promoveu grande inibição ( $p < 0.001$ ) da migração de células nos tempos de 12h e 24h, também em relação à ACP03. A análise dos resultados de CB2 mostrou que só houve diferença significativa na inibição de células MRC-5 nos tempos de 12h ( $p < 0.01$ ) e 24h ( $p < 0.001$ ) em comparação à ACP03.

## TESTE DE MICRONÚCLEO POR BLOQUEIO DE CITOCINESE

Nas três linhagens MRC-5, AGP01 e ACP03 houve diferença ( $p < 0.05$ ) entre os controles negativo e positivo, em que este último induziu maior número de micronúcleos (MN's) conforme o esperado (figura 12).



**Figura 12:** Frequência de micronúcleos observada nas três linhagens após exposição a diferentes concentrações de extrato e substância isolada. **Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto, CB = Cucurbitacina B. A amostra CN = Controle

Negativo, CP=Controle Positivo (Doxorrubicina 200.0 ng/ml). Para a linhagem MRC-5 as concentrações foram EEF1=17.625 ng/ml, EEF2=8.8125 ng/ml, CB1=3.95 ng/ml, CB2=1.975 ng/ml. Na linhagem AGP01 foram EEF1=2.45 ng/ml, EEF2=1.225 ng/ml, CB1=2.945 ng/ml, CB2=1.4725 ng/ml e para a linhagem ACP03, as concentrações foram EEF1=0.935 ng/ml, EEF2=0.4675 ng/ml, CB1=3.58 ng/ml, CB2=1.79 ng/ml. \* $p < 0.5$ .

Na MRC-5 o EEF1, EEF2 e CB2 induziram menor número ( $p < 0.01$ ) de micronúcleos que o encontrado no controle negativo (figura 12), porém CB1 apresentou mais micronúcleos que o controle negativo, mas não foi estatisticamente significativo ( $p > 0.05$ ). EEF1, EEF2, CB1 e CB2 induziram uma quantidade muito inferior de micronúcleo que o controle positivo ( $p < 0.001$ ). Ao comparar EEF1 com EEF2 não foi observada diferença significativa no número de micronúcleos, já CB1 e CB2 tiveram diferença significativa visto que o número de MN's nas células tratadas com CB1 foi maior ( $p < 0.001$ ). CB1 também mostrou maior indução de MN's que EEF1 ( $p < 0.001$ ).

EEF1, EEF2, CB1 e CB2 não apresentou diferença estatística ( $p > 0.05$ ) no número de MN's da linhagem AGP01, quando comparado ao controle negativo (figura 12). O controle positivo induziu a formação de uma quantidade muito grande ( $p < 0.001$ ) de MN's em relação aos EEF1, EEF2, CB1 e CB2. Observou-se uma relação dependente da concentração na resposta de indução de micronúcleos ( $p < 0.05$ ) entre EEF1 e EEF2, e entre CB1 e CB2.

Na linhagem ACP03 não foi observada diferença estatística ( $p > 0.05$ ) entre o controle negativo e EEF1, CB1 e CB2 (figura 12), no entanto, EEF2 induziu menos MN's que este controle ( $p < 0.05$ ). Verificou-se ainda que não foi apresentada

diferença estatística ( $p > 0.05$ ) na quantidade de MN's entre CB1 e CB2, quando comparados entre si. EEF1 gerou maior número de MN's ( $p < 0.05$ ) quando relacionado à EEF2, mostrando uma relação de aumento de MN's com o aumento de concentração. O controle positivo novamente induziu MN's de forma muito significativa ( $p > 0.001$ ) quando comparada com os resultados de EEF1, EEF2, CB1 e CB2.

EEF1 induziu mais micronúcleos na linhagem MRC-5 em comparação com AGP01 ( $p < 0.01$ ). Já EEF2 promoveu maior formação de micronúcleos na linhagem MRC-5 que nas linhagens ACP03 ( $p < 0.01$ ) e AGP01 ( $p < 0.001$ ). CB1 gerou mais micronúcleos na linhagem MRC-5 que nas linhagens ACP03 e AGP01 ( $p < 0.001$ ). CB2 induziu maior formação de micronúcleos na linhagem MRC-5 que na AGP01 ( $p < 0.001$ ).

Em relação ao Índice de Divisão Nuclear (IDN) das amostras (EEF1, EEF2, CB1 e CB2) nas três linhagens MRC-5, AGP01 e ACP03 (Supplementary Information, figure 01), foi observado que houve grande diferença significativa ( $p < 0.001$ ) entre os controles negativo e positivo. Nas três linhagens os IDN das amostras foram maiores que o controle positivo de forma significativa ( $p < 0.001$ ). Para MRC-5 em relação ao controle negativo, os valores dos IDN foram aproximados, porém ocorreu redução para CB1 ( $p < 0.01$ ) e aumento do índice em CB2 ( $p < 0.05$ ). Já na linhagem AGP01, verificou-se que o índice na amostra com EEF1 é menor quando comparado ao CN ( $p < 0.05$ ), e que na amostra com CB2 o índice aumentou em relação ao mesmo controle. Na outra linhagem de câncer (ACP03), a comparação de índices entre EEF1, EEF2, CB1 e CB2 com o CN resulta em valores estatisticamente menores que o índice do controle negativo ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSSÃO

O Extrato Etanólico do Fruto (EEF) e a cucurbitacina B (CB) foram obtidos do fruto de *Luffa operculata* e utilizados na investigação da citotoxicidade e seletividade entre células não neoplásicas e neoplásicas humanas. Os resultados (figura 01 e 02) indicaram EEF é mais citotóxico e seletivo nas linhagens de câncer que CB, e essa maior atividade biológica do extrato pode estar relacionada com possível efeito sinérgico entre as substâncias que o compõem, visto que extratos podem apresentar maior potencial de atividade biológica que seus componentes químicos isolados (Rasoanaivo et al., 2011). Estudos com extratos de *Luffa operculata* em células neoplásicas são escassos, no entanto, outras espécies de cucurbitáceas como a *Luffa echinata* e *Luffa cylindrica* foram avaliadas em diferentes tipos de modelos de neoplasias (Shang et al., 2016; Abdel-Salam, Awadein e Ashour, 2019; Abdel-Salam, Abou-Bakr e Ashour, 2019; Yehia et al., 2020). Esses estudos corroboram com os resultados da presente pesquisa, pois apresentaram alta citotoxicidade em células de câncer.

EEF e CB induziram de forma significativa ( $p < 0.05$ ) a morte por apoptose das linhagens estudadas (Figure 4) e uma hipótese que pode corroborar com esse resultado é de que a cucurbitacina B regula negativamente a sinalização JAK2 / STAT3, inibindo essa via de sinalização conforme observado em outros estudos (Zhang et al., 2014; Zheng et al., 2014; Xie et al., 2016; Zhang et al., 2017; Xu et al., 2020). Essa via também pode estar associada a regulação das proteínas mitocondriais que desencadeiam a via apoptótica (Bax, Bad e caspases clivadas) (Zhang et al., 2017), e com isso contribuindo para a inibição de proliferação celular

e a indução de apoptose por ação de EEF e CB. Também é importante destacar que MYC é um dos alvos a jusante da via JAK / STAT, logo, a inibição dessa via pode contribuir com a diminuição da expressão de mRNA de MYC como observado em Xu et al., (2020) por intermédio do tratamento com CB em células de câncer gástrico.

O aumento de expressão de MYC frequentemente está relacionado a tumores malignos sólidos (Mastronikolis et al., 2019), logo, a diminuição da sua expressão em células de câncer representa uma potencial via terapêutica para o câncer, tal fenômeno foi observado neste estudo, visto que tanto a CB, quanto o EEF induziram a diminuição da expressão de MYC na linhagem ACP03 quando comparada a linhagem MRC-5. Este resultado sugere que a quantidade de CB presente no EEF foi suficiente para ocasionar o mesmo efeito nos modelos celulares.

Um estudo de docking pôde prever que CB tem capacidade de interferir na fosforilação de JAK1 e JAK2 que estão envolvidas na ativação da via JAK / STAT responsável pela fosforilação de STAT3 (Galucio et al., 2022), e uma possível via envolvida no aumento de expressão de MYC no câncer é o aumento da ativação de STAT3 (Hadjidaniel et al., 2017).

A capacidade de atuar na redução da expressão de MYC é um achado muito promissor visto que este MYC é responsável pela regulação de vários genes envolvidos na coordenação do crescimento e proliferação celular e a sua amplificação é observada em praticamente todos os tipos de câncer (Kalkat et al., 2017). A possibilidade de um extrato natural impactar na expressão de um

oncogene tão relevante, traz luz a perspectivas terapêuticas com fitoterápico para diversos cânceres humanos.

Na linhagem ACP03, além de ocorrer a diminuição de MYC, houve aumento na expressão de BCL2 quando exposta a CB, porém, sabe-se que a expressão do gene BCL2 não implica obrigatoriamente no funcionamento da via antiapoptótica visto que a atuação da proteína desse gene depende da fosforilação ativada por agonistas, como por exemplo, os agonistas quinases PKC $\alpha$ , p44 MAPK/ERK1, p42 MAPK/ERK2 e JNKs; estes agonistas podem promover a fosforilação de BCL2 em vários locais no domínio de alça flexível (FLD), como na treonina 69, na serina 70 e na serina 87. Percebe-se que a expressão do gene BCL2 em amostras de cânceres pode não estar diretamente relacionada com um pior prognóstico para todos os tipos de tumores ou resistência a terapias anticâncer (Ruvolo; Deng; May, 2001; Zhou et al., 2017), e no presente estudo o aumento da expressão desse gene não impactou na redução da morte celular conforme resultados obtidos pelos ensaios de MTT e de apoptose.

A análise da expressão de CCND1 não evidenciou alterações estatisticamente significante nessas linhagens estudadas, e apesar da regulação positiva desse gene estar relacionada a vários tipos de câncer, os resultados do presente estudo não evidenciaram que CB e EEF modulam a expressão desse gene, assim, pode-se inferir que as vias de regulação proliferativa, diante das concentrações utilizadas neste estudo, não impactaram diretamente na expressão deste efector. O estudo de Xie et al. (2016) detectou que a CB induziu redução da expressão de CCND1 porém, para isso, utilizou concentração maior de CB que o estudo atual.

A linhagem AGP01 apresentou resultados significantes no ciclo celular ( $p < 0.05$ ) ao evidenciar maior influência tanto de EEF como de CB na dinâmica do ciclo, visto que ambos induziram o aumento do percentual de células na fase G2/M do ciclo, principalmente em amostras expostas a CB. Já nas células ACP03, comparando as amostras EEF1 e CB1, esta última teve maior quantidade de células em G2/M ( $p < 0.05$ ). Esses resultados corroboram com os de Zhu et al. (2012), Guo et al. (2014), Wang et al. (2017), Jin et al. (2018), Zhou et al. (2019), que avaliaram a influência de cucurbitacina B no ciclo celular em diferentes células neoplásicas. O estudo de Kausar et al. (2013) sugere que CB altera os níveis de várias proteínas celulares, por exemplo ERK e STAT3, para induzir a parada G2 / M.

CB e EEF provocaram redução de EPCAM em AGP01 e essa redução está relacionado a um ponto positivo, visto que a superexpressão de EPCAM pode ser associada à metástase e tumores maiores, logo, a um pior prognóstico no câncer gástrico (DAI et al., 2017). Essa redução de EPCAM foi observada ACP03 porém de maneira não significativa ( $p > 0.05$ ). Uma possibilidade para essa diferença pode estar relacionada a presença de trissomia do cromossomo 2 (locus do EPCAM) observada somente nas células AGP01, (Leal, 2009) o que poderia influenciar em uma maior expressão basal, e assim refletir em um maior impacto de um agente redutor da expressão deste alvo.

Em relação a avaliação da atividade migratória das células das linhagens expostas a EEF e CB, a ACP03 foi a que apresentou inibição da atividade migratória de forma significativa ( $p < 0.05$ ) ao final do experimento (após 24h de análise).

Importante ressaltar que essa linhagem foi a única das três que apresentou redução da expressão de MYC após exposição a EEF e CB. O estudo de Liu et al. (2019) sugere que a protease específica da ubiquitina 22 (USP22) está associada a progressão do câncer gástrico, de forma que a diminuição de USP22 diminui a migração e invasividade do câncer gástrico visto que USP22 modula as vias de sinalização FOXO1 e YAP dependentes de c-Myc / NAMPT / SIRT1. Logo, o estudo alega que a diminuição de USP22 está relacionada com a diminuição de c-Myc / NAMPT / SIRT1.

EEF e CB não promoveram aumento significativo ( $p < 0.05$ ) das frequências de micronúcleos nas linhagens de câncer e na linhagem não neoplásica, em relação ao controle negativo, logo, não foi observada genotoxicidade de EEF e CB nas condições testadas. Observou-se a diminuição de IDN nas células expostas a EEF e CB, principalmente na linhagem ACP03 ( $p < 0.05$ ) e esse resultado corroborou com a diminuição da proliferação celular. Conforme dito anteriormente, CB está relacionada a inibição de STAT3 (Zhang et al., 2014) e o estudo de Ferraz et al. (2017) mostrou que um outro inibidor de STAT3 também não induziu genotoxicidade, todavia promoveu a apoptose, inclusive devido a esse resultado, foi considerado promissor para novos estudos que avaliassem o tratamento no câncer. Esses resultados nos fornecem alguma perspectiva sobre segurança do uso desses agentes como quimioterápicos de uso humano.

## CONCLUSÃO

Extrato Etanólico do Fruto (EEF) de *Luffa operculata* e a cucurbitacina B (isolada desse extrato) promoveram alta citotoxicidade nas linhagens de câncer

gástrico com destaque para alta seletividade de EEF na ACP03. EEF e CB promoveram alterações fenotípicas importantes ao reduzir a expressão de MYC na ACP03, que foram observadas no elevado índice de morte por apoptose promovido nas linhagens estudadas, assim como o fato de ter sido evidenciado que a cucurbitacina promove o aumento de células em G2/M no ciclo celular. Sugere-se que CB, componente majoritário de EEF, atua como inibidor de STAT3, e que a inibição dessa via está associada a diminuição da expressão de MYC, o que impacta na redução da progressão celular e principalmente na baixa sobrevivência das células neoplásicas. Outros aspectos fenotípicos interessantes, foram a inibição da atividade migratória das células e a diminuição de IDN observada em ACP03, reforçando um papel antineoplásico desses agentes. Apesar de EEF e CB induzirem elevada citotoxicidade, não foi observada indução de genotoxicidade. Considerando estes achados, o estudo corroborou com a validação da importância das cucurbitacinas no tratamento do câncer e permitiu entender que o extrato de *L. operculata* é tão promissor quanto CB e mais seletivo para as linhagens de câncer gástrico estudadas. Os resultados favoráveis dessa pesquisa trazem evidências claras de que novos estudos moleculares e conduzidos *in vivo* devem ser encorajados para contribuir com o tratamento do câncer.

## **METODOLOGIA**

### **Cultura Celular**

A linhagem celular de Adenocarcinoma Gástrico Primário (ACP03) foi estabelecida da amostra de um tumor removido da região do antro do estômago; já a linhagem AGP01 foi estabelecida a partir do líquido ascítico do adenocarcinoma gástrico que estava na região do antro e corpo do estômago; estas linhagens foram estabelecidas a partir de pacientes oncológicos do norte do Brasil (Leal, 2009).

Também foi utilizada a linhagem normal humana MRC-5. ACP03 e AGP01 foram cedidas pelo grupo de pesquisa associado ao Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará. As três linhagens foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Dulbecco/F12 Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) suplementado com 10% de SBF (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), e penicilina (60 µg/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) em uma atmosfera umidificada a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24-48 h de incubação as células em fase de crescimento logarítmico, as células foram observadas em microscópio invertido foram removidas da garrafa de cultura 75 cm<sup>2</sup> (kasvi, BRA) usando 0,25% de tripsina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA). Utilizou-se as mesmas condições de cultivo celular para todos os experimentos in vitro a seguir.

### **Aquisição dos extratos e substância isolada**

O extrato etanólico foi obtido a partir dos frutos e sementes de *Luffa operculata* que foram coletados no município de Soure-PA (0°72'68" S e 48°50'92" W) no mês de agosto de 2016. A identificação botânica foi realizada mediante depósito de uma amostra testemunho no herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA sob o registro IAN194413. O extrato foi obtido dos frutos de *L. operculata*, macerados com EtOH:H<sub>2</sub>O 70% (Etanol:água, v/v; Dinâmica, BRA) e após o período de maceração as soluções foram filtradas e evaporadas à pressão reduzida de onde obteve-se o Extrato Etanólico do Fruto (EEF). O perfil cromatográfico do extrato dos frutos, o fracionamento do EEF para isolamento do marcador farmacológico (cucurbitacina B - CB), assim como a identificação química deste marcador foram descritos em Galucio et al. (2022).

### **Cell viability assay**

A citotoxicidade foi avaliada nas linhagens MRC-5, AGP01 e ACP03 e foi determinada pelo o ensaio colorimétrico do MTT (Mosmann, 1983). Avaliou-se concentrações inibitórias de EEF e CB que diminuíram em 50% a viabilidade celular (Índice de Citotoxicidade - IC<sub>50%</sub>) nos tempos de 24, 48 e 72 h (1 x 10<sup>4</sup>, 0.6 x 10<sup>4</sup>, 0.3 x 10<sup>4</sup> células por poço, respectivamente). Utilizou-se MTT (Gibco, Thermo

Fisher Scientific, USA) na concentração de 500 µg/mL e os cristais formados foram dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, DE) e depois de 1 h. As absorbâncias das amostras foram medidas em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços SpectraMax i3 (Molecular Devices, USA), utilizando um comprimento de onda de referência de 570 nm.

### **Selectivity Index (SI)**

Para o cálculo do Índice de Seletividade (IS) foi realizada a divisão da IC<sub>50%</sub> da MRC-5 pela IC<sub>50%</sub> da AGP01 e ACP03. Considera-se IS relevante a partir do índice três (Bézivin, et al., 2003).

### **qRT-PCR**

Preparo das amostras para extração de RNA e síntese de cDNA

Para extração do RNA total utilizou-se um cultivo de 25 x 10<sup>4</sup> de células por poço, e cada linhagem (MRC-5, AGP01 e ACP03) teve exposição de ½ IC<sub>50</sub> do EEF e da CB por 48h. A extração foi realizada com o reagente TRIzol™ (Invitrogen Life Technologies, USA) conforme o protocolo do fabricante. A pureza das amostras foi determinada pelas razões de absorbância A<sub>260/280</sub> nm e A<sub>260/230</sub> nm. As concentrações de RNA e as razões de absorbância foram medidas espectrofotometricamente com um leitor de microplaca SpectraMax i3 (Molecular Devices, USA). Para a reação de síntese de cDNA foi utilizado GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega Corporation, USA), obedecendo o protocolo do fabricante, e o cDNA foi armazenado a -20 °C.

### **Primer design and qRT-PCR analysis**

As sequências foram retiradas dos autores descritos no quadro 01 e a análise *in silico* das sequências foi realizada através do Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e do AutoDimer software (<https://www-s.nist.gov/dnaAnalysis/>). Todos os genes foram amplificados a partir do cDNA. Para as reações de qPCR foi utilizado GoTaq® qPCR Master Mix baseado em BRYT-Green (Promega Corporation, USA) em Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, USA) com as seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min, seguido de uma curva de

dissociação a 95 °C por 15 seg, 55 °C por 15 seg e 95 ° C por 15 seg para verificar a especificidade da amplificação por PCR. As reações foram realizadas em triplicata e conforme com as instruções do fabricante. Três genes de referência (GAPDH, ACTB e SOD2) foram selecionados para este estudo e para analisar a estabilidade da expressão do gene de referência em todos os conjuntos experimentais foi usado o suplemento do Excel de normFinder v0.953 (Wan et al., 2011). A expressão relativa dos alvos nas amostras foi calculada usando o método Ct comparativo (Livak & Schmittgen, 2001).

Quadro 01: Sequências dos primers utilizados na qRT-PCR analysis

Gene	Primer sequences (5' - 3')	Product size (bp)	Reference
GAPDH	F - TCAGTGGTGGACCTGACCTG R - TGCTGTAGCCAAATTCGTTG	348	Casseb et al., 2016
ACTB	F - AGCGGGAAATCGTGCGTG R - CAGGGTACATGGTGGTGCC	309	Wang et al., 2011
SOD2	F - GGGAGATGTTACAGCCCAGA R - CTGATTTGGACAAGCAGCAA	277	Huang et al., 2011
EPCAM	F - TGTGGTTGTGGTGATAGCAGTT R - CCCATCTCCTTTATCTCAGCCTTC	102	Sadeghi et al., 2017
MYC	F - CAGCTGCTTAGACGCTGGATT R - GTAGAAATACGGCTGCACCGA	128	Sos et al., 2012
BCL2	F - TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG R - GGTGCCGGTTCAGGTA CT CAGTCA	114	Khodapasand et al., 2015
CCND1	F - ACAAACAGATCATCCGCAAACAC R - TGTTGGGGCTCCTCAGGTTTC	144	Huang et al., 2017

### **Análise morfológica para detecção de apoptose e necrose por meio de corantes fluorescentes**

As linhagens MRC-5, AGP01 e ACP03 foram cultivadas em densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço, por 24 h. Após o cultivo, as células foram tratadas com  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> e  $\frac{1}{4}$

IC<sub>50</sub> de 48h do EEF e da CB. Após 24 h de tratamento, o material foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, e o pellet ressuspendido foi corado com mix dos corantes 1:1 v/v com Laranja de Acridina (LA; 100 µg/mL; Sigma-Aldrich, Merck, DE) e Brometo de Etídio (BE; 100 µg/mL; Sigma-Aldrich, Merck, DE). Para a análise foram confeccionadas lâminas e analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager M2 utilizando aumento de 400X. As porcentagens de células viáveis, necróticas e apoptóticas foram calculadas pela contagem de 300 células por grupo de amostra a partir de três experimentos independentes conforme McGahon et al. (1995), com adaptações.

### **Avaliação da cinética do Ciclo Celular**

Os três tipos celulares foram cultivados em densidade de  $1 \times 10^6$  células/poço, por 24h e depois foram tratadas com  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> e  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> de 48h do EEF e da CB. As células foram analisadas e contadas por citômetro de fluxo BD FACSVerser<sup>TM</sup> e fixadas com etanol 70% (Merck, DE), incubadas com uma solução contendo Pure Link TM RNase A (100 µg/mL; Thermo Fisher Scientific, USA), posteriormente foram coradas com Iodeto de Propídeo (50 µg/mL; Molecular probes Life, Thermo Fisher Scientific, USA). Dez mil eventos foram analisados no citômetro de fluxo para avaliar a porcentagem de células em G0/G1, S, G2/M (Institute of Cell and Molecular Science, 2018).

### **Wound healing assay**

As células das linhagens ACP03, AGP01 e MRC-5 foram semeadas em densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço e cultivadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5 % por 24h, após esse tempo de cultivo foi realizado o “arranhão” no centro de cada poço da placa, e as células foram tratadas com  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> e  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> de 48h do EEF e da CB, conforme adaptação de Liang et al. (2007). O comportamento das células foi observado e fotografado nos tempos de 0, 6, 12 e 24 h, a partir de três experimentos independentes. Nas imagens obtidas realizou-se a medida da distância das bordas do arranhão com o programa Image J (software 1.48q, Rayne Rasband, National Institutes of Health, USA) e o valor da área de três experimentos independentes foram analisados estatisticamente conforme Almeida et al. (2020; adaptado).

### **Técnica de Micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)**

As linhagens foram semeadas em densidade de  $4 \times 10^5$  células/poço e após o cultivo, as células foram tratadas, por 24h, com  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> e  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> de 48h do EEF e da CB e utilizamos o controle positivo (CP) doxorrubicina (0,2 ug/mL; Sigma-Aldrich, Merck, DE) devido sua conhecida ação genotóxica. Adicionou-se citocalasina-B (3 ug/mL; Sigma-Aldrich, Merck, DE) e após 28h as células foram tratadas com solução hipotônica de citrato de sódio 1% (Dinâmica, BRA) e fixadas com metanol (Merck, DE) e ácido acético (Merck, DE) na proporção de 5:1 v/v, mais formaldeído 37% (Merck, DE), e posteriormente com metanol e ácido acético na proporção de 3:1 v/v. Depois da fixação as lâminas foram coradas com Giemsa 5% (Merck, DE) conforme Fenech & Morley (1985). A análise de diversos parâmetros como o micronúcleo convencional e o Índice de Divisão Nuclear (IDN)

foi realizada em microscópio óptico de luz em aumento de 1000X (FENECH, 2000; GONTIJO & TICE, 2003).

### **Análise Estatística**

Todos os testes foram realizados em triplicata em experimentos independentes. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados utilizando-se curvas de dose-resposta a partir de regressão não-linear seguida por Teste de Tukey. O teste do micronúcleo foi analisado por ANOVA seguido do teste de Tukey para as comparações múltiplas, com nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ). Os dados dos demais ensaios foram analisados por ANOVA, seguido por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ). As análises foram realizadas por intermédio do programa GraphPad Prism 6.0<sup>®</sup>. Os valores de p inferior ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

### **REFERENCES**

- Abdel-Salam, I. M., Abou-Bakr, A. A., & Ashour, M. (2019). Cytotoxic effect of aqueous ethanolic extract of *Luffa cylindrica* leaves on cancer stem cells CD44+/24- in breast cancer patients with various molecular sub-types using tissue samples in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, 238, 111877. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111877>
- Abdel-Salam, I. M., Awadein, N. E., & Ashour, M. (2019). Cytotoxicity of *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem. extract against circulating cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Journal of ethnopharmacology*, 229, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.034>
- Almeida, V. M., Bezerra, M. A., Nascimento, J. C., & Amorim, L. M. F. (2020). Anticancer drug screening: Standardization of in vitro wound healing assay. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 55, 606-619. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190054>.

Alves, C., Frias, H. V., Kirsten, T. B., Cordeiro, F., Bernardi, M. M., & Suffredini, I. B. (2018). *Luffa operculata* fruit aqueous extract induces motor impairments, anxiety-like behavior, and testis damage in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 222, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.044>

Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 10(6-7), 499–503. <https://doi.org/10.1078/0944711103322331458>

Casseb, S. M., Simith, D. B., Melo, K. F., Mendonça, M. H., Santos, A. C., Carvalho, V. L., Cruz, A. C., & Vasconcelos, P. F. (2016). Drosha, DGCR8, and Dicer mRNAs are down-regulated in human cells infected with dengue virus 4, and play a role in viral pathogenesis. *Genetics and molecular research : GMR*, 15(2), 10.4238/gmr.15027891. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027891>

Cheng, H., Wang, X., Li, T., & Chen, L. (2015). Bcl-2 expression and patient survival in gastric cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 32(1), 389. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0389-6>

Dai, M., Yuan, F., Fu, C., Shen, G., Hu, S., & Shen, G. (2017). Relationship between epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression and gastric cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 12(4), e0175357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175357>

Dandawate, P., Subramaniam, D., Panovich, P., Standing, D., Krishnamachary, B., Kaushik, G., Thomas, S. M., Dhar, A., Weir, S. J., Jensen, R. A., & Anant, S. (2020). Cucurbitacin B and I inhibits colon cancer growth by targeting the Notch signaling pathway. *Scientific reports*, 10(1), 1290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57940-9>

Díaz Del Arco, C., Ortega Medina, L., Estrada Muñoz, L., García Gómez de Las Heras, S., & Fernández Aceñero, M. J. (2021). Is there still a place for conventional histopathology in the age of molecular medicine? Laurén classification, inflammatory infiltration and other current topics in gastric cancer diagnosis and prognosis. *Histology and histopathology*, 36(6), 587–613. <https://doi.org/10.14670/HH-18-309>

Dittharot, K., Dakeng, S., Suebsakwong, P., Suksamrarn, A., Patmasiriwat, P., & Promkan, M. (2019). Cucurbitacin B Induces Hypermethylation of Oncogenes in Breast Cancer Cells. *Planta medica*, 85(5), 370–378. <https://doi.org/10.1055/a-0791-1591>

Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*, 455(1-2), 81–95. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00065-8)

Fenech, M., & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation research*, 147(1-2), 29–36. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9)

Ferraz, E. R., Fernandes, A. S., Salviano, I., Felzenszwalb, I., & Mencialha, A. L. (2017). Investigation of the mutagenic and genotoxic activities of LLL-3, a STAT3 inhibitor. *Drug and chemical toxicology*, 40(1), 30–35. <https://doi.org/10.3109/01480545.2016.1167901>

Galucio, N. C. R.; Moysés, D. A.; Pina, J. R. S.; Marinho, P. S. B.; Gomes Júnior, P. C.; Cruz, J. N.; Vale, V. V.; Khayat, A. S.; Marinho, A. M. R. (2022). Antiproliferative, genotoxic activities and quantification of extracts and cucurbitacin B obtained from *Luffa operculata* (L.) Cogn. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(2), 103589. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103589>

Garg, S., Kaul, S. C., & Wadhwa, R. (2018). Cucurbitacin B and cancer intervention: Chemistry, biology and mechanisms (Review). *International journal of oncology*, 52(1), 19–37. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4203>

Gontijo, A. M. M. C.; Tice, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*. 1ª edição. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 247-279.

Guo, J., Wu, G., Bao, J., Hao, W., Lu, J., & Chen, X. (2014). Cucurbitacin B induced ATM-mediated DNA damage causes G2/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner. *PloS one*, 9(2), e88140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088140>

Hadjidaniel, M. D., Muthugounder, S., Hung, L. T., Sheard, M. A., Shirinbak, S., Chan, R. Y., Nakata, R., Borriello, L., Malvar, J., Kennedy, R. J., Iwakura, H., Akamizu, T., Sposto, R., Shimada, H., DeClerck, Y. A., & Asgharzadeh, S. (2017). Tumor-associated macrophages promote neuroblastoma via STAT3 phosphorylation and up-regulation of c-MYC. *Oncotarget*, 8(53), 91516–91529. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21066>

Heinrich, M. (2014). Ethnopharmacology: quo vadis? Challenges for the future. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 99-102. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2013.11.019>

Huang, H., Han, Y., Yang, X., Li, M., Zhu, R., Hu, J., Zhang, X., Wei, R., Li, K., & Gao, R. (2017). HNRNPK inhibits gastric cancer cell proliferation through p53/p21/CCND1 pathway. *Oncotarget*, 8(61), 103364–103374. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21873>

Huang, L., Yang, Y., Yang, F., Liu, S., Zhu, Z., Lei, Z., & Guo, J. (2018). Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *International journal of molecular medicine*, 42(4), 1771–1785. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3764>

Huang, L., Zheng, M., Zhou, Q. M., Zhang, M. Y., Jia, W. H., Yun, J. P., & Wang, H. Y. (2011). Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer*, 117(15), 3363–3373. <https://doi.org/10.1002/cncr.25870>

Hunsakunachai, N., Nuengchamnong, N., Jiratchariyakul, W., Kummalue, T., & Khemawoot, P. (2019). Pharmacokinetics of cucurbitacin B from *Trichosanthes cucumerina* L. in rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2568-7>

Institute of Cell and Molecular Science, The Blizzard Building, Barts and The London School of Medicine and Dentistry. Cell Cycle Tutorial. Disponível em: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/flowcytometry/guides/Cell%20Cycle%20Tutorial.pdf>

Jin, Z. Q., Hao, J., Yang, X., He, J. H., Liang, J., Yuan, J. W., Mao, Y., Liu, D., Cao, R., Wu, X. Z., Li, X., & Chen, D. (2018). Higenamine enhances the antitumor effects of cucurbitacin B in breast cancer by inhibiting the interaction of AKT and CDK2. *Oncology reports*, 40(4), 2127–2136. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6629>

Kalkat, M., De Melo, J., Hickman, K. A., Lourenco, C., Redel, C., Resetca, D., Tamachi, A., Tu, W. B., & Penn, L. Z. (2017). MYC Deregulation in Primary Human Cancers. *Genes*, 8(6), 151. <https://doi.org/10.3390/genes8060151>

Kausar, H., Munagala, R., Bansal, S. S., Aqil, F., Vadhanam, M. V., & Gupta, R. C. (2013). Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: identification of intracellular thiols as critical targets. *Cancer letters*, 332(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.008>

Kawahara, N., Kurata, A., Hakamatsuka, T., Sekita, S., & Satake, M. (2001). Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and their effect on PEBP2 $\alpha$ A and OCIF gene expression in a human osteoblast-like Saos-2 cell line. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 49(10), 1377–1379. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.1377>

Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B., & Houshmand, M. (2015). Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer?. *Iranian biomedical journal*, 19(2), 69–75. <https://doi.org/10.6091/ibj.1366.2015>

Klungsaeng, S., Kukongviriyapan, V., Prawan, A., Kongpetch, S., & Senggunprai, L. (2019). Cucurbitacin B induces mitochondrial-mediated apoptosis pathway in cholangiocarcinoma cells via suppressing focal adhesion kinase signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 392(3), 271–278. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1584-3>

- Kurman, Y., Kiliccioglu, I., Dikmen, A. U., Esendagli, G., Bilen, C. Y., Sozen, S., & Konac, E. (2020). Cucurbitacin B and cisplatin induce the cell death pathways in MB49 mouse bladder cancer model. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 245(9), 805–814. <https://doi.org/10.1177/1535370220917367>
- Leal, M. F., Martins do Nascimento, J. L., da Silva, C. E., Vita Lamarão, M. F., Calcagno, D. Q., Khayat, A. S., Assumpção, P. P., Cabral, I. R., de Arruda Cardoso Smith, M., & Burbano, R. R. (2009). Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. *Cancer genetics and cytogenetics*, 195(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2009.04.020>
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Liu, H., Liu, N., Zhao, Y., Zhu, X., Wang, C., Liu, Q., Gao, C., Zhao, X., & Li, J. (2019). Oncogenic USP22 supports gastric cancer growth and metastasis by activating c-Myc/NAMPT/SIRT1-dependent FOXO1 and YAP signaling. *Aging*, 11(21), 9643–9660. <https://doi.org/10.18632/aging.102410>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luo, W. W., Zhao, W. W., Lu, J. J., Wang, Y. T., & Chen, X. P. (2018). Cucurbitacin B suppresses metastasis mediated by reactive oxygen species (ROS) via focal adhesion kinase (FAK) in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Chinese journal of natural medicines*, 16(1), 10–19. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30025-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30025-6)
- Mastronikolis, N., Ragos, V., Kyrodimos, E., Chrysovergis, A., Papanikolaou, V., Mastronikolis, S., Stamatelopoulos, A., & Tsiambas, E. (2019). Mechanisms of C-myc oncogenic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 24(6), 2242–2244. PMID: 31983089
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K., & Green, D. R. (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods in cell biology*, 46, 153–185. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61929-9](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61929-9)
- Menon-Miyake, M. A., Carvalho de Oliveira, R., Lorenzi-Filho, G., Saldiva, P. H., & Butugan, O. (2005). Luffa operculata affects mucociliary function of the isolated frog palate. *American journal of rhinology*, 19(4), 353–357. <https://doi.org/10.1177/194589240501900406>

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Ranjan, A., Ramachandran, S., Gupta, N., Kaushik, I., Wright, S., Srivastava, S., Das, H., Srivastava, S., Prasad, S., & Srivastava, S. K. (2019). Role of Phytochemicals in Cancer Prevention. *International journal of molecular sciences*, 20(20), 4981. <https://doi.org/10.3390/ijms20204981>

Rasoanaivo, P., Wright, C. W., Willcox, M. L., & Gilbert, B. (2011). Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malaria journal*, 10 Suppl 1(Suppl 1), S4. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S4>

Ruvolo, P. P.; Deng, X.; May, W. S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, 15(4), 515–522. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402090>

Sadeghi, S., Hojati, Z., & Tabatabaeian, H. (2017). Cooverexpression of EpCAM and c-myc genes in malignant breast tumours. *Journal of genetics*, 96(1), 109–118. <https://doi.org/10.1007/s12041-017-0748-0>

Sallam, A. M., Esmat, A., & Abdel-Naim, A. B. (2018). Cucurbitacin-B attenuates CCl4 -induced hepatic fibrosis in mice through inhibition of STAT-3. *Chemical biology & drug design*, 91(4), 933–941. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13160>

Shang, L. H., Yu, Y., Che, D. H., Pan, B., Jin, S., & Zou, X. L. (2016). *Luffa echinata* Roxb. Induced Apoptosis in Human Colon Cancer Cell (SW-480) in the Caspase-dependent Manner and Through a Mitochondrial Apoptosis Pathway. *Pharmacognosy magazine*, 12(45), 25–30. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.176017>

Smyth, E. C., Nilsson, M., Grabsch, H. I., van Grieken, N. C., & Lordick, F. (2020). Gastric cancer. *Lancet (London, England)*, 396(10251), 635–648. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31288-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31288-5)

Sos, M. L., Dietlein, F., Peifer, M., Schöttle, J., Balke-Want, H., Müller, C., Koker, M., Richters, A., Heynck, S., Malchers, F., Heuckmann, J. M., Seidel, D., Evers, P. A., Ullrich, R. T., Antonchick, A. P., Vintonyak, V. V., Schneider, P. M., Ninomiya, T., Waldmann, H., Büttner, R., ... Thomas, R. K. (2012). A framework for identification of actionable cancer genome dependencies in small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(42), 17034–17039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207310109>

Wan, H., Yuan, W., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., Li, Z., Zhou, G., Yao, Z., Zhao, J., Liu, S., & Yang, Y. (2011). Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.).

Biochemical and biophysical research communications, 416(1-2), 24–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.105>

Wang, M. F., Liao, Y. F., Hung, Y. C., Lin, C. L., Hour, T. C., Lue, K. H., Hung, H. C., & Liu, G. Y. (2011). Hydroxydibenzoylmethane induces apoptosis through repressing ornithine decarboxylase in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Experimental & molecular medicine*, 43(4), 189–196.  
<https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.4.023>

Wang, X., Tanaka, M., Peixoto, H. S., & Wink, M. (2017). Cucurbitacins: elucidation of their interactions with the cytoskeleton. *PeerJ*, 5, e3357.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.3357>

WHO - World Health Organization. Cancer. Disponível em: <<http://https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acessado em: 24 de abril de 2022.

Xie, Y. L., Tao, W. H., Yang, T. X., & Qiao, J. G. (2016). Anticancer effect of cucurbitacin B on MKN-45 cells via inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(4), 2709–2715.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2016.3670>

Xu, J., Chen, Y., Yang, R., Zhou, T., Ke, W., Si, Y., Yang, S., Zhang, T., Liu, X., Zhang, L., Xiang, K., Guo, Y., & Liu, Y. (2020). Cucurbitacin B inhibits gastric cancer progression by suppressing STAT3 activity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 684, 108314. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108314>

Yehia, S., Abdel-Salam, I. M., Elgamal, B. M., El-Agamy, B., Hamdy, G. M., & Aldouski, H. M. (2020). Cytotoxic and Apoptotic Effects of Luffa Cylindrica Leaves Extract against Acute Lymphoblastic Leukemic Stem Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 21(12), 3661–3668.  
<https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.12.3661>

Yoshida G. J. (2018). Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 37(1), 173.  
<https://doi.org/10.1186/s13046-018-0835-y>

Zhang, M., Bian, ZG, Zhang, Y., Wang, JH, Kan, L., Wang, X., Niu, HY, & He, P. (2014). A Cucurbitacina B inibe a proliferação e induz a apoptose por meio da inibição da via STAT3 em células A549 de câncer de pulmão. *Molecular medicine reports*, 10 (6), 2905–2911. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2581>

Zhang, Y., Zeng, X., Lu, H., Ji, H., Zhao, E., & Li, Y. (2016). Association between cyclin D1 (CCND1) G870A polymorphism and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget*, 7(40), 66109–66118. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11848>

Zhang, Z. R., Gao, M. X., & Yang, K. (2017). Cucurbitacin B inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma cells via modulation of the JAK2/STAT3 and MAPK pathways. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(1), 805–812. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4547>

Zheng H. C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950–59964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048>

Zheng, Q., Liu, Y., Liu, W., Ma, F., Zhou, Y., Chen, M. ... He, G. (2014). Cucurbitacin B inhibits growth and induces apoptosis through the JAK2/STAT3 and MAPK pathways in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 10, 89-94. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2175>

Zhou, J., Liu, M., Chen, Y., Xu, S., Guo, Y., & Zhao, L. (2019). Cucurbitacin B suppresses proliferation of pancreatic cancer cells by ceRNA: Effect of miR-146b-5p and lncRNA-AFAP1-AS1. *Journal of cellular physiology*, 234(4), 4655–4667. <https://doi.org/10.1002/jcp.27264>

Zhou, M.; Zhang, Q.; Zhao, J.; Liao, M.; Wen, S.; Yang, M. (2017). Phosphorylation of Bcl-2 plays an important role in glycochenodeoxycholate-induced survival and chemoresistance in HCC. *Oncology reports*, 38(3), 1742–1750. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5830>

Zhu, J. S., Ouyang, D. Y., Shi, Z. J., Xu, L. H., Zhang, Y. T., & He, X. H. (2012). Cucurbitacin B induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy associated with G actin reduction and persistent activation of cofilin in Jurkat cells. *Pharmacology*, 89(5-6). <https://doi.org/10.1159/000338757>

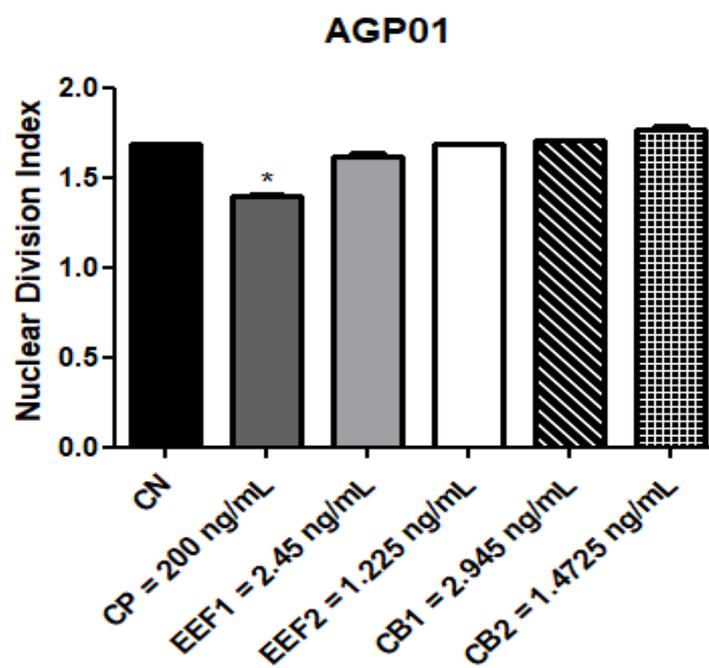
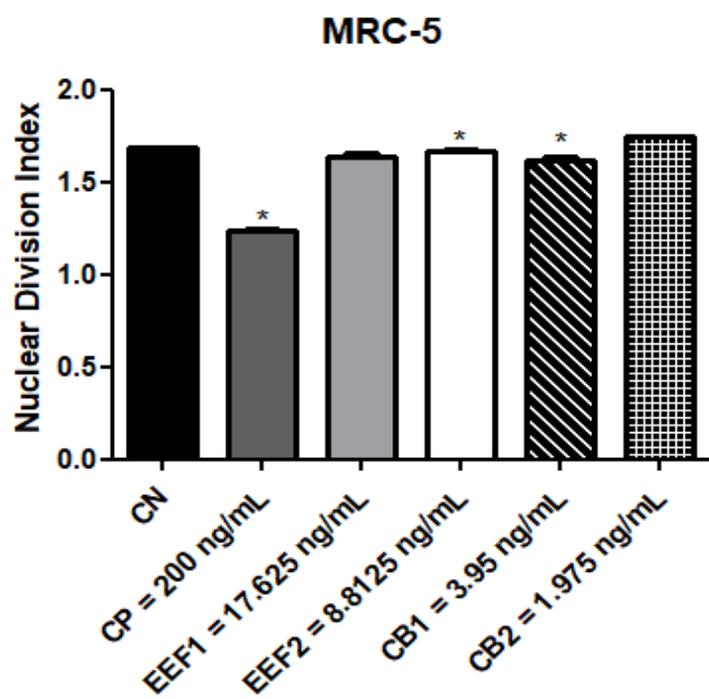
## SUPPLEMENTARY INFORMATION

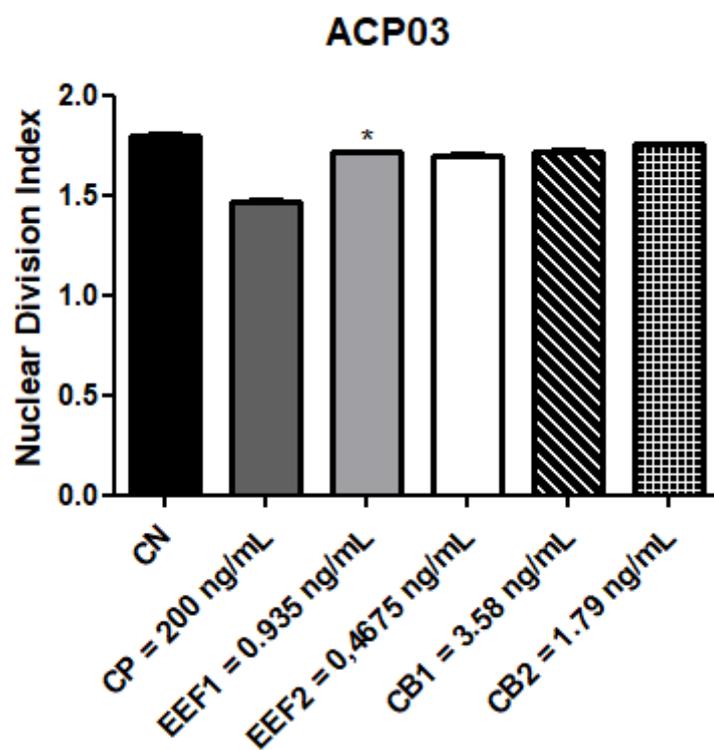
**Tabela 01:** Resultado do Índice de Seletividade (SI) dos extratos e substâncias isoladas testados em células humanas MRC-5, AGP01 e ACP03 em diferentes tempos de tratamento.

SI						
	MRC-5/ AGP01			MRC-5/ ACP03		
Sample	24h	48h	72h	24h	48h	72h
EEF (ng/ml)	4.68	7.19	3.72	15.41	18.85	12.10
CB (ng/ml)	1.60	1.34	0.60	1.51	1.10	0.87

**Legenda:** EEF = Extrato Etanólico do Fruto e CB = Cucurbitacina B. \* $p < 0,05$  e  $R^2 > 0,96$ .

**Figura 01:** Índice de proliferação por bloqueio de citocinese presente nas três linhagens após exposição a diferentes concentrações de extrato e substância isolada.





**Legenda:** A amostra CP = controle positivo, CN = controle negativo, EEF1 e EEF2 = Extrato Etanólico do Fruto, CB1 e CB2 = Cucurbitacina B. # =  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO GERAL

A caracterização fitoquímica dos extratos das sementes de *Luffa operculata* visava verificar se havia indicativo da presença das cucurbitacinas, porém tanto no Extrato Metanólico da Semente (EMS) quanto no Extrato Etanólico da Semente (EES) não foi detectada nenhuma banda característica de cucurbitacina B (CB), nas análises de HPLC (high-performance liquid chromatography). Esses resultados caracterizaram a ausência do triterpeno CB nas sementes de *Luffa operculata* da amostra coletada, corroborando com os achados de Lang et al. (2012). Em decorrência da ausência de CB nos extratos das sementes, estes extratos não foram usados para os demais ensaios deste estudo.

Na caracterização fitoquímica dos extratos dos frutos de *L. operculata* (Extrato Metanólico do Fruto - EMF e Extrato Etanólico do Fruto - EEF), as análises por HPLC-DAD apresentaram semelhanças de composição, com ambos apresentando bandas cromatográficas sugestivas de compostos da classe dos triterpenos. Após o isolamento do composto majoritário de EEF, foi possível identificar a CB por NMR (Nuclear Magnetic Resonance), e esta informação foi confirmada pela comparação da análise de NMR com a literatura (Ayyad et al., 2011).

A avaliação dos resultados de citotoxicidade nas linhagens gástricas MNP01 e ACP02 demonstraram que o índice de seletividade do EMF e EEF eram aproximados (Tabela 2, Capítulo I), mas para a escolha de um extrato de *L. operculata* levou-se em consideração o maior teor de CB em EEF (79.1 µg/mL) quando comparado a EMF (44.2 µg/mL), e pelo fato do EEF ser extraído a partir do

etanol que é um solvente de maior segurança para uso em humano quando comparado ao metanol (Do et al., 2014; USP, 2007).

Os resultados de IC<sub>50%</sub> mostraram que EEF e CB induziram maior citotoxicidade nas células gástricas estudadas (Tabela 2, Capítulo I) quando comparado ao estudo de Liu et al. (2019a) que avaliou CB nas linhagens de câncer de pulmão e ao trabalho de Ge et al. (2018) em linhagem de câncer de fígado. Além desses estudos, outras pesquisas (Liu et al., 2017; Xu et al., 2020) sobre o efeito de cucurbitacinas em células de câncer (gástrico) também utilizaram concentrações maiores desses triterpenos para atingir a IC<sub>50%</sub>, quando comparados aos resultados do presente estudo. Essas comparações aumentaram a perspectiva de EEF e CB gerarem uma potencial promessa de possível tratamento quimioterápico para câncer gástrico.

Ainda nas linhagens MNP01 e ACP02 buscou-se avaliar a genotoxicidade de EEF e CB através do ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, e mesmo nas maiores concentrações de EEF e CB (figura 4, Capítulo I) o pequeno aumento na formação de micronúcleos (MNs) nas duas linhagens celulares avaliadas, não resultou em significância estatística. Portanto, os resultados dos MNs não refletiram que a instabilidade genômica possa estar associada a maior citotoxicidade do EEF e de CB. Acredita-se que as concentrações testadas não foram suficientes para induzir a formação de micronúcleos, ou ainda que se uma instabilidade genômica foi realmente induzida, os mecanismos de reparo das células testadas foram eficientes, antes da conclusão do novo ciclo celular, pois para que o micronúcleo se forme, seria necessário ocorrer uma quebra irreparável do DNA (Fenech, 2020).

Sabe-se que uma via associada à atividade citotóxica das cucurbitacinas é a inibição da fosforilação de STAT3, que também pode ser impactada com a baixa expressão de genes como c-Myc e Bcl-xL, resultando no efeito de inibição do crescimento celular, atribuído à parada do ciclo celular na fase G2/M e à indução de apoptose (Chan et al., 2010; Xu et al., 2020). Com o objetivo de analisar o modo de interação da cucurbitacina B com as proteínas JAK1 e JAK2, que estão relacionadas à via JAK/STAT foi realizado o estudo de docking molecular, e a escolha desses alvos foi em decorrência de estudos anteriores afirmarem que CB tem a capacidade de inibir proteínas da família Janus quinase (Yar-Saglam et al., 2016; Garg et al., 2018). Sabe-se também que proteínas da família Janus quinases são responsáveis por ativar STAT3 antes que essa proteína se ligue com sucesso ao receptor, e a STAT3 fosforilada, ao migrar para o núcleo da célula, tem a capacidade de ativar a transcrição de genes alvo. Há pelo menos dez vezes mais STAT3 ativado em células de câncer gástrico do que em células epiteliais normais do estômago (Deng et al, 2010), o que apoia a afirmação de que a fosforilação de STAT3 está associada à promoção da sobrevivência de células cancerígenas e à inibição da apoptose (Liu et al., 2015).

Os resultados de docking evidenciaram que CB foi capaz de interagir favoravelmente com JAK1 e JAK2, sendo capaz de formar ligações com os resíduos de aminoácidos de interesse no sítio catalítico. Esse tipo de interação pode impedir que JAK tenha a capacidade de se autofosforilar, causando assim a inibição de JAK, o que impediria a ativação de STAT3 por essa via (JAK/STAT) (Yar-Saglam et al., 2016).

Após essas etapas do projeto, verificou-se a ação citotóxica de EEF e CB em novos modelos celulares, as linhagens AGP01, ACP03 e MRC-5 (tabela 1, Capítulo II), o que resultou em linhagens celulares mais apropriadas para os demais ensaios propostos, em decorrência da maior sensibilidade das linhagens de câncer gástrico AGP01 e ACP03, e no caso da MRC-5, a escolha foi devido ser considerada um modelo comercial padronizado de células não neoplásicas, e muito utilizada como parâmetro de comparação em estudos com linhagens de câncer (Seifrtová et al., 2017; Mohammadi-Farsani et al., 2018; Novakovic et al., 2020; Rouibah et al., 2021).

Os resultados (figura 01 e 02, Capítulo II) desta segunda etapa do projeto com as linhagens AGP01, ACP03 e MRC-5, evidenciaram novamente que EEF é mais citotóxico e seletivo nas linhagens de câncer que CB, e essa maior atividade biológica do extrato pode estar relacionada com possível efeito sinérgico entre as substâncias que o compõem, visto que extratos podem apresentar maior potencial de atividade biológica que seus componentes químicos isolados (Rasoanaivo et al., 2011).

A figura 4 do Capítulo II, demonstra que EEF e CB induziram de forma significativa ( $p < 0.05$ ) a morte por apoptose das linhagens estudadas, e uma hipótese para esse resultado é de que a cucurbitacina B pode estar regulando negativamente a sinalização JAK2 / STAT3, inibindo essa via de sinalização conforme observado em outros estudos (Zhang et al., 2014; Zheng et al., 2014; Xie et al., 2016; Zhang et al., 2017; Xu et al., 2020). Essa hipótese estaria corroborando com o resultado do estudo de docking molecular no Capítulo I.

No Capítulo II, buscou-se observar se EEF e CB poderiam influenciar na expressão gênica das linhagens, em relação ao ciclo celular e apoptose e foi verificado que tanto a CB, quanto o EEF induziram a diminuição da expressão de MYC na linhagem ACP03 quando comparada a linhagem MRC-5. Inclusive inferiu-se que quantidade (teor) de CB presente no EEF foi suficiente para ocasionar o mesmo efeito. É importante evidenciar que MYC é um dos alvos a jusante da via JAK / STAT, logo, a inibição dessa via pode contribuir com a diminuição da expressão de mRNA de MYC como observado em Xu et al., (2020), por intermédio do tratamento com CB em células de câncer gástrico.

Na linhagem ACP03, também foi verificado o aumento na expressão de BCL2 quando exposta a CB, o que poderia ser considerado um achado preocupante, porém, verificou-se na literatura que a expressão do gene BCL2 não implica obrigatoriamente no funcionamento da via antiapoptótica visto que a atuação da proteína desse gene depende da fosforilação ativada por agonistas, portanto, percebeu-se que a expressão do gene BCL2 em amostras de cânceres pode não estar diretamente relacionada com um pior prognóstico para todos os tipos de tumores ou resistência a terapias anticâncer (Ruvolo; Deng; May, 2001; Zhou et al., 2017). Essa hipótese foi reforçada pela avaliação fenotípica visto que o aumento da expressão desse gene não impactou na redução da morte celular conforme resultados obtidos pelos ensaios de MTT e de apoptose no presente estudo.

A avaliação da expressão de CCND1 não evidenciou alterações estatisticamente significante nas linhagens desse estudo e acredita-se que não foi possível verificar a modulação da expressão desse gene por CB e EEF devido às

concentrações utilizadas, por isso, não foi possível impactar diretamente na expressão deste efector. Essa possibilidade foi aventada após verificação do estudo de Xie et al. (2016) que detectou a indução da redução da expressão de CCND1 por CB, porém, utilizando concentração maior de CB que o estudo atual.

A avaliação do ciclo celular por citometria, revelou que a linhagem AGP01 apresentou resultados significantes no ciclo celular ( $p < 0.05$ ) ao evidenciar maior influência tanto de EEF como de CB na dinâmica do ciclo, visto que ambos induziram o aumento do percentual de células na fase G2/M do ciclo, principalmente em amostras expostas a CB. Esse mesmo comportamento foi observado células ACP03, ao se comparar as amostras EEF1 e CB1, onde esta última teve maior quantidade de células em G2/M ( $p < 0.05$ ). Esses resultados corroboram com os de Zhu et al. (2012), Guo et al. (2014), Wang et al. (2017), Jin et al. (2018), Zhou et al. (2019), que avaliaram a influência de cucurbitacina B no ciclo celular em diferentes células neoplásicas. Inclusive o estudo de Kausar et al. (2013) sugere que CB altera os níveis de várias proteínas celulares, como ERK e STAT3, para induzir a parada G2 / M.

CB e EEF provocaram redução de EPCAM em AGP01 e essa redução está relacionado a um ponto positivo, visto que a superexpressão de EPCAM pode ser associada à metástase e tumores maiores, logo, a um pior prognóstico no câncer gástrico (Dai et al., 2017). Essa redução de EPCAM foi observada ACP03 porém de maneira não significativa ( $p > 0.05$ ).

A avaliação da influência de EEF e CB na atividade migratória das células das linhagens expostas, destacou que ACP03 foi a mais inibida. E não há como deixar de ressaltar que essa linhagem foi a única das três que apresentou redução

significativa da expressão de MYC após exposição a EEF e CB. O estudo de Liu et al. (2019b) sugere que a protease específica da ubiquitina 22 (USP22) está associada a progressão do câncer gástrico, de forma que a diminuição de USP22 diminui a migração e invasividade do câncer gástrico visto que USP22 modula as vias de sinalização FOXO1 e YAP dependentes de c-Myc / NAMPT / SIRT1.

EEF e CB não promoveram aumento significativo ( $p < 0.05$ ) das frequências de micronúcleos nas linhagens de câncer e na linhagem não neoplásica, em relação ao controle negativo, logo, não foi observada genotoxicidade de EEF e CB nas condições testadas, o que seria compatível com outro inibidor de STAT3, que promove apoptose e assim como no presente estudo, não induz genotoxicidade (Ferraz et al., 2017). Esses resultados são interessantes do ponto de vista da segurança do uso desses agentes como quimioterápicos de uso humano.

A possibilidade de um extrato natural impactar na expressão do MYC, um oncogene tão relevante, levanta perspectivas terapêuticas de um possível fitoterápico para diversos cânceres humanos. Acredita-se que CB, componente majoritário de EEF (tabela 1, Capítulo I), atua como inibidor de STAT3, e que a inibição dessa via pode estar associada tanto a diminuição da expressão de MYC, assim também como à capacidade de inibir proteínas da família Janus quinase, como JAK1 e JAK2 (Galucio et al., 2022). Essa ação inibitória em STAT3 impactaria na redução da progressão celular e principalmente na baixa sobrevivência das células neoplásicas.

Os resultados favoráveis dessa pesquisa trazem evidências claras de que novos estudos moleculares e conduzidos *in vivo*, com os produtos de *Luffa operculata*, devem ser encorajados para contribuir com o tratamento do câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alghasham A. A. (2013). Cucurbitacins - a promising target for cancer therapy. *International journal of health sciences*, 7(1), 77–89. <https://doi.org/10.12816/0006025>

Ayyad, S. E., Abdel-Lateff, A., Basaif, S. A., & Shier, T. (2011). Cucurbitacins-type triterpene with potent activity on mouse embryonic fibroblast from *Cucumis prophetarum*, cucurbitaceae. *Pharmacognosy research*, 3(3), 189–193. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.85006>

Barreiros, A. L., David, J. M., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova*, 29(1), 113-123. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

Brasil, Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção 1, p. 2.*

Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 nov. 1998. p. 18.*

Brock, A. C. K., Duarte, M. D. R., & Nakashima, T. (2003). Estudo morfo-anatômico e abordagem fitoquímica de frutos e sementes de *Luffa operculata* (L.) Cogn., Cucurbitaceae. *Visão Acadêmica*, 4(1). <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v4i1.520>

Caribé, R. B. Abordagem da atividade biológica do extrato de *Luffa operculata* Cogn. (Cucurbitaceae). 2008. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2008.

Chan, K. T., Li, K., Liu, S. L., Chu, K. H., Toh, M., & Xie, W. D. (2010). Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer letters*, 289(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.07.015>

Dai, M., Yuan, F., Fu, C., Shen, G., Hu, S., & Shen, G. (2017). Relationship between epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression and gastric cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 12(4), e0175357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175357>

Dakeng, S., Duangmano, S., Jiratchariyakul, W., U-Pratya, Y., Bögler, O., & Patmasiriwat, P. (2012). Inhibition of Wnt signaling by cucurbitacin B in breast cancer cells: reduction of Wnt-associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated  $\beta$ -catenin to the nucleus. *Journal of cellular biochemistry*, 113(1), 49–60. <https://doi.org/10.1002/jcb.23326>

Deng, J. Y., Sun, D., Liu, X. Y., Pan, Y., & Liang, H. (2010). STAT-3 correlates with lymph node metastasis and cell survival in gastric cancer. *World journal of gastroenterology*, 16(42), 5380–5387. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i42.5380>

Dhanasekaran, R., Deutzmann, A., Mahauad-Fernandez, W. D., Hansen, A. S., Gouw, A. M., & Felsher, D. W. (2022). The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nature reviews. Clinical oncology*, 19(1), 23–36. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00549-2>

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>

Ebrahim, A. S., Sabbagh, H., Liddane, A., Raufi, A., Kandouz, M., & Al-Katib, A. (2016). Hematologic malignancies: newer strategies to counter the BCL-2 protein. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 142(9), 2013–2022. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2144-1>

Elisabetsky, Elaine. (2003). *Etnofarmacologia*. *Ciência e Cultura*, 55(3), 35-36. Retrieved April 24, 2022, from [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252003000300021&lng=en&tlng=pt](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300021&lng=en&tlng=pt).

Feitosa, C. R. S. *Contribuição ao Conhecimento Químico-Biológico de Plantas do Nordeste do Brasil: Luffa operculata Cogn.* 2011. 288f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2011.

Fenech M. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes*, 11(10), 1203. <https://doi.org/10.3390/genes11101203>

Ferraz, E. R., Fernandes, A. S., Salviano, I., Felzenszwalb, I., & Mencialha, A. L. (2017). Investigation of the mutagenic and genotoxic activities of LLL-3, a STAT3 inhibitor. *Drug and chemical toxicology*, 40(1), 30–35. <https://doi.org/10.3109/01480545.2016.1167901>

Galucio, N. C. R.; Moysés, D. A.; Pina, J. R. S.; Marinho, P. S. B.; Gomes Júnior, P. C.; Cruz, J. N.; Vale, V. V.; Khayat, A. S.; Marinho, A. M. R. (2022). Antiproliferative, genotoxic activities and quantification of extracts and cucurbitacin B obtained from *Luffa operculata* (L.) Cogn. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(2), 103589. <https://doi.org/10.1016/j.arabic.2021.103589>

Garg, S., Kaul, S. C., & Wadhwa, R. (2018). Cucurbitacin B and cancer intervention: Chemistry, biology and mechanisms (Review). *International journal of oncology*, 52(1), 19–37. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4203>

Ge, W., Chen, X., Han, F., Liu, Z., Wang, T., Wang, M., Chen, Y., Ding, Y., & Zhang, Q. (2018). Synthesis of Cucurbitacin B Derivatives as Potential Anti-Hepatocellular Carcinoma Agents. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(12), 3345. <https://doi.org/10.3390/molecules23123345>

Guo, J., Wu, G., Bao, J., Hao, W., Lu, J., & Chen, X. (2014). Cucurbitacin B induced ATM-mediated DNA damage causes G2/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner. *PloS one*, 9(2), e88140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088140>

Hartl, M., & Bister, K. (2021). MYC Analysis in Cancer and Evolution. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2318, 87–117. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1476-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1476-1_6)

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2020 – Incidência do Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. 24 de abril de 2022.

Jin, Z. Q., Hao, J., Yang, X., He, J. H., Liang, J., Yuan, J. W., Mao, Y., Liu, D., Cao, R., Wu, X. Z., Li, X., & Chen, D. (2018). Higenamine enhances the antitumor effects of cucurbitacin B in breast cancer by inhibiting the interaction of AKT and CDK2. *Oncology reports*, 40(4), 2127–2136. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6629>

Kausar, H., Munagala, R., Bansal, S. S., Aqil, F., Vadhanam, M. V., & Gupta, R. C. (2013). Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: identification of intracellular thiols as critical targets. *Cancer letters*, 332(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.008>

Kawahara, N., Kurata, A., Hakamatsuka, T., Sekita, S., & Satake, M. (2001). Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and their effect on PEBP2 $\alpha$ A and OCIF gene expression in a human osteoblast-like Saos-2 cell line. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 49(10), 1377–1379. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.1377>

Kawahara, N., Kurata, A., Hakamatsuka, T., Sekita, S., & Satake, M. (2004). Two new cucurbitacin glucosides, opercurins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*). *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 52(8), 1018–1020. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.1018>

Lang, K. L., Silva, I. T., Zimmermann, L. A., Machado, V. R., Teixeira, M. R., Lapuh, M. I., Galetti, M. A., Palermo, J. A., Cabrera, G. M., Bernardes, L. S., Simões, C. M., Schenkel, E. P., Caro, M. S., & Durán, F. J. (2012). Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(9), 3016–3030. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.001>

Lanini, J., Duarte-Almeida, J. M., Nappo, S., & Carlini, E. A. (2009). " O que vêm da terra não faz mal": relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 121-129. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000100022>

Liu, T., Zhang, M., Zhang, H., Sun, C., & Deng, Y. (2008). Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 265(10), 1225–1232. <https://doi.org/10.1007/s00405-008-0625-9>

Liu, Y. F., Lu, Y. M., Qu, G. Q., Liu, Y., Chen, W. X., Liao, X. H., & Kong, W. M. (2015). Ponicidin induces apoptosis via JAK2 and STAT3 signaling pathways in gastric carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 1576–1589. <https://doi.org/10.3390/ijms16011576>

Liu, X., Duan, C., Ji, J., Zhang, T., Yuan, X., Zhang, Y., Ma, W., Yang, J., Yang, L., Jiang, Z., Yu, H., & Liu, Y. (2017). Cucurbitacin B induces autophagy and apoptosis by suppressing CIP2A/PP2A/mTORC1 signaling axis in human cisplatin resistant gastric cancer cells. *Oncology reports*, 38(1), 271–278. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5648>

Liu, P., Xiang, Y., Liu, X., Zhang, T., Yang, R., Chen, S., Xu, L., Yu, Q., Zhao, H., Zhang, L., Liu, Y., & Si, Y. (2019a). Cucurbitacin B Induces the Lysosomal Degradation of EGFR and Suppresses the CIP2A/PP2A/Akt Signaling Axis in Gefitinib-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(3), 647. <https://doi.org/10.3390/molecules24030647>

Liu, H., Liu, N., Zhao, Y., Zhu, X., Wang, C., Liu, Q., Gao, C., Zhao, X., & Li, J. (2019b). Oncogenic USP22 supports gastric cancer growth and metastasis by activating c-Myc/NAMPT/SIRT1-dependent FOXO1 and YAP signaling. *Aging*, 11(21), 9643–9660. <https://doi.org/10.18632/aging.102410>

Matos, F. J. A. (1979). Farmacognosia de *Luffa operculata* cogn. Rev Bras Farm, 60(7/9), 69-76.

Menon-Miyake, M. A., Carvalho de Oliveira, R., Lorenzi-Filho, G., Saldiva, P. H., & Butugan, O. (2005). *Luffa operculata* affects mucociliary function of the isolated frog palate. *American journal of rhinology*, 19(4), 353–357. <https://doi.org/10.1177/194589240501900406>

Mohammadi-Farsani, A., Habibi-Roudkenar, M., Golkar, M., Shokrgozar, M. A., Jahanian-Najafabadi, A., KhanAhmad, H., Valiyari, S., & Bouzari, S. (2018). A-NGR fusion protein induces apoptosis in human cancer cells. *EXCLI journal*, 17, 590–597. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1120>

Monteiro, J. M., Albuquerque, U. P. D., Araújo, E. D. L., & Amorim, E. L. C. D. (2005). Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, 28, 892-896. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500029>

Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A., & Sutherland, R. L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 11(8), 558–572. <https://doi.org/10.1038/nrc3090>

Novakovic, M., Simić, S., Koračak, L., Zlatović, M., Ilic-Tomic, T., Asakawa, Y., Nikodinovic-Runic, J., & Opsenica, I. (2020). Chemo- and biocatalytic esterification of marchantin A and cytotoxic activity of ester derivatives. *Fitoterapia*, 142, 104520. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104520>

Oliveira, F. A. Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. E de seus principais constituintes, mistura de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina. 2005. 279f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, Ceará, 2005.

Oliveira, D. P. C. D., Borrás, M. R. L., Ferreira, L. C. D. L., & López-Lozano, J. L. (2009). Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 643-649. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400024>

Qie, S., & Diehl, J. A. (2016). Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 94(12), 1313–1326. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1475-3>

Rasoanaivo, P., Wright, C. W., Willcox, M. L., & Gilbert, B. (2011). Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malaria journal*, 10 Suppl 1(Suppl 1), S4. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S4>

Rouibah, H., Kebsa, W., Lahouel, M., Zihlif, M., Ahram, M., Aburmaileh, B., Mansour Al Shhab, M. A., Al-Ameer, H. J., & Mustafa, E. (2021). Algerian propolis: between protection of normal cells and potentialisation of the anticancer effects of doxorubicin against breast cancer cells via P-glycoprotein inhibition and cell cycle arrest in the S phase. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 72(2), 10.26402/jpp.2021.2.09. <https://doi.org/10.26402/jpp.2021.2.09>

Ruvolo, P. P.; Deng, X.; May, W. S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*, 15(4), 515–522. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402090>

Sakarkar, D. M., & Deshmukh, V. N. (2011). Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. *Int J Pharm Tech Res*, 3(1), 298-308.

[https://www.researchgate.net/publication/282372454\\_Ethnopharmacological\\_Review\\_of\\_Traditional\\_Medicinal\\_Plants\\_for\\_Anticancer\\_Activity](https://www.researchgate.net/publication/282372454_Ethnopharmacological_Review_of_Traditional_Medicinal_Plants_for_Anticancer_Activity)

Scalia, R. A., Dolci, J. E. L., Ueda, S. M. Y., & Sassagawa, S. M. (2015). Atividade antimicrobiana in vitro da *Luffa operculata*. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 81, 422-430. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2014.07.015>

Schenk, R. L., Strasser, A., & Dewson, G. (2017). BCL-2: Long and winding path from discovery to therapeutic target. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 459–469. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.100>

Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Athayde, M.L. Saponinas. In: Simões, C.M.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap.27, p.597-619.

Seifrtová, M., Havelek, R., Cahlíková, L., Hulcová, D., Mazánková, N., & Řezáčová, M. (2017). Haemanthamine alters sodium butyrate-induced histone acetylation, p21WAF1/Cip1 expression, Chk1 and Chk2 activation and leads to increased growth inhibition and death in A2780 ovarian cancer cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 35, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.019>

Sousa Neto, P. S. *Luffa operculata* - mecanismo de ação no epitélio respiratório e eficácia terapêutica no tratamento clínico das rinossinusites: revisão sistemática.

2006. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2006.

USP 30-NF 25, 2007. General Chapter USP <467> Residual Solvents / Organic volatile impurities, United States Pharmacopeia. Pharmacopoeia Convention Inc., Rockville, MD, USA, 1-10. [https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Curent.pdf](https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/generalChapter467Curent.pdf) (accessed 03 October 2021).

Wang, X., Tanaka, M., Peixoto, H. S., & Wink, M. (2017). Cucurbitacins: elucidation of their interactions with the cytoskeleton. *PeerJ*, 5, e3357. <https://doi.org/10.7717/peerj.3357>

WHO - World Health Organization. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acessado em: 24 de abril de 2022.

Xie, Y. L., Tao, W. H., Yang, T. X., & Qiao, J. G. (2016). Anticancer effect of cucurbitacin B on MKN-45 cells via inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(4), 2709–2715. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3670>

Xu, J., & Lin, D. I. (2018). Oncogenic c-terminal cyclin D1 (CCND1) mutations are enriched in endometrioid endometrial adenocarcinomas. *PloS one*, 13(7), e0199688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199688>

Xu, J., Chen, Y., Yang, R., Zhou, T., Ke, W., Si, Y., Yang, S., Zhang, T., Liu, X., Zhang, L., Xiang, K., Guo, Y., & Liu, Y. (2020). Cucurbitacin B inhibits gastric cancer progression by suppressing STAT3 activity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 684, 108314. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108314>

Yar Saglam, A. S., Alp, E., Elmazoglu, Z., & Menevse, S. (2016). Treatment with cucurbitacin B alone and in combination with gefitinib induces cell cycle inhibition and apoptosis via EGFR and JAK/STAT pathway in human colorectal cancer cell lines. *Human & experimental toxicology*, 35(5), 526–543. <https://doi.org/10.1177/0960327115595686>

Zhang, M., Bian, ZG, Zhang, Y., Wang, JH, Kan, L., Wang, X., Niu, HY, & He, P. (2014). A Cucurbitacina B inibe a proliferação e induz a apoptose por meio da inibição da via STAT3 em células A549 de câncer de pulmão. *Molecular medicine reports*, 10 (6), 2905–2911. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2581>

Zhang, Z. R., Gao, M. X., & Yang, K. (2017). Cucurbitacin B inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma cells via modulation of the

JAK2/STAT3 and MAPK pathways. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(1), 805–812. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4547>

Zheng, Q., Liu, Y., Liu, W., Ma, F., Zhou, Y., Chen, M. ... He, G. (2014). Cucurbitacin B inhibits growth and induces apoptosis through the JAK2/STAT3 and MAPK pathways in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 10, 89-94. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2175>

Zhou, M.; Zhang, Q.; Zhao, J.; Liao, M.; Wen, S.; Yang, M. (2017). Phosphorylation of Bcl-2 plays an important role in glycochenodeoxycholate-induced survival and chemoresistance in HCC. *Oncology reports*, 38(3), 1742–1750. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5830>

Zhou, J., Liu, M., Chen, Y., Xu, S., Guo, Y., & Zhao, L. (2019). Cucurbitacin B suppresses proliferation of pancreatic cancer cells by ceRNA: Effect of miR-146b-5p and lncRNA-AFAP1-AS1. *Journal of cellular physiology*, 234(4), 4655–4667. <https://doi.org/10.1002/jcp.27264>

Zhu, J. S., Ouyang, D. Y., Shi, Z. J., Xu, L. H., Zhang, Y. T., & He, X. H. (2012). Cucurbitacin B induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy associated with G actin reduction and persistent activation of cofilin in Jurkat cells. *Pharmacology*, 89(5-6). <https://doi.org/10.1159/000338757>