

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* das raízes de *Senna velutina*

DAVID TSUYOSHI HIRAMATSU DE CASTRO

DOURADOS MS

2016

DAVID TSUYOSHI HIRAMATSU DE CASTRO

**Atividades antitumorais *in vitro* e *in vivo* das raízes de
*Senna velutina***

Dissertação apresentada à Universidade Federal da
Grande Dourados – Faculdade de Ciências da
Saúde, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

DOURADOS MS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C355a	<p>Castro, David Tsuyoshi Hiramatsu de.</p> <p>Atividade antitumoral in vitro e in vivo do extrato etanólico das raízes de Senna velutina (Vogel) HS Irwin & Barneby. / David Tsuyoshi Hiramatsu de Castro. – Dourados, MS : UFGD, 2016.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Bioprospecção. 2. Produto natural. 3. Câncer. 4. Morte celular. 5. Melanoma. I. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



UFPGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA PELO CANDIDATO **DAVID TSUYOSHI HIRAMATSU DE CASTRO**, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA", REALIZADA NO DIA 09 DE SETEMBRO DE 2016.

Ao nono dia do mês de janeiro do ano de dois mil e dezesseis (09/09/2016), às 14h, em sessão pública, realizou-se, no Auditório II da Faculdade de Ciências da Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "*Atividade antitumoral in vitro e in vivo das raízes de Senna velutina (Vogel) H. S. Irwin & Barneby*" apresentada pelo mestrando **DAVID TSUYOSHI HIRAMATSU DE CASTRO**, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dr. Edson Lucas dos Santos** (Presidente/orientador), **Dra. Ana Paula Boleti** (membro titular/Externo), **Dr. Carlos Alexandre Carollo** (membro titular/Externo) e **Dra. Jaqueline Ferreira Campos** (membro titular/Externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido o candidato considerado **APROVADO**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 09 de setembro de 2016.

Dr. Edson Lucas dos Santos _____

Dra. Ana Paula Boleti _____

Dr. Carlos Alexandre Carollo _____

Dra. Jaqueline Ferreira Campos _____

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFPGD.

Profa. Kely de Picoli Souza
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

“Dedico ao meu tio Nelson, uma pessoa extraordinária,
que esteve com a gente à tempos atrás”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, que sempre torce por mim, mesmo distante: minha mãe Leda que sempre se dedicou e foram sempre os ombros que deleitei para apoiar, aos meus irmãos Alex e Juliana por ter me ensinado a dividir a minha mãe e a Francielly, apesar de ter conhecido recentemente, minha querida irmã e também meus outros irmãos

Aos meus familiares: tios e primos que me acompanhou desde meu nascimento, contribuindo para minha educação e no que sou hoje.

À minha avó falecida, que considero como uma mãe, super atenciosa e que me cuidou desde os primeiros dias de vida até hoje.

Ao Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos, muito mais que um orientador, que acreditou que este sonho fosse possível e a quem agradeço por todo empenho, sabedoria, compreensão e oportunidades.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar da banca de qualificação e defesa, pela leitura do texto e inúmeras contribuições que permitiram a conclusão de um trabalho com maior qualidade.

À Prof. Dra. Kely de Picoli Souza, uma mulher forte, inspiração de dedicação e amor a sua profissão de pesquisadora e um poço inesgotável de conhecimento.

Aos colegas e professores da Unifesp, pelas contribuições e acolhimento.

À minha companheira Jordana, que desde o período de graduação tem acompanhado este caminho lado a lado comigo, minha eterna gratidão por estar presente no meu dia a dia. Espero que nosso laço se estenda por muitos anos.

Ao Anderson e Guilherme, meus veteranos de biologia, pessoas fantásticas e humildes, a quem tenho uma enorme gratidão pelos primeiros meses de quando cheguei em Dourados.

Aos companheiros do laboratório, membros do grupo GEBBAM, que compartilharam comigo muitas discussões sobre ciência e com as quais também

aprendi bastante. Não somente isto, considero todos como amigos que espero estender esta amizade pela vida toda.

Preciso agradecer ao jogo Dota 2 também por todos os momentos de descarrego do estresse durante o período de mestrado e desculpas pelos xingamentos aos jogadores.

Aos meus amigos de Dracena, pela amizade de anos que contribuíram pelo que sou.

À CAPES, CNPq e FUNDECT, pela disponibilidade de realizar esta pesquisa com apoio financeiro.

Por fim, agradeço às pessoas que estiveram presentes por todo este tempo, me auxiliando de forma direta como também indiretamente onde pude retirar lições e ensinamentos que carregarei pela vida toda.

A todos vocês, MUITO OBRIGADO!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê”
(Arthur Schopenhauer)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Câncer	4
2.2. Câncer de pele e melanoma	6
2.3. Terapias para o melanoma	8
2.3.1. Desenvolvimento e classificação.....	8
2.3.2. Tratamentos para o melanoma cutâneo e metastático	9
2.4. Ciclo Celular e câncer	10
2.4.1. Ciclo celular em células eucarióticas.....	10
2.4.2. Desregulação do ciclo celular e câncer	13
2.5. Morte celular programada	13
2.5.1. Autofagia	13
2.5.2. Apoptose	14
2.5.3. Necrose acidental e necrose regulada	17
2.6. Compostos naturais e o câncer	18
2.7. Gênero <i>Senna</i>.....	20
2.8. <i>Senna velutina</i>.....	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral.....	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como uma doença crônica de causas multifatoriais e se diferencia por um crescimento descontrolado e indiferenciado das células que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (Brandão et al., 2010; Hanahan e Weinberg, 2011).

No cenário brasileiro, o câncer ganhou importância no perfil de mortalidade do país, considerado como a segunda causa de morte atrás somente de doenças cardiovasculares (Mansur e Favarato, 2012; INCA, 2016). A estimativa para o Brasil entre os anos de 2016 e 2017 será de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer e este número tende a crescer nos próximos anos (INCA, 2016).

Atualmente há três principais tipos de tratamento para o câncer sendo: a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. Entretanto, a maioria dos quimioterápicos existentes no mercado atuam de forma inespecífica gerando toxicidade tanto em células normais quanto em cancerígenas e deste modo promovem severos efeitos colaterais como náuseas, insuficiência renal, irritação gastrointestinal e leucopenia, conseqüentemente, susceptibilidade a infecções (Brandão et al., 2010; Iwamoto, 2013; Lee et al, 2014). Além dos efeitos colaterais, outro problema encontrado é a resistência adquirida pelas células tumorais às quimioterapias atuais (Holohan et al., 2013). Assim, uma das alternativas para estes problemas tem sido a procura de novas substâncias antitumorais decorrentes de plantas medicinais para o desenvolvimento de novos medicamentos.

As plantas medicinais vêm representando uma importante fonte de drogas anticancerígenas (Alonso-Castro et al., 2011). Diversos produtos de origem vegetal como alcaloides da vinca, taxol e a camptotecina ainda contribuem para o tratamento contra vários tipos de câncer e sua aprovação na área oncológica abriu caminho para uma nova era do uso de plantas medicinais como agentes citotóxicos (Newman e Cragg, 2007).

Além das plantas, os microorganismos e alguns animais, apresentam metabolismo diferenciado capaz de produzir, transformar e acumular substâncias bioativas que não são necessariamente vitais para sua manutenção. O todo esse grupo de substâncias considerados como elementos diferenciados e específicos, dá-se o nome de metabólitos secundários que garantem vantagens em sua sobrevivência e perpetuação da espécie nos diferentes ecossistemas (Simões et al., 2010). Estes metabólitos têm como função proteger contra herbivoria, patógenos como também auxiliam na competição com outros vegetais. Além destes, auxiliam na atração de polinizadores e de organismos simbiontes. Outra função acrescida é a proteção contra fatores externos como temperatura, umidade, restrição de nutrientes e contra radiação UV (Alves, 2001; Peres 2004; Simões, 2010).

Muitos desses metabólitos secundários extraídas das plantas são alvos de pesquisas científicas por apresentarem atividades farmacológicas para solucionar diversas patologias como também para validar o conhecimento empírico de diversas comunidades (Micozzi, 2003). Para a escolha de quais espécies investigar para avaliar seu potencial biológico, há muitas estratégias de abordagem que podem ser consideradas. Dentre elas, encontra-se a abordagem etnofarmacológica que consiste em combinar o conhecimento da medicina popular construído localmente com estudos químico-farmacológicos (Elisabetsky, 2003, Gyllenhaal et al., 2012).

Apesar de toda a importância atribuída as plantas medicinais, ainda assim, são pouco exploradas quanto a validação de suas atividades terapêuticas baseados em estudos científicos. Temos como exemplo, o Brasil, com a maior biodiversidade do mundo que abrange cerca de 20% de toda a fauna e flora mundial. Esse imenso patrimônio genético, escasso em muitos países, tem grande valor para o campo no desenvolvimento de novos medicamentos podendo oferecer uma diversidade de substâncias com variados potenciais farmacológicos (Oliveira et al., 2012). A razão deste fato pode ser comprovada com a quantidade de medicamentos obtidos de forma direta ou indireta oriundos de produtos naturais (Cragg e Newman, 2013).

Neste sentido, foi escolhido uma espécie nativa do Brasil, *Senna velutina*, conhecida popularmente como vermelhinho. Esta espécie, encontrada no bioma Cerrado, carece de estudos científicos elucidando suas atividades terapêuticas, incluindo atividade antitumoral. Dada a importância de buscar terapias alternativas que

visem contribuir para o tratamento do câncer, este estudo tem como objetivo, caracterizar seus compostos bioativos e buscou-se realizar um trabalho que caracterizasse sua potencialidade como antitumoral em linhagem celular tumoral de melanoma.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer

Câncer é uma doença complexa de fundo genético que possui como característica principal, a proliferação celular de forma descontrolada (Ouyang, et al., 2012). Por se multiplicarem de forma acelerada, estas células progressivamente encaminham para um estado neoplásico, formando tumores malignos que podem se espalhar para outros tecidos do organismo em um processo denominado metástase (Hanahan & Weinberg, 2011; INCA, 2016).

O câncer é considerado um dos principais problemas de saúde pública devido suas elevadas taxas de morbidade e mortalidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016), a estimativa mundial para 2030 para a incidência do câncer é de cerca de 27 milhões de novos casos e de 17 milhões de mortes relacionadas a doença. No Brasil, a estimativa para o biênio de 2016-2017, aponta para a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer (Figura 1), sendo 180 mil casos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2016).

As causas que levam ao desenvolvimento do câncer são fatores intrínsecos ou extrínsecos, podendo estar relacionadas. Os fatores internos estão relacionados com mutações em genes supressores de tumor e genes pró-oncogênicos ou em proteínas responsáveis pela proliferação celular (Osborne et al., 2004; Weinberg, 2011). Os maiores fatores externos são: hábitos alimentares, sobrepeso, sedentarismo, tabagismo e consumo de álcool. (WHO, 2016).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1. Taxas brutas de incidência de câncer estimada para o ano de 2016-2017 por 100 mil

Em 2011, foi descrito em uma revisão bibliográfica, as características adquiridas pelas células cancerígenas, em que são necessárias para progressão da carcinogênese (Figura 2). Neste artigo, foi demonstrado que as células cancerígenas possuem autossuficiência em fatores de crescimento, ou seja, sintetizam proteínas responsáveis pela ativação nos sinais de proliferação celular atuando como células autócrinas. Além disso, possuem instabilidade genômica e metabolismo energético diferenciado comparado as células normais (Hanahan e Weinberg, 2011). Estas habilidades diferenciadas garantem uma complexidade tumoral que geram condições adequadas para a proliferação descontrolada das células tumorais (Junttila e Sauvage, 2013). E estes conhecimentos sobre as características das células tumorais pode auxiliar no desenvolvimento de novos produtos antitumorais com diferentes alvos terapêuticos para o tratamento do câncer.

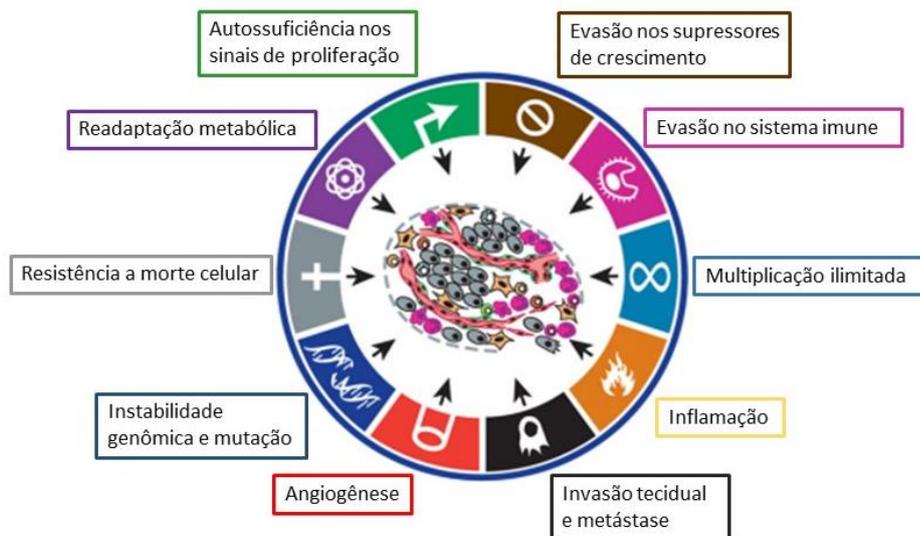


Figura 2. Características das células tumorais. Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

2.2. Câncer de pele e melanoma

A pele é o maior órgão do corpo humano e organizado em praticamente duas camadas principais: epiderme e derme. A epiderme corresponde a parte mais externa que está em contato com o ambiente, responsável pela barreira físico-química contra agentes estressores como patógenos, substâncias químicas, ações mecânicas e raios ultravioleta (UV) (D’Orazio et al, 2013). Os queratinócitos são as células mais abundantes da epiderme, caracterizados por expressarem queratinas e uma pequena quantidade de melanócitos, responsáveis pela produção de melanina (Hirobe, 2014). A derme está estruturada abaixo da epiderme e contém estruturas como folículos capilares, nervos e glândulas sebáceas. A derme contém também fibroblastos e células do sistema imune, responsáveis também por participar de diversos processos fisiológicos (Elwood & Jopson, 1997; Fuchs, 2007).

Pela heterogeneidade de células na epiderme, o câncer de pele pode ser derivado de diferentes células. Os tipos mais frequentes são originados de células basais e escamosas (não melanoma) ou de melanócitos (melanoma cutâneo) (Van der Geer et al, 2013). O câncer de pele não melanoma é o tipo de câncer mais incidente no Brasil com estimativa de 175 mil novos casos para o ano de 2016 (INCA, 2016). Apesar da alta incidência, sua mortalidade é uma das mais baixas por apresentar alto índice de cura. Por outro lado, o melanoma cutâneo, apesar de corresponder cerca de

4% dos casos, representa 80% das mortes devido a sua agressividade e capacidade de desenvolver metástase (Nogueira et al, 2013; INCA, 2016).

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele gerado através de alterações nos melanócitos, que pode estar localizada tanto na pele quanto em outros tecidos pigmentados como: olhos, intestino e meninges (Shain & Bastian, 2016). A transformação de melanócitos normais para células neoplásicas ocorre através de uma interação complexa entre fatores exógenos e endógenos que levam a mutações genéticas e, conseqüentemente ao desenvolvimento do melanoma cutâneo (Bandarchi et al., 2010). A exposição intermitente aos raios UV oriundos da radiação solar está entre os maiores fatores de risco. Em adição, cor de pele e cabelo, exposição a produtos químicos, imunossupressores, histórico familiar e condições genéticas específicas também são fatores que contribuem para o surgimento do melanoma (Sober et al., 2001; Simões et al, 2015).

O melanoma não é uma doença homogênea, mas composta biologicamente por diferentes subtipos de células epidérmicas. É evidenciado que pelo acúmulo de várias alterações genéticas há diferentes fenótipos de melanoma (Somasundaram et al., 2012). Apesar de não elucidada os mecanismos que levam melanócitos normais se transformarem em células do melanoma, sabe-se que há mutações em genes proto-oncogênicos relacionados à via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (Roskoski et al., 2010; Mandála & Voit, 2013). A via de sinalização MAPK ou RAS-RAF-MEK-ERK é iniciada em receptores na membrana plasmática através de vários estímulos extracelulares como: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) ou fator de crescimento transformante (TGF). Esta sinalização na membrana plasmática leva a ativação da proteína RAS (com três isoformas sendo HRAS, KRAS e NRAS) que promove a transdução de sinais para proteínas da família Raf que incluem ARAF, BRAF e CRAF. Cada uma destas três proteínas quinases podem ativar o próximo estágio, as proteínas MEK. Ao serem ativadas, o passo seguinte é a fosforilação de proteínas quinases ERK, responsáveis por ativar fatores de transcrição que regulam vários processos incluindo apoptose, progressão do ciclo celular, diferenciação e proliferação celular (Ramnath et al., 2007; Wellbrock e Hurlstone, 2010; Vultur et al., 2011).

É descrito que em 90% dos melanomas há mutações na via de sinalização MAPK em que 50% são mutações na proteína BRAF, alvo das recentes drogas antitumorais encontrados no tratamento para o melanoma (Ascierto et al., 2012; Shah e Dronca, 2014). Além desta via, há também mutações em outras vias como a PI3K/AKT/mTOR, responsáveis pela proliferação celular, porém estes são observados com menor frequência (Omholt et al., 2006).

2.3. Terapias para o melanoma

2.3.1. Desenvolvimento e classificação

O melanoma primário apresenta três fases de desenvolvimento para formação do tumor: 1) os melanócitos neoplásicos se proliferam na epiderme, 2) invadem a derme papilar (crescimento radial invasivo) e 3) entram na fase tumorigênica e mitogênica, adquirindo capacidade de crescimento tumoral (crescimento vertical) (Guerry et al., 1993).

O diagnóstico para o melanoma é baseado na combinação de três análises de qualquer lesão ou mancha pigmentada: 1) detecção visual de qualquer mancha na pele com características assimétricas, bordas irregulares, cores heterogêneas e acima de 5mm. Para indivíduos em observação é recomendado a fotografia de todo o corpo para possível detecção do melanoma 2) dermatoscopia para análise mais precisa e em último caso 3) biópsia do tecido pigmentado (Garbe et al., 2012; Eggermont et al., 2014).

Para o quadro clínico, o melanoma pode ser classificado histologicamente em quatro tipos, sendo: melanoma expansivo superficial, melanoma nodular, melanoma lentiginoso acral e melanoma lentiginoso maligno. Este diagnóstico é baseado nos níveis de Breslow (espessura vertical em milímetros), pelos critérios de Clark (grau de invasão do tumor nas diferentes camadas), tempo de exposição solar e características pessoais (Clark, 1967; Reed, 1976 e Spatz et al., 2010).

2.3.2. Tratamentos para o melanoma cutâneo e metastático

O melanoma é caracterizado em cinco estágios: no estágio 0, os tumores são in situ em que não são invasivos e se encontra abaixo da superfície epidérmica; os estágios I e II apresentam tumor primário com invasão mas com tamanhos pequenos; no estágio III há o início de metástase e; no estágio IV, com subdivisão de M1a, M1b e M1c, encontra-se metástase avançada em sítios distantes. Pacientes com melanoma até o estágio III apresentam bom prognóstico com uma média de sobrevivência de 5 a 10 anos. Porém, para pacientes no estágio IV da doença há uma sobrevida de 1 anos em 62% para M1a, 53% para M1b e 33% para M1c (Balch et al., 2009). Em cerca de 90% dos casos se diagnosticados precocemente, é recomendado a excisão cirúrgica local (Tsao et al., 2004). Além da remoção cirúrgica e da radioterapia, há o tratamento com drogas antineoplásicas divididos em imunoterapia, quimioterapia e drogas direcionadas a alvos moleculares (Simões et al., 2015).

Na quimioterapia, a dacarbazina foi aceita como o primeiro medicamento padrão para o tratamento do melanoma. Este medicamento é um dos derivados de triazeno que funcionam como alquilantes nas bases do DNA formando ligações entre as hélices que levam a morte das células cancerígenas. Nos primeiros testes clínicos, este medicamento aumentou a sobrevida nos pacientes de 7 meses e foi aprovado em 1970 (Kushnir e Merimsky, 2013). Em seguida, a descoberta do papel imune na inibição do crescimento de células tumorais do melanoma trouxe a imunoterapia com a aprovação da interleucina-2 pela Food and Drug Administration em 1976 (Atkins et al., 1999; Ram et al., 2007). A partir daí, através de extensivas pesquisas surgiram outras drogas como: análogos de platina, nitrosureas, taxanos e citocinas, mas ainda assim o tratamento permaneceu parcialmente efetivo (Janjetovic et al., 2011).

Com os avanços na biologia molecular do melanoma e a relação com o sistema imune, surgiram novas drogas (Bates et al., 2012). Em 2011, um dos primeiros medicamentos aprovados foi o vemurafenibe (Zelboraf®), um inibidor de proteínas BRAF, integrantes da via de sinalização por AMPK (Chapman et al., 2011; da Rocha Dias et al., 2013). Porém um dos problemas encontrados foi o rápido desenvolvimento de resistência a estes agentes moleculares que também apresentaram diversos efeitos colaterais devido a sua toxicidade (Sullivan e Flaherty, 2013; Welsh e Corrie, 2015).

Esta resistência pode estar associada as alterações nos níveis de ciclinas D1 no ciclo celular e/ou maior expressão de genes supressores de tumor como as proteínas fosfatase homólogas a tensina e assim dificultam a progressão do tratamento (Smalley et al., 2008; Paraiso et al., 2011). Adicionalmente, as células do melanoma podem adquirir resistência a apoptose e acentuar ainda mais a resistência às terapias (Hartman et al., 2013).

2.4. Ciclo Celular e câncer

2.4.1. Ciclo celular em células eucarióticas

O ciclo celular é um processo fundamental para a manutenção no número de células. É orquestrada por uma complexa interação entre proteínas, metabolismo, sinalizações celulares e mecanismos de controle que direcionam a proliferação de células somente por estímulos específicos e em condições adequadas. Este processo pode ser dividido em quatro estágios elucidados na figura 3. No processo de divisão celular, o período em que uma célula se divide em duas células filhas com a mesma quantidade de cromossomos, é conhecido como mitose e o período entre duas mitoses é denominada intérfase. A Intérfase é dividida em três fases: G1, S e G2. Na fase G1, há um crescimento celular resultante da grande quantidade de síntese protéica. Na fase S ocorre a duplicação de DNA e a fase G2 é caracterizado pela síntese de RNA e proteínas dando início a divisão celular (Norbury e Nurse, 1992). Há a ocorrência de uma outra fase do ciclo em que células cessam sua proliferação e entram em um estado de repouso (G0), porém pode ser reversível e dar continuidade ao ciclo (Garrett et al., 2001).

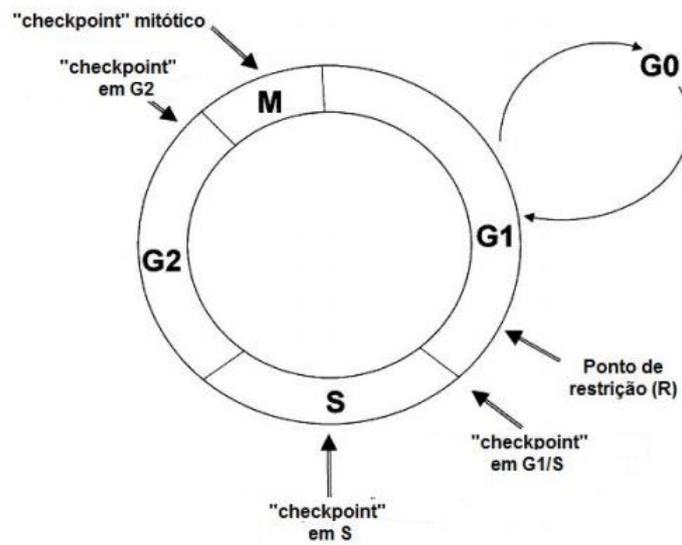


Figura 3. Fases do Ciclo Celular (Adaptado de Garrett, 2001)

A transição de uma fase do ciclo para a próxima é monitorada por mecanismos de sensores, conhecidos como checkpoints, que têm como função, verificar e reparar danos genéticos garantindo a cópia do DNA idênticas para as células filhas e a manutenção da integridade do ciclo celular (Hartwell e Weinert, 1989; Viillard et al., 2001).

A progressão de cada fase do ciclo celular é coordenada por um sistema controle (figura 4). Este controle é mediado pela ação do complexo ciclina-CDK, em que CDK são quinases dependentes de ciclinas e as ciclinas são suas subunidades de ativação. A formação, seus níveis e sua separação são eventos essenciais que coordenam o ciclo celular, uma vez que estes complexos induzem a ativação de proteínas específicas através da fosforilação de serinas e treoninas (Blain et al., 1997).

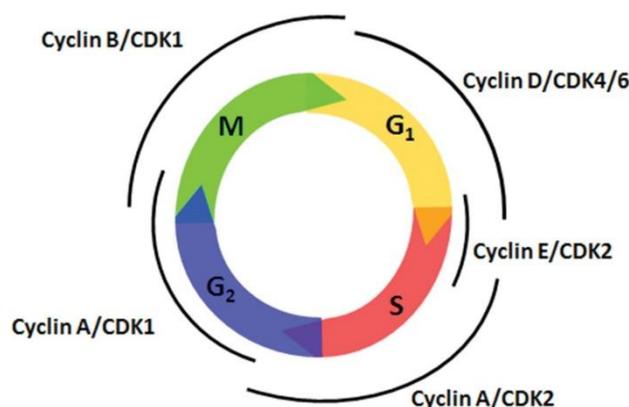


Figura 4. Complexo ciclina/Cdk correspondente em cada fase do ciclo celular.

A progressão da mitose ou senescência para a fase G₁, depende da expressão na quantidade de ciclinas D (Ekholm e Reed, 2000). A formação do complexo ciclina-D/CDK4-6, em resposta a sinais mitogênicos via AMPK, acarreta ainda mais o acúmulo de ciclina-D (Arellano e Moreno, 1997). Ao alcançar níveis adequados do complexo ciclina-D/CDK4-6, estes compostos são capazes de fosforilar e inativar proteína retinoblastoma (Rb) (Malumbres e Barbacid, 2009). As proteínas Rb são encontradas ligadas a outras proteínas regulatórias de genes em seu estado desfosforilado. Quando fosforiladas, a Rb libera estas proteínas favorecendo a transcrição de genes responsáveis pelo avanço do ciclo celular (Keenan et al., 2004). Uma das proteínas sintetizadas são as ciclinas E que se ligam a CDK-2, formando o complexo Ciclina-E/CDK2. Este complexo, além de inativar completamente proteínas Rb, atuam também sobre a E2F, que está diretamente ligado a transcrição de genes recrutados para entrar na fase S do ciclo celular (Ortega et al., 2002). Além disso, o complexo ciclina-E/CDK2 também fosforila proteínas envolvidas com a replicação e reparo do DNA (Sherr e Roberts, 1999). Na fase S, as ciclinas A/CDK1,2 são responsáveis pela progressão para a fase G₂. E o complexo ciclina-B/CDK1 pela progressão das células da fase S para a mitose (Draetta e Beach, 1988).

Existem outros mecanismos que controlam o ciclo celular por induzir a expressão de genes que codificam inibidores de CDKs, chamados de inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKIs). Os CKIs se ligam aos complexos ciclina-CDK que regulam negativamente seus níveis, denominados também de supressores de tumor. Alguns exemplos como a família de supressores de INK4 (p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c} e p19^{Ink4d}), capazes de inibir os complexos ligados a ciclina D como também a família CIP/KIP (p21^{cip1}, p27^{kip1} e p57^{kip2}), que inibem complexos ligados a ciclina E (Sherr e Roberts, 1999). Uma das principais proteínas supressoras de tumor é a p53, que tem função importante nas respostas a danos celulares em organelas e DNA ou ativação desregulada de proteínas oncogênicas. Estas proteínas ao serem ativadas, realizam a interrupção das atividades celulares até que o reparo do erro/dano esteja finalizado e após o reparo dá continuidade ao ciclo celular. Quando não reparado, a p53 sinaliza vias apoptóticas para que esse erro/dano não passe adiante para as células filhas (Oren, 2003; Vousden, 2006).

2.4.2. Desregulação do ciclo celular e câncer

Células normais somente se proliferam em resposta a estímulos externos como sinais de crescimento ou miogênicos. Porém, células cancerígenas se proliferam de forma desregulada na ausência destes sinais de proliferação. Nesta perspectiva, as células cancerígenas podem ter sua base oncogênica suportada por alterações no ciclo celular.

Nas células tumorais, é reportado que diferentes caminhos dependentes de CDK são alteradas. A superexpressão de CDKs, ciclinas e a baixa expressão de CKIs e proteínas Rb são frequentemente reportadas em neoplasias (Malumbres e Barbaci, 2009; Kim e Diehl, 2009; Santarius et al., 2010). Cerca de 80-90% dos tumores, apresentam alterações em ciclinas CDK4 e CDK2, contribuindo para o desenvolvimento tumoral (Malumbres, 2001). Deste modo, as proteínas CDKs podem ser importantes alvos terapêuticas para o tratamento do melanoma.

2.5. Morte celular programada

Não somente os eventos de proliferação, mas também os mecanismos de mortes celulares são essenciais para o desenvolvimento e manutenção nos seres vivos, sendo importante manter o equilíbrio no número de células vivas com número de células mortas afim de regular a homeostase tecidual, função imunológica e supressão tumoral (Ouyang et al., 2012; Walsh, 2014). Apoptose, necrose programada e autofagia são os três principais tipos de morte celular programada, distintos por suas morfologias (Bialik et al., 2010).

2.5.1. Autofagia

O processo de morte celular programada é uma das vias terminais mais importantes em células e tem ganhado atenção nos últimos anos. Uma das formas descritas, corresponde ao processo de autofagia associados ao autofagossomos e autolisossomos (Tsujimoto e Shimizu, 2005).

A autofagia é um processo de auto degradação importante para o balanceamento das fontes energéticas em momentos de restrição de nutrientes e oxigênio além de atuar na remoção de proteínas desnaturadas, organelas danificadas e na eliminação de patógenos intracelulares. Há três tipos de autofagia: microautofagia, macroautofagia, e autofagia dependente de chaperonas, todos promovem a degradação proteolítica dos componentes celulares através dos lisossomos (Glick et al, 2010; Murrow e Debnath, 2013)

Na microautofagia, os componentes celulares são fagocitados diretamente por lisossomos por invaginação da membrana lisossomal. No processo de macroautofagia, é iniciado pela formação de uma membrana lipídica chamado fagóforo em torno dos componentes celulares como proteínas e organelas. As principais proteínas envolvidas são as proteínas fosfatidilinositol 3-cinase classe III e da família Atg. A partir do fagóforo há o englobamento final destes componentes formando uma dupla membrana, o autofagossoma que se funde ao lisossoma degradando o seu conteúdo por enzimas lisossomais (Van Limbergen et al., 2009). E por último a autofagia dependente de chaperonas é mediada por chaperonas específicas que translocam proteínas com “defeito” para o lúmem lisossomal através da membrana e são reconhecidas pela proteína da membrana associada ao lisossomo tipo 2 (LAMP-2A) (Massey et al., 2006).

2.5.2. Apoptose

A apoptose, uma forma de morte celular programada, é parte de um processo natural atuando como mecanismo de defesa contra células danificadas, estressadas e estimuladas por algum agente para prevenir a perda da homeostase e integridade tecidual (Elmore, 2013). Além disso, tem um papel crucial nos primeiros estágios da vida a fim de gerar um indivíduo saudável. Embora o termo “apoptose” tenha sido utilizado primeiramente por Kerr et. al. (1972), as primeiras descrições da apoptose foi através de estudos com nematoide *Caenorhabditis elegans*, elucidando alguns mecanismos moleculares (Zou et al., 1997).

Em uma célula apoptótica, uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas ocorrem tanto no núcleo quanto no citoplasma. Algumas destas mudanças incluem encolhimento celular, modificações observadas na membrana e no núcleo celular como picnose (condensação extrema da cromatina) e cariorrexe (fragmentação do núcleo)

(Manjo e Joris, 1995; Power et al., 2002). Na membrana plasmática, há a externalização da fosfatidilserina, um fosfolípido encontrado na parte citosólica da membrana plasmática (Fadok et al., 1998; Suzuki et al., 2014). Em células apoptóticas, a fosfatidilserina é exposta na superfície da célula e são reconhecidas por macrófagos resultando em fagocitose que impedem reações inflamatórias, uma vez que não há extravasamento celular (Hengartner, 2000; Rock e Kono, 2008; Mioka et al., 2014). Estes eventos sucedem a formação de corpos apoptóticos que contém DNA fragmentado por endonucleases (Nagata et al., 2003).

Outra característica da apoptose é a ação proteolítica de um grupo de proteases aspartato-cisteína, conhecidas como caspases, encontradas inativas no citoplasma, na intermembrana das mitocôndrias e na matriz nuclear (Stennicke e Salvesen, 1998; Ferraro et al., 2002). São uma família de proteínas conservadas nos mamíferos, que ao serem ativadas por estímulos apoptóticos, estas proteínas clivam moléculas consideradas vitais para as células como também são responsáveis por ativarem endonucleases, responsáveis por degradar o DNA nuclear (Lavrik et al., 2005; Yoshida et al., 2006). Há 14 tipos de caspases humanas conhecidas sendo divididas em dois grupos: as caspases iniciadoras que incluem caspases -2, -8, -9 e -10 e as caspases executoras que incluem -3, -6 e -7, 6 participam do processo de apoptose (3, 6, 7, 8, 9 e 10) (Nicholson e Thornberry, 1997; McIlwain et al., 2013).

As caspases estão relacionadas a três vias de apoptose (Figura 5). Na via extrínseca, inicia-se através das moléculas ligante de Fas ou $TNF\alpha$ que se ligam a receptores de morte na membrana celular (Hengartner, 2000). Estes receptores têm domínios de morte que recrutam proteínas adaptadoras como a FADD (Schneider e Tschopp, 2000). Por sua vez, estas proteínas adaptadoras ativam pró-caspase 8, que degradam substratos e ativam as caspases efetoras 3 e 7 iniciando a apoptose (Taylor et al., 2008; Walsh et al., 2008).

A via intrínseca, inicia-se por danos irreparáveis no DNA, hipóxia, alta concentração de cálcio ou danos por estresse oxidativo em organelas como as mitocôndrias (Elmore, 2013). Todos estes caminhos resultam na perda do potencial de membrana mitocondrial, altera o transporte de elétrons e liberação de moléculas pró-apoptóticas como o citocromo-c no citoplasma (Danial e Korsmeyer, 2004). A permeabilidade da membrana é regulada por proteínas pertencentes a família Bcl-2

(Tsujiimoto et al., 1984). Esta família é dividida proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bak, Bix, Bid, Bim, Bcl-Xs e Hrk) e proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1). Enquanto que proteínas anti-apoptóticas bloqueiam a liberação de citocromo c evitando a apoptose, as proteínas pró-apoptóticas promovem sua liberação. O aumento de proteínas pró-apoptóticas ou a diminuição de proteínas anti-apoptóticas gera uma resposta metabólico que desencadeia o processo de apoptose (Reed, 1997).

A terceira via é dependente de granzima B, presente em linfócitos T citotóxicos e células NK (Anthony et al., 2010). Além da granzima B, os linfócitos T citotóxicos também liberam perforina, responsável pela abertura de poros nas membranas das células alvo que permitem a entrada da granzima B (Cao et al., 2007). Esta granzima B ao entrar nas células, ativam caspase 3 e 7, iniciando a apoptose (Adrain et al., 2005).

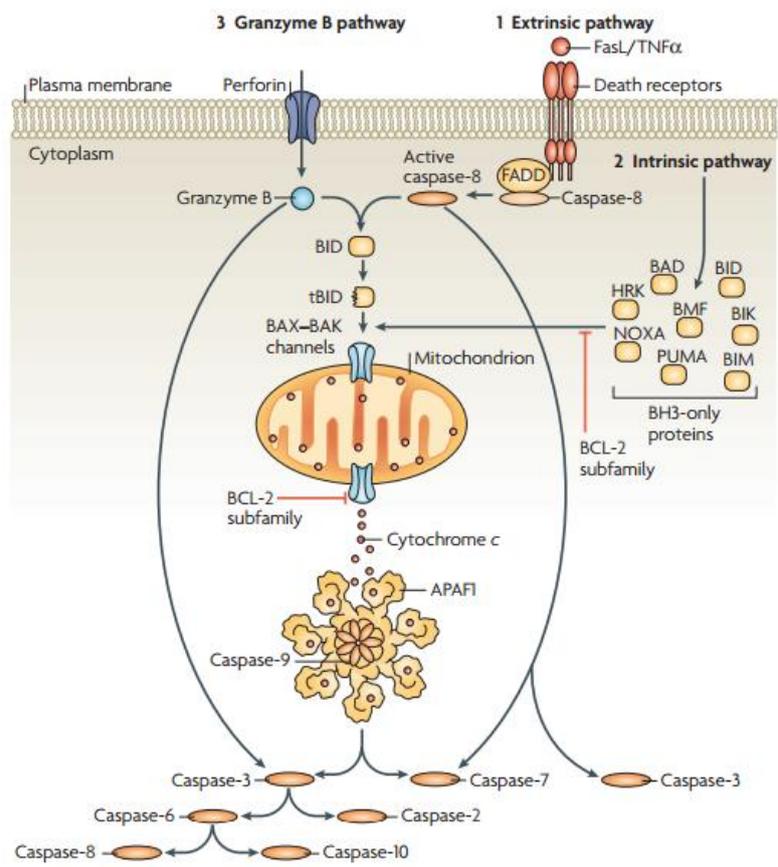


Figura 5. Esquematização das três vias ativadas na apoptose (Taylor et al., 2008).

2.5.3. Necrose acidental e necrose regulada

A morte celular por necrose difere da morte por apoptose em vários aspectos morfológicos e bioquímicos (Figura 6). A apoptose é morfológicamente caracterizada por integridade celular, formação de núcleos apoptóticos e condensação das cromatinas. Por outro lado, a necrose está relacionada a lesão e rompimento na membrana celular com extravasamento do conteúdo citoplasmático, aparecimento de vacúolos e está associada a respostas inflamatórias (Vandenabeele et al., 2010).

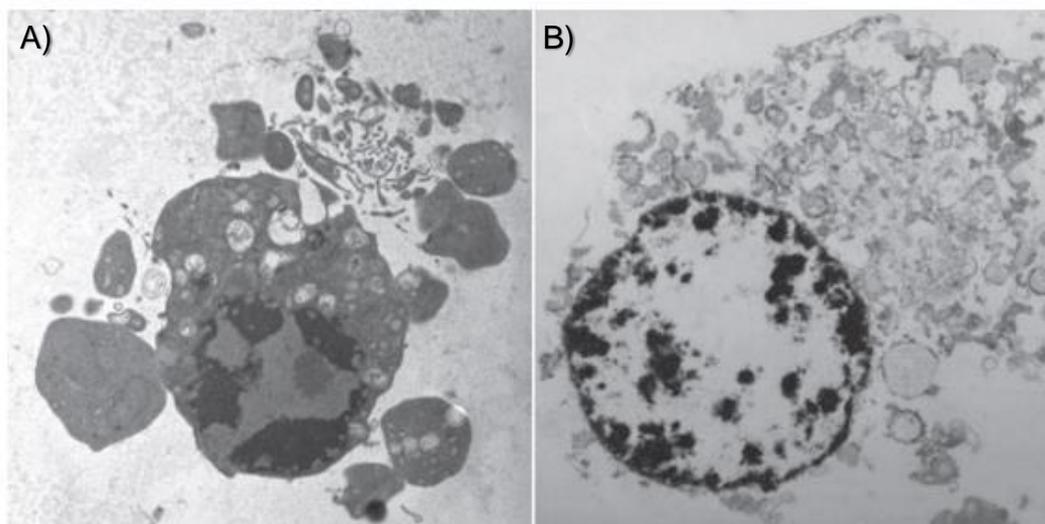


Figura 6. Células em morte celular por A) apoptose (formação de núcleos apoptóticos) e B) necrose (extravasamento do conteúdo citoplasmático. Visualizado por microscopia eletrônica. (Vandenabeele et al., 2010)

Por muito tempo, a necrose foi considerada somente como uma forma incontrolada de morte celular, mas através de estudos recentes mostram que a morte celular por necrose é caracterizado por complexas vias de transdução de sinais e mecanismos regulados de execução (Berghe et al., 2010). Esta natureza desregulada da necrose foi questionada em 1988 quando foi descoberto que ao induzirem diversas linhagens celulares à morte por $TNF\alpha$, as células apresentaram aspectos morfológicos característicos de apoptose sem a desintegração nuclear (Laster et al., 1988). Desde então, foi estabelecido o termo “necroptose” para descrever situações em que a

necrose apresentasse uma morte regulada e programada, diferenciando-se da necrose acidental (Vandenabeele et al., 2010).

A necroptose é um tipo de necrose regulada que depende de uma extensa relação entre eventos bioquímicos e moleculares. Os principais desencadeadores desta via de morte celular são receptores de fator de necrose tumoral (TNF), receptores Toll-like, receptores de linfócitos-T e compostos antitumorais (Su et al., 2015). Estes receptores ao serem ativados, desencadeiam sinalizações que culminam na ligação de uma proteína quinase de interação com o receptor 1 (RIPK1) com a proteína quinase de interação com o receptor 3 (RIPK3) através do motivo RIP de interação homotípica (RHIM) (Moriwaki e Chan, 2013). A fosforilação de RIPK3 pela RIPK1 recruta seu substrato, a proteína de domínio quinase de linhagem mista (MKLK). O complexo RIPK1-RIPK3-MKLK, também denominado de necrossomo ativa oligômeros de MLKL que inativam proteínas funcionais e se translocam para membranas intracelulares levando-as a ruptura. (Sun et al., 2012; Dondelinger et al., 2014; Jouan-Lanhouet et al., 2014). Estes eventos estão associados à excessiva produção de espécies reativas de oxigênio e permeabilização lisossomal (Festjens et al., 2006).

2.6. Compostos naturais e o câncer

As plantas representam a base da medicina tradicional e os primeiros relatos de uso aparece em 2600 a.C. na Mesopotâmia (Cragg e Newman, 2013) com substâncias que são utilizadas até hoje para o tratamento de doenças como resfriados e infecções (Gurib-Fakim, 2006). Estima-se que cerca de 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais na terapia tradicional para os cuidados primários de saúde (Prakash et al., 2013).

A descoberta de medicamentos provenientes de plantas medicinais exerce papel fundamental no tratamento de câncer (Newman e Cragg, 2012). Anticancerígenos derivados de produtos naturais amplamente conhecidos tais como alcaloides da vinca, paclitaxel, podofilotoxina e etoposida são exemplos que reforçam a busca por novos agentes (Younes et al., 2007). Desde 1940 até o final de 2014, das 175 moléculas aprovadas pela entidade Food and Drug Administration dos EUA para o tratamento do

câncer, 85 eram produtos naturais ou derivados diretamente deles (Newman e Cragg, 2016).

Não somente a atividade anticancerígena, mas também outras propriedades terapêuticas estão relacionadas intimamente com os metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Os metabólitos secundários são substâncias produzidos por vias bioquímicas secundárias atuando na defesa contra herbivoria, ataque de patógenos, atração de polinizadores, para comunicação ou proteção contra fatores externos como raios UV, condições climáticas, escassez de água e nutrientes (Ferreira e Pinto, 2010; Kennedy et al., 2011). Dentre estes metabólitos, encontra-se os polifenóis, um grupo heterogêneo de substâncias biossintetizadas a partir do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico (Manach et al., 2005). Todos eles têm em comum um ou mais grupos fenólicos em sua estrutura química que podem ser divididos em flavonoides (agrupados em seis classes: flavonol, flavonas, flavanonas, flavanol, antocianinas e isoflavonas) e não-flavonóides (Dzialo, 2016).

Tanto flavonoides quanto outros polifenóis tem demonstrado atividade citotóxica através de vários mecanismos de morte em linhagens de células tumorais, incluindo melanoma. (Moon et al., 2006; Syed et al., 2014; Rivera et al., 2016). Esta atividade pode ser mediada pela ação pró-oxidante dos polifenóis sobre as células tumorais, que em certas condições aumentam a produção de ROS levando-os a morte celular (Prochazkova et al., 2011). Os compostos podem atuar de forma direta na formação de radicais peroxil ou ligar-se com metais de transição envolvidos no ciclo redox (Hadi et al., 2007). Este radical peroxil pode reagir com o oxigênio e formar o radical superóxido e interagir com o DNA e outros componentes essenciais para o funcionamento celular. Os derivados de catequinas, por exemplo epigalocatequinas e quercetinas, são amplamente estudados como agentes pró-oxidantes em que promoveram citotoxicidade por aumento nos níveis de ROS em linhagens leucêmicas humanas (Oikawa et al., 2003). Outros compostos fenólicos como o piceatanol podem interagir com íons de cobre e promover a reação de Fenton que geram ROS induzindo a clivagem do DNA em células tumorais (Li et al., 2012). Há também a atuação destes compostos naturais atuando em outras vias agindo por diferentes mecanismos envolvidos na indução de apoptose e influência no ciclo celular (Goker et al., 2014; Wang et al., 2015).

Esta atividade pró-oxidante dos polifenóis estão bem descritos na literatura uma vez que várias drogas quimioterápicas consagradas no tratamento de vários tipos de câncer como paclitaxel, cisplatina e doxorrubicina atuam de maneira similar causando estresse oxidativo e danos em macromoléculas intracelulares (López-Lázaro, 2007). Portanto, tendo em vista a potente atividade biológica dos produtos naturais, é necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento do câncer buscando abordar a química dos compostos e os mecanismos de ação.

2.7. Gênero *Senna*

A família Fabaceae, antes denominada de Leguminosidae é a terceira maior família de angiospermas compreendendo cerca de 730 gêneros e 19.325 espécies registradas atualmente, e subdivididas em três subfamílias (De Paula e De Oliveira, 2007; Dutra, 2008) sendo Mimosoideae, Faboideae e Caesalpinioideae. No Brasil há a ocorrência de cerca de 1500 espécies divididos em 200 gêneros.

A subfamília Caesalpinioideae abrange cerca de 171 gêneros e 2.250 espécies, típicas de regiões tropicais e encontradas nos continentes da Ásia, América e África (Garcia e Dutra, 2004; Lewis et al., 2005; Dutra, 2008). A Caesalpinioideae reúne representantes arbóreos e arbustivos, cuja principais características são: cálice dialissépalo, dialipétalas, folhas pinadas e bipinadas com prefloração imbricada carenal (Polhill e Raven, 1981).

O gênero *Senna* é integrante da Caesalpinioideae, distribuída na América Central e Sul com mais de 350 espécies. No Brasil, cerca de 60 espécies encontram-se ao longo do cerrado, em campos aberto no Centro-Oeste, Sudeste e parte da Amazônia (Carvalho e Oliveira, 2003; Araújo e Souza, 2007). Recentemente, algumas espécies de *Cassia*, consideradas sinonímias de *Senna*, tiveram sua taxonomia reclassificadas passando a pertencer ao gênero *Senna*. Dentre alguns exemplos temos: *Senna alata*, *Senna alexandria* e *Senna angustifolia* (Silva et al., 2010). Em estudos realizados com o gênero *Senna*, Rodrigues et al. (2009) encontraram compostos fitoquímicos pertencentes a classe dos polifenóis, polissacarídeos e antraquinonas.

Há diversos estudo científicos de espécies de *Senna* elucidando suas atividades antiparasitárias (Ibrahim et al., 2010), atividades antimicrobianas (Jothy et al., 2012),

antidiabética (Varghese et al., 2013), antioxidante (Mokgotho et al., 2013), anti-inflamatória (Susunaga-Notario et al. 2014) e anticancerígena utilizando algumas linhagens tumorais (Pereira et al., 2016).

2.8. *Senna velutina*

Senna velutina é uma planta arbustiva pertencente à família Fabaceae (Figura 7) conhecida popularmente como são João ou vermelhinho (Saiki et al., 2008; Loverde-Oliveira et al., 2010). Esta planta é nativa no Brasil com vasta distribuição no Cerrado e no pantanal sul mato-grossense além de outras regiões como o Sudeste e Norte brasileiro. Na América do Sul é encontrada em países como Bolívia, Guiana, Paraguai e Venezuela (Figura 8) (Souza e Bortoluzzi, 2014; Marazzi et al., 2006).



Figura 7. Espécie *Senna velutina*, pertencente à família Fabaceae. (Foto tirada por Glaucia Neves)

Em comunidades locais do Mato Grosso do Sul, esta planta é utilizada na medicina popular para o tratamento e prevenção de algumas enfermidades como hipercolesterolemias, problemas hepáticos e infecciosos. Há relatos etnobotânicos de

seu uso para o tratamento de dermatites através da decoção das cascas na região Nordeste do Brasil (Angra et al., 2007)



Figura 8. Distribuição espacial de *Senna velutina* na América do Sul (Fonte: Global Biodiversity Information Facility).

Apesar de ser utilizada popularmente por comunidades locais, não há estudos científicos que validem tais atividades. Diante disto, a bioprospecção desta espécie torna-se necessária por conter uma diversidade de moléculas bioativas com potencial antitumoral abrindo possibilidades para se tornar um novo produto natural auxiliando no tratamento do melanoma.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Investigar a composição química do extrato etanólico das raízes de *Senna velutina*, avaliar seus efeitos antitumorais do *in vitro* e *in vivo* contra células de melanoma B16F10-Nex2 e identificar os possíveis mecanismos de ação do extrato.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar compostos presentes no extrato, relacionando-as com as atividades biológicas apresentadas
- Avaliar o potencial citotóxico do extrato das raízes;
- Determinar o mecanismo de morte do extrato das raízes em linhagem de células tumorais B16F10-Nex-2;
- Investigar a ação antitumoral do extrato sob o desenvolvimento neoplásico em modelo de volume tumoral cutâneo em camundongos;
- Investigar a ação antitumoral do extrato em modelo de metástase pulmonar em camundongos;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 4663-4673.

Agra MF, Freitas PF, Barbosa Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 14: 114-140.

Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 133: 945-972.

Alves, HM. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*. 2001; 3: 10-15.

Anthony DA, Andrews DM, Watt SV, Traoani JA, Smyth MJ. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. *Immunology Reviews*. 2010; 235: 73-92.

Araújo AO, Souza VC. Uma nova espécie de *Senna* Mill. (Leguminosae – Caesalpinioideae) do Brasil. *Rodriguésia* 2007; 58: 359-362.

Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Internacional Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 1997; 29: 559–573.

Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi A M, Maio, M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of translational medicine*. 2012; 10; 1.

Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, Paradise C. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of Clinical Oncology*. 1999; 17: 2105-2105.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; 27: 6199–6206.

Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatology research and practice*. 2010: 2010.

Bates SE, Amiri-Kordestani L, Giaccone G. Clinical drug development: portals of discovery. *Cancer Research*. 2012; 18: 23–32.

Berghe TV, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Vandenaabeele P. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death & Differentiation*. 2010; 17: 922-930.

Bialik S, Zalckvar E, Ber Y, Rubistein AD, Kimchi A. System biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochemical Sciences*. 2010; 35: 556-564.

Blain, SW, Montalvo E, Massagué J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 25863-25872.

Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JA, David JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. 2010.

Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, Ley TJ. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007; 27: 635-646.

Carvalho DA, Oliveira PE. Biologia reprodutiva e polinização de *Senna sylvestris* (Vell.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica*. 2003; 26: 319-328.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, et al. BRIM-3 Study Group: Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*. 2011; 364: 2507–2516.

Clark Jr WH. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biological behavior. *Advances in the Biology of the Skin*. 1967; 8: 621–647.

Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1830: 3670-3695.

Danial NN, Korsmeyer SJ: Cell death: critical control points. *Cell*. 2004; 116: 205-219.

da Rocha Dias S, Salmonson, T, van Zwieten-Boot B, Jonsson B, Marchetti S, Schellens JH, Pignatti F. The European Medicines Agency review of vemurafenib (Zelboraf®) for the treatment of adult patients with BRAF V600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma: summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *European Journal of Cancer*. 2013; 49: 1654-1661.

De Paula OC, de Oliveira DMT. Ocorrência de coléteres em embriões de três espécies de *Chamaecrista Moench* (Fabaceae: Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Biociências*. 2007; 5: 348-350.

Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, Roelandt R, Goncalves A, Bruggeman I, Hulpiau P, et al. MLKL Compromises Plasma Membrane Integrity by Binding to Phosphatidylinositol Phosphates. *Cell Reports*. 2014; 7: 971–81.

Draetta G, Beach D. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell*. 1988; 54: 17–26.

D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Internacional Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14: 12222–12248.

Dzialo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17: 160.

Dutra VF, Garcia FCP, de LIMA HC. Caesalpinioideae (Leguminosae) nos Campos Rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasileira* [online]. 2008, 22: 547-558.

Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *The Lancet*. 2014; 383: 816-827.

Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G 1 cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Current opinion in cell biology*. 2000; 12: 676-684.

Elisabestky, E. *Etnofarmacologia. Ciência e Cultura*. 2003; 55: 35-36.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2013; 35: 495-516.

Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Internacional Journal of Cancer*. 1997; 73: 198–203.

Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation*. 1998; 5: 551-562.

Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard JP, Genestier L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *Journal of Immunology*. 2002; 169:4805-4810.

Ferreira VF, Pinto AC. A fitoterapia no mundo atual. *Química Nova*. 2010; 33: 1829p.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1757: 1371–1387.

Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature*. 2007; 445: 834–842.

Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline—Update 2012. *European Journal of Cancer*. 2012; 48: 2375-2390.

Garcia FCP, Dutra VF. Leguminosae nos Campos Rupestres. In: CD-ROM. Simpósios, palestras e mesas redondas do 55º Congresso Nacional de Botânica. Alpha Mídia Assessoria Fonográfica. 2004.

Garrett, M. A. Cell cycle control and cancer. *Current Science*. 2001; 81: 515-522.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*. 2010; 221: 3-12.

Goker B, Caliskan C, Caglar HO, Kayabasi C, Balci T, Tepedelen BE, Gunel MK. Synergistic effect of ponatinib and epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells through altering expressions of cell cycle regulatory genes. *Journal of B.U.ON*. 2014; 19: 992-998.

Guerry D, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D. Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *Journal of investigative dermatology*. 1993; 100: 342-345.

Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27: 1-93.

Gyllenhaal C, et al. Ethnobotanical approach versus random approach in the search for new bioactive compounds: support of a hypothesis. *Pharmaceutical biology*. 2012; 50: 30-41.

Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U, Ullah MF. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. In *Seminars in cancer biology*. 2007; 17: 370-376).

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989; 246: 629–634.

Hartman ML, Czyz M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. *Cancer Letters*. 2013; 331: 24-34.

Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*. 2000; 104: 325-328.

Hirobe, T. Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sinica*, 2014; 32, 200-204.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012; 150: 251–63.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 2013; 13: 714-726.

Ibrahim MA, Aliyu AB, Sallau AB, Bashir M, Yunusa I, Umar TS. Senna occidentalis leaf extract possesses antitrypanosomal activity and ameliorates the trypanosome-induced anemia and organ damage. *Pharmacognosy Research*. 2010; 2: 175p.

Instituto Nacional do Câncer – INCA Disponível em URL: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_nao_melano_ma. Acesso em 09/07/2016.

Iwamoto T. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2013; 36: 715-718.

Janjetovic K, Harhaji-Trajkovic L, Misirkic-Marjanovic M, Vucicevic L, Stevanovic D, Zogovic N, Trajkovic V. In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *European journal of pharmacology*. 2011; 668: 373-382.

Jothy SL, Torey A, Darah I, Choong YS, Saravanan D, Chen Y, Sasidharan S. Cassia spectabilis (DC) Irwin et Barn: A promising traditional herb in health improvement. *Molecules*. 2012; 17: 10292-10305.

Jouan-Lanhouet S, Riquet F, Duprez L, Berghe TV, Takahashi N, Vandenabeele P. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2014; 35: 2–13.

Junttila MR, Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013; 501: 346-354.

Keenan SM, Lents NH, Baldassare JJ. Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation

of E2F, and G1-S phase progression. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 5387-5396.

Kennedy DO, Wightman EL. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2011; 2: 32-50.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972; 26: 239-257.

Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: An oncogenic driver in human cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2009; 220: 292–296.

Kushnir I, Merimsky O. The Evolution in Melanoma Treatment as a reflection of precision-oriented medicine. *Oncology Letters*. 2013; 5: 424-426.

Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis, *Journal of Immunology*. 1988; 141: 2629–2634.

Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal Clinical Investigation*. 2005; 115: 2665-2672.

Lee CS, Ryan EJ, Doherty GA. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20: 3751-3761.

León-González AJ, Auger C, Schini-Kerth VB. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochemical pharmacology*. 2015; 98: 371-380.

Lewis GP, Schrire BD, Mackinder BA, Lock JM. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens Kews. 2005: 2005.

Li Z, Yang X, Dong S, Li X. DNA breakage induced by piceatannol and copper (II): mechanism and anticancer properties, *Oncology Letters*. 2012; 3: 1087–1094.

López-Lázaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer letters*. 2007; 252: 1-8.

Loverde-Oliveira SM, Freitas MN, Araújo PKB, Costa IBC. Fragmento de cerrado urbano da Universidade Federal de Mato Grosso, campus de Rondonópolis, Mato Grosso. *Biodiversidade*. 2011; 9.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Review of Cancer*. 2009; 9: 153–166.

Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Review of Cancer*. 2001; 1: 222–231.

Mandalá M, VOIT C. Targeting BRAF in melanoma: Biological and clinical challenges. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 2013; 87: 239-255.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005; 81: 230-242.

Manjo G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*. 1995; 146: 3-15.

Mansur AP, Favarato D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. *Arquivo Brasileiro de cardiologia*. 2012; 99: 755-761.

Marazzi B, Fortunato RH, Endress PK, Spichiger R. Senna (Cassiinae, Leguminosae) in Paraguay: synopsis, occurrence, ecological role and ethnobotany. *Candollea*. 2006; 61: 315-329.

Massey, AC, Zhang C, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Current Topics in Developmental Biology*. 2006; 73: 205-235.

McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013; 5: a008656.

Micozzi MS.. *Alternative or Complementary Medicine: Opportunities for Integration*. *Skin medicine*. 2003; 2: 154-155.

Mioka T, Fujimura-Kamada K, Tanaka K. Asymmetric distribution of phosphatidylserine is generated in the absence of phospholipid flippases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Open*. 2014; 3: 803-821.

Mokgotho MP, Gololo SS, Masoko P, Mdee LK, Mbazima V, Shai LJ, Mampuru, L. Isolation and chemical structural characterisation of a compound with antioxidant activity from the roots of *Senna italica*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013.

Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro*. 2006; 20: 187-210

Moriwaki K, Chan FKM. RIP3: A Molecular Switch for Necrosis and Inflammation. *Genes and Development*. 2013; 27: 1640–49.

Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annual Review of Pathology*. 2013; 8: 105–37.

Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2003; 10: 108-116.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*. 2007; 70: 461-477.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*. 2016; 79: 629-661.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as Sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 2012; 75: 311-335.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*. 1997; 22: 299-306.

Nogueira JM, Rey CM, Arbizu MV. Adjuvant treatment of melanoma. *Revisiónes en Cancer*. 2007; 21: 177.

Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry*. 1992; 61: 441–470.

Oikawa S, Furukawa A, Asada h, Hirakawa K, Kawanishi S. Catechins induce oxidative damage to ulnar and isolated DNA through the generation of reactive oxygen species, *Free Radicals Research*. 2003; 37: 881–890.

Oliveira VB, Yamada LT, Fagg CW, Brandão MG. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International*. 2012; 48: 170-179.

Omholt K, Krockel D, Ringborg U, Hansson J. Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Research*. 2006; 16: 197–200.

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death & Differentiation*. 2003; 10: 431-442.

Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002; 1602: 73–87.

Osborne, C; Wilson, P; Tripathy, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The oncologist*, v. 9, n. 4, p. 361-377, 2004.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F-T, Zhou T-T, Liu B, Bao J-K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*. 2012; 45:487-498.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989; 246: 603–608.

Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, Ribas A. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Research*. 2011; 71: 2750–2760.

Pereira RM, Ferreira-Silva GÁ, Pivatto M, de Ávila Santos L, da Silva Bolzani V, de Paula DAC, Ionta M. Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (-)-cassine and (-)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression. *Toxicology in Vitro*. 2016; 31: 86-92.

Peres, LEP. Metabolismo Secundário. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo. 2004: 1-10.

Polhill RM, Raven PH. Advances in legume systematics. *Advances in legumes systematics*. 1981; 1049p

Power C, Fanning N, Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock*. 2002, 18: 197-2011.

Prakash OM, Kumar A, Kumar P. Anticancer potential of plants and natural products: A review. *American Journal of Pharmacological Sciences*. 2013; 1: 104-115.

Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and pro-oxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*. 2011; 82: 513–523.

Ram M, Shoenfeld Y. Harnessing autoimmunity (vitiligo) to treat melanoma: a myth or reality? *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007; 1110: 410-425.

Ramnath N, Adjei A. Inhibitors of Raf kinase and MEK signaling. *Update on Cancer Therapeutics*. 2007; 2: 111– 118.

Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in haematologic malignancies. *Seminars in Haematology*. 1997; 34: 9-19.

Reed RJ. Acral lentiginous melanoma. *New Concepts in Surgical Pathology of the Skin*. 1976: 89–90.

Rivera AR, Castillo-Pichardo L, Gerena Y, Dharmawardhane S. Anti-Breast Cancer Potential of Quercetin via the Akt/AMPK/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade. *Plos one*. 2016; 11: e0157251.

Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology*. 2008 3: 99.

Rodrigues IMC, Souza Filho APS, Ferreira FA. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta daninha*. 2009; 27: 507-513.

Roskoski R, RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2010; 399: 313-317.

Saiki PTO, Silva B, Lomônaco C. Expression of reproductive and vegetative characters of *Senna velutina* (Vogel) HS Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) in two distinct "cerrado" environments. *Brazilian Journal of Botany*. 2008; 31: 363-369.

Sanada M, Takagi Y, Ito R, Sekiguchi M. Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: effects of Mgmt and Mlh1 mutations. *DNA Repair*. 2004; 3: 413-420.

Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nature Review of Cancer*. 2010; 10: 59–64.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Development*. 1999; 13: 1501–1512.

Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 2000; 74: 281-286.

Shah DJ, Dronca RS. Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma. *Mayo Clinical Proceedings*. 2014; 89: 504–519.

Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*. 2016; 16: 345-358.

Silva DHS, Viegas Júnior C, Santos LDÁ, Castro-Gamboa I, Cavalheiro AJ, Bolzani VDS, Fraga, CAM. Espectralina, cassina e análogos semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. *Revista Virtual de Química*. 2010; 2: 38-46.

Simões CMO, Schenkel EP. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista brasileira de farmacognosia*. 2002; 12: 35-40.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick, PR. *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*. Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina. 2010; 6: 1102.

Simões MCF, Sousa JJS, Pais AACC. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters*. 2015; 357: 8-42.

Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008; 7:2876-83.

Sober AJ, Chuang TY, Duvic M, Farmer ER, Grichnik JM, Halpern AC, Lowery BJ. Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2001; 45: 579-586.

Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M, Chapter Eleven - Intratumoral Heterogeneity as a Therapy Resistance Mechanism: Role of Melanoma Subpopulations. *Advances in Pharmacology*. 2012; 65: 335–59.

Souza VC, Bortoluzzi RLC. Senna in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2014.

Spatz A, Batist G, Eggermont AMM. The biology behind prognostic factors of cutaneous melanoma. *Current Opinion in Oncology*. 2010; 22: 163–168.

Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998; 1387: 17-31.

Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer* 2015; 14: 48.

Sullivan RJ, Flaherty KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *European Journal of Cancer*. 2013; 49: 1297-1304.

Sun, L, Huayi W, Zhigao W, Sudan H, She C, Daohong L, Lai W, et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase. *Cell*. 2012; 148: 213–27.

Susunaga-Notario ADC, Pérez-Gutiérrez S, Zavala-Sánchez MÁ, Almanza-Pérez JC, Gutiérrez-Carrillo A, Arrieta-Báez D, Alarcón-Aguilar FJ. Bioassay-guided chemical study of the anti-inflammatory effect of *Senna villosa* (Miller) HS Irwin & Barneby (Leguminosae) in TPA-induced ear edema. *Molecules*. 2014; 19: 10261-10278.

Suzuki J, Imanishi E, Nagata S. Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289: 30257-30267.

Syed DN, Chamcheu JC, Khan MI, Sechi M, Lall RK, Adhami VM, Mukhtar H. Fisetin inhibits human melanoma cell growth through direct binding to p70S6K and mTOR: Findings from 3-D melanoma skin equivalents and computational modeling. *Biochemical pharmacology*. 2014; 89: 349-360.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Review of Molecular Cell Biology*. 2008; 9: 231-241.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocation. *Science* 1984, 226: 1097-1099.

Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*. 2005; 12: 1528-1534.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Berghe TV, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews*. 2010; 11: 700-714.

Van der Geer S, Siemerink M, Reijers HA, Verhaegh ME, Ostertag JU, Neumann HA, Krekels GA. The incidence of skin cancer in dermatology. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2013; 38: 724–729.

Van Limbergen J. et al.,. Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal Immunology*. 2009; 2: 315–30.

Varghese GK, Bose LV, Habtemariam S. Antidiabetic components of *Cassia alata* leaves: identification through α -glucosidase inhibition studies. *Pharmaceutical biology*. 2013; 51: 345-349.

Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiotherapy*. 2001; 5: 109–129.

Vousden KH. Outcomes of p53 activation-spoilt for choice. *Journal of cell science*. 2006; 119: 5015-5020.

Vultur A, Villanueva J, Herlyn M. Targeting BRAF in advanced melanoma: a first step toward manageable disease. *Clinical Cancer Research*. 2011; 17: 1658–1663.

Yoshida A, Pommier Y, Ueda T. Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells. *International Journal of Hematology*. 2006; 84: 31-37.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997; 90: 405–413.

Walsh CM. Grand challenges in cell death and survival: apoptosis vs. Necroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology. Cell Death and Survival*. 2014; 2: 4p.

Walsh JG; Cullen SP, Sheridan C, LUTHI AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105: 12815-12819.

Wang X, Wang D, Zhao Y. Effect and Mechanism of Resveratrol on the Apoptosis of Lung Adenocarcinoma Cell Line A549. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2015; 73: 527-531.

Weinberg RA. *A biologia do cancer*. Porto Alegre. Artmed. 2008, 864p

Wellbrock C. Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 80: 561– 567.

Welsh SJ, Corrie PG. Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2015; 7: 122-136.

The World Health Organization. Media centre. Cancer. Disponível em URL: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em 17/05/2016

Younes, R. N; Varella, A. D.; Suffredini. Review discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plants using high throughput screening. Clinics. 2007; 62: 763–768.

5. ANEXOS

Artigo aceito

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2019, Article ID 5719483, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/5719483>



Research Article

Ethanollic Extract of *Senna velutina* Roots: Chemical Composition, *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Effects, and B16F10-Nex2 Melanoma Cell Death Mechanisms

David Tsuyoshi Hiramatsu Castro,¹ Jaqueline Ferreira Campos,¹ Marcio José Damião,¹
Heron Fernandes Vieira Torquato,² Edgar Julian Paredes-Gamero,^{2,3}
Carlos Alexandre Carollo ,⁴ Elaine Guadalupe Rodrigues,⁵ Kely de Picoli Souza ,¹
and Edson Lucas dos Santos ¹

¹Research Group on Biotechnology and Bioprospecting Applied to Metabolism (GEBBAM), Federal University of Grande Dourados, Dourados, CEP: 79804-970 MS, Brazil

²Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, CEP: 04044-020, SP, Brazil

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, CEP: 79070-900, MS, Brazil

⁴Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, CEP: 79070-900 MS, Brazil

⁵Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo (EPM-UNIFESP), São Paulo, CEP: 04023-062 SP, Brazil

A
A

Ethanollic extract of *Senna velutina* roots: Chemical composition, *in vitro* and *in vivo* antitumor effects and B16F10-Nex2 melanoma cell death mechanisms

David Tsuyoshi Hiramatsu Castro¹, Jaqueline Ferreira Campos¹, Marcio José Damião¹, Heron Fernandes Vieira Torquato², Edgar Julian Paredes-Gamero³, Carlos Alexandre Carollo³, Elaine Guadalupe Rodrigues⁴, Kely de Picoli Souza¹, Edson Lucas dos Santos¹

¹ Research group on Biotechnology and Bioprospecting applied to metabolism (GEBBAM), Federal University of Grande Dourados, Dourados , CEP: 79.804-970 , MS, Brazil.

² Interdisciplinary Center of Biochemistry Investigation, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, CEP 08.780-911, Brazil.

³ Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, CEP: 79070-900, MS, Brazil.

⁴ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo (EPM-UNIFESP), São Paulo, CEP: 04021-001, SP, Brazil.

Correspondence should be addressed to Edson Lucas dos Santos: [orcid.org 0000-0002-6557-7914](https://orcid.org/0000-0002-6557-7914): edsonsantospd@gmail.com

Abstract

Cutaneous melanoma is among the most aggressive types of cancer, and its rate of occurrence increases every year. Current pharmacological treatments for melanoma are not completely effective, requiring the identification of new drugs. As an alternative, plant-derived natural compounds are described as promising sources of new anticancer drugs. In this context, the objectives of this study were to identify the chemical composition of the ethanolic extract of *Senna velutina* roots (ESVR), to assess its *in vitro* and *in vivo* antitumor effects on melanoma cells and to characterize its mechanisms of action. For these purposes, the chemical constituents were identified by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. The *in vitro* activity of the extract was assessed in the B16F10-Nex2 melanoma cell line using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and based on the apoptotic cell count, DNA fragmentation, necrostatin-1 inhibition, intracellular calcium and pan-caspase, caspase-3 activation, reactive oxygen species (ROS) levels and cell cycle arrest. The *in vivo* activity of the extract was assessed in models of tumor volume progression and pulmonary nodule formation in C57Bl/6 mice. The chemical composition results showed that ESVR contains flavonoid derivatives of the catechin, anthraquinones and piceatannol groups. The extract reduced B16F10-Nex2 cell viability and promoted apoptotic cell death as well as caspase-3 activation, with increased intracellular calcium and ROS levels as well as cell cycle arrest at the sub G₀/G₁ phase. *In vivo*, the tumor volume progression and pulmonary metastasis of ESVR-treated mice decreased over 50%. Combined, these results show that ESVR had *in vitro* and *in vivo* antitumor effects, predominantly by apoptosis, thus demonstrating its potential as a therapeutic agent in the treatment of melanoma and other types of cancer.

Keywords: Bioprospection; natural product; cancer; melanoma; cell death.

1. Introduction

Cancer is among the leading causes of death worldwide [1]. In particular, cutaneous melanoma is a potentially lethal form of skin cancer and occurs when melanocytes, cells responsible for producing the melanin pigment, undergo changes mediated by endogenous and/or exogenous events, thereby becoming malignant [2,3]. The main factors responsible for the onset of melanoma are intrinsic and extrinsic. Intrinsic factors primarily include genetic susceptibility and family history, whereas the main extrinsic factor is excessive exposure to ultraviolet radiation [4,5].

In recent decades, the incidence of cutaneous melanoma has increased, and according to the World Health Organization, approximately 132,000 cases of melanoma are diagnosed every year worldwide [6]. Its incidence varies among different populations, and the highest rates are reported in countries such as Australia and New Zealand [7]. When melanoma is detected early, surgical removal increases the treatment efficacy in approximately 99% of cases [8]. Chemotherapy, immunotherapy and molecular therapy are among the main treatments for melanoma [9,10]. Although patient survival rates are increasing, therapies and their combinations are still limited because they cause toxicity [11]. In addition, advanced-stage melanoma is resistant to drug therapy [12].

As an alternative to current therapies, phytochemical molecules have gained prominence as promising agents for the development of new drugs in the treatment of neoplasia [13]. Some studies have demonstrated that these substances show low toxicity in normal cells and act as melanoma treatment adjuvants, enhancing the anticancer effects of chemotherapeutic agents [14,15].

In the scientific literature, the anticancer properties of more than 3000 plant species have been described [16]. Furthermore, in the last 70 years, 175 anticancer

molecules were approved by the Food and Drug Administration (FDA), and 85 of them are derived from natural products or their derivatives [17].

These molecules, known as secondary metabolites, are complex compounds with diverse structures responsible for various biological activities [18]. These characteristics, together with the high degree of biodiversity in Brazil, may provide a promising source of new drugs. The genus *Senna* (Fabaceae) is found in the Brazilian Cerrado and has more than more than 250 species whose antimicrobial [19], antidiabetic [20], antioxidant [21], anti-inflammatory [22] and anticancer [23,24,25] properties have been described.

The species *Senna velutina*, a shrub of the genus *Senna*, commonly known as São João, vermelhinho or Fedegoso-do-Cerrado, is found in the Central-West, Southeast and Northeast regions of Brazil [26,27]. Although the species is used by the population for medicinal purposes, only one article has described the antileukemic activity of the leaves of this plant [24]. However, no scientific study has described the chemical constituents and anticancer properties of the roots of this plant. In this context, the objective of this study was to characterize the chemical composition, assess the *in vitro* and *in vivo* antitumor effects and identify the mechanisms through which the ethanolic extract of *S. velutina* roots (ESVR) promotes B16F10-Nex2 melanoma cell death.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and extract preparation

S. velutina roots were collected in the Cerrado region (Brazilian biome), in the state of Mato Grosso do Sul (S 22° 05' 545'' and W 055° 20' 746''), in the Central-West region of Brazil and identified by a botanist. A dried sample of the species was deposited in the Herbarium of Federal University of Grande Dourados-UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul (MS), Brazil, with registration number 4665. Root collection was authorized by the Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Biodiversity Information and Authorization System; SISBIO, permit number 54470-1). Subsequently, the plant roots were rinsed, dried in an air circulation oven for 15 days at 36°C, pulverized and 200g was then macerated in 95% ethanol (7:1) at room temperature for 7 days. Then, the extract was filtered, and the residue was subjected to the same procedure twice. After 21 days, the filtrate was concentrated in a rotary vacuum evaporator (Gehaka, São Paulo, SP, Brazil) and subsequently freeze-dried (model Savant Micromodulyo, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). The dry extract yield was 23%, calculated using the following formula: extraction yield (%) = (weight of the freeze-dried extract × 100)/(weight of the original sample). The ESVR was stored at -20°C for subsequent experiments.

2.2. Phytochemical analysis

ESVR was analyzed in an ultra-fast liquid chromatograph (UFLC; Shimadzu) coupled to a diode array detector (DAD; Shimadzu) and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometer (ESI-QTOF-micrOTOF QII; operating in the positive and negative ionization modes, 120-1200 Da, Bruker Daltonics). A C-18 column was used (Kinetex,

2.6 μm 150 x 2.2 mm, Phenomenex), protected by a guard precolumn of the same material. The mobile phase was water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), both with 0.1% formic acid, in a gradient of 0-2 min 3% B, 2-25 min 3-25% B and 25-40 min 25-80% B, followed by the washing and reconditioning of the columns (8 min). The flow rate was 0.3 mL/min, and 1 μL (1 mg/mL) of the extract was injected. The other micrOTOF QII parameters were as follows: temperature, 200°C; N₂ gas flow rate, 9 L/min; nebulizer, 4.0 bar; capillary voltage, 3500 V (negative), +4500 V (positive); and internal calibration with sodium trifluoroacetate (TFA-Na) injected at the end of the chromatographic analysis. The catechin and piceatannol authentic standards were purchased from Sigma-Aldrich with $\geq 95\%$ purity. The metabolites present in ESRV were identified based on the interpretation of mass and UV absorption spectra and based on comparison with the literature. When available, the compounds were confirmed by comparison with authentic standards.

2.3. Cell lines and cell cultures

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected after donor consent. Mononuclear cells were separated by centrifugation using Ficoll Histopaque-1077 (1.077 g/cm³) (Sigma-Aldrich, Germany) according to the manufacturer's instructions at 400 x g for 30 min. The use of human blood was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Grande Dourados (UFGD) under protocol 123/12. The murine melanoma subline (B16F10-Nex2) was isolated at the Oncology Experimental Unit (Federal University of São Paulo, UNIFESP) from the B16F10 cell line and cultured in RPMI 1640 medium (Gibco/Invitrogen, Minneapolis, MN) supplemented with 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES, 10

nM) and sodium bicarbonate (24 nM). Human lung fibroblasts (MRC-5), Human Melanoma Cell Lines (SK-Mel-28 and SK-Mel-103) were cultured in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). All cell lines were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), purchased from Gibco/Invitrogen, and 40 mg/mL gentamicin (Hipolabor Farmacêutica, Sabará, MG, Brazil). They were kept in flasks at 37°C in 5% CO₂.

2.4. MTT cell viability assay

The cell viability was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Adherent cells were plated at a density of 5x10³ cells/well, and PBMCs were plated at 10⁵ cells/well in 96-well microtiter plates. After 24 and 48 h, solutions with different ESVR concentrations (25-125 µg/mL), diluted in medium with 0.1% DMSO, were added, and medium with only 0.1% DMSO was used as a control. At the end of both periods, 100 µL MTT (0.5 mg/mL) was added to each well. The cell culture was incubated for another 4 h, and 100 µL of DMSO was then added to solubilize the formazan crystals. The absorbance was determined at 570 nm using a SpectraMax 250 reader (Molecular Devices). Cell viability inhibition was calculated using the following formula:

$$\text{Cell viability (\%)} = [\text{Abs}_{\text{treated cells}} / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100.$$

2.5. Effect of ESVR on B16F10-Nex2 cells

B16F10-Nex2 cells (5×10^3 cells/well) were subjected to solutions with different ESVR concentrations (25-125 $\mu\text{g/mL}$) diluted in RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO for 24h. RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO was used as a control. Subsequently, cell images were acquired under a Nikon TE2000E (Nikon Instruments) microscope (10x objective).

2.6. Cell death profile

The cell death profile was determined using the method described by Paredes-Gamero et al. (2012) [28] with a few modifications. B16F10-Nex2 cells were plated in 48-well plates (10^4 cells/well) and cultured in RPMI 1640 with 10% FBS for 24 h as well as with the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of ESVR (52 $\mu\text{g/mL}$). After this period, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), detached and resuspended in buffer solution (0.01 M HEPES, pH = 7.4, 0.14 M NaCl and 2.5 mM CaCl_2). The suspension was labeled with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (Becton Dickinson, USA) according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated with the IC_{50} concentration of ESVR diluted in the medium to assess whether the extract showed fluorescence under the study parameters. The cells were incubated for 15 min at room temperature, and subsequently, 10,000 events per sample were collected and analyzed in the Accuri C6 flow cytometer (Becton Dickinson, USA) using the software FlowJo v10.2 LCC (Oregon, USA).

2.7. Apoptotic B16F10-Nex2 cell nuclei count

To count the apoptotic cell nuclei, 6×10^4 B16F10-Nex2 cells/well were plated on coverslips in 24-well plates. Subsequently, the cells were treated with 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ESVR diluted in RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO for 24 h. As a control, RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO was used. After this period, the supernatant was discarded, and the cells were washed with PBS twice and fixed with 2% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Then, the cells were washed with PBS and permeabilized with 0.01% saponin for 20 min.

To detect apoptotic nuclei, coverslips were placed on slides and labeled with 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dihydrochloride. Cells were counted under a LEICA DMI 6000B confocal microscope (Leica Microsystems, Germany).

2.8. DNA fragmentation

B16F10-Nex2 cells were plated at 1×10^6 cells/well. After 24 h, the cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ESVR diluted in RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO. RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO was used as a control for 12 and 24 h. Subsequently, the DNA was extracted with phenol/chloroform, followed by incubation with RNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The DNA integrity was visualized in a 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.9. Caspase-3 activity

Caspase-3 activation was assessed by flow cytometry according to the method described by Moraes et al. (2013) [29] with minor modifications. B16F10-Nex2 cells (6×10^4 cells/well) were treated with ESVR (52 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and diluted in RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO for 24 h. RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO was used as a control. After the treatment, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min and then permeabilized with 0.01% saponin in PBS for 20 min at room temperature. Subsequently, the cells were incubated for 1 h with cleaved caspase-3 (Asp175) antibody (Alexa Fluor® 488 conjugate) at room temperature and protected from light. After the incubation period, the fluorescence was acquired in 10,000 events in the Accuri™ C6 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and analyzed using the software FlowJo v8.7. (Ashland, USA).

2.10. Determination of the reactive oxygen species (ROS) levels

ROS levels were determined by flow cytometry using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) dye (Molecular Probe-Life Technologies, Carlsbad, CA). For this purpose, B16F10-Nex2 cells (6×10^4 cells/well) were treated for 24 h with ESVR (52 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluted in RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO, and RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO was used as a control. Subsequently, the cells were trypsinized and incubated with 10 μM H_2DCFDA for 30 min at room temperature and protected from light. After the incubation period, the fluorescence, related to the ROS levels, was acquired in 15,000 events in the Accuri™ C6 flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) and analyzed using the software FlowJo v8.7. (Ashland, US).

2.11. Pan-caspase, intracellular calcium and necrostatin-1 inhibition

To assess the involvement of caspases, intracellular calcium and RIPK1 in ESVR-promoted cell death, B16F10-Nex2 cells (5×10^3 cells/well) were pretreated for 1 h with carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone (Z-VAD-FMK; irreversible, cell-permeant pan-caspase inhibitor), 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra(acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM; cell-permeant calcium chelator) or necrostatin-1 (NEC-1) inhibitor. Then, the cells were treated with ESVR (52 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluted in RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO for 24 h. RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO was used as a control. After this period, the cell viability was determined using the MTT assay, which was previously described in item 2.4.

2.12. Cell cycle phases

The distribution of cell cycle phases was assessed using the method described by Paredes-Gamero et al. (2012) [28]. For this purpose, B16F10-Nex2 cells (6×10^4 cells/well) were treated with ESVR ($\frac{1}{2} \text{IC}_{50} = 26 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $\text{IC}_{50} = 52 \mu\text{g}/\text{mL}$) diluted in RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO for 24 h. RPMI 1640 solution with 0.1% DMSO was used as a control. Subsequently, the cells were fixed and permeabilized as described above and incubated with RNase (4 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Germany) for 1 h at 37°C. For DNA labeling, the cells were incubated with SYTOX Green (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Molecular Probes Inc., Oregon). The percentage of cells at each cell cycle phase (sub G_0/G_1 , S and G_2/M) was determined in 40,000 events in an Accuri™ C6 flow cytometer

(Becton Dickinson, San Jose, CA). The results were analyzed using the software FlowJo v.8.7.

2.13. Animals

Male C57Bl/6 mice 4-6 weeks of age were obtained from the Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (Center for the Development of Experimental Models for Medicine and Biology–Federal University of São Paulo (CEDEME-UNIFESP), São Paulo, Brazil). In all experiments, the “Principles of Laboratory Animal Care” guidelines were followed (National Institute of Health (NIH) publication no. 85-23, revised in 1985), and animal experimentation was performed using protocols approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of São Paulo (UNIFESP) under number 1234/11.

2.14. *In vivo* antitumor assay

Previously cultured B16F10-Nex2 melanoma cells (5×10^4 cells/animals) were subcutaneously implanted in the lumbosacral region of C57Bl/6 mice (seven animals per group). From the second day of implantation, the mice were intraperitoneally injected with ESVR (520 $\mu\text{g}/\text{mL}$) every other day for 30 days. The dose chosen was 10 times higher than the IC_{50} observed in the *in vitro* assays. The mice from the control group were intraperitoneally injected with the vehicle RPMI 1640 with 0.1% DMSO. The tumor volume was monitored after the 16th day of treatment, and the tumor diameter was measured three times a week. The tumor volume was determined using the following formula:

Tumor volume (mm³) = larger diameter x smaller diameter² x 0.52

2.15. *In vivo* pulmonary metastasis evaluation

The experiment was conducted according to Figueiredo et al. (2014) [30] with minor modifications. Thus, 5x10⁵ B16F10-Nex2 melanoma cells were injected through the caudal vein into C57Bl/6 mice (five animals per group). From the second day of implantation, the mice were intraperitoneally injected with ESVR (520 µg/mL) every other day for 14 days. The mice from the control group were intraperitoneally injected with vehicle RPMI 1640 with 0.1% DMSO. On the 15th day, the mice were anesthetized and euthanized. The lungs were removed, and the lung nodules were counted using a stereoscope (Nikon SMZ745t), with the images recorded using a Ds-Fi2 camera.

2.16. Statistical analysis

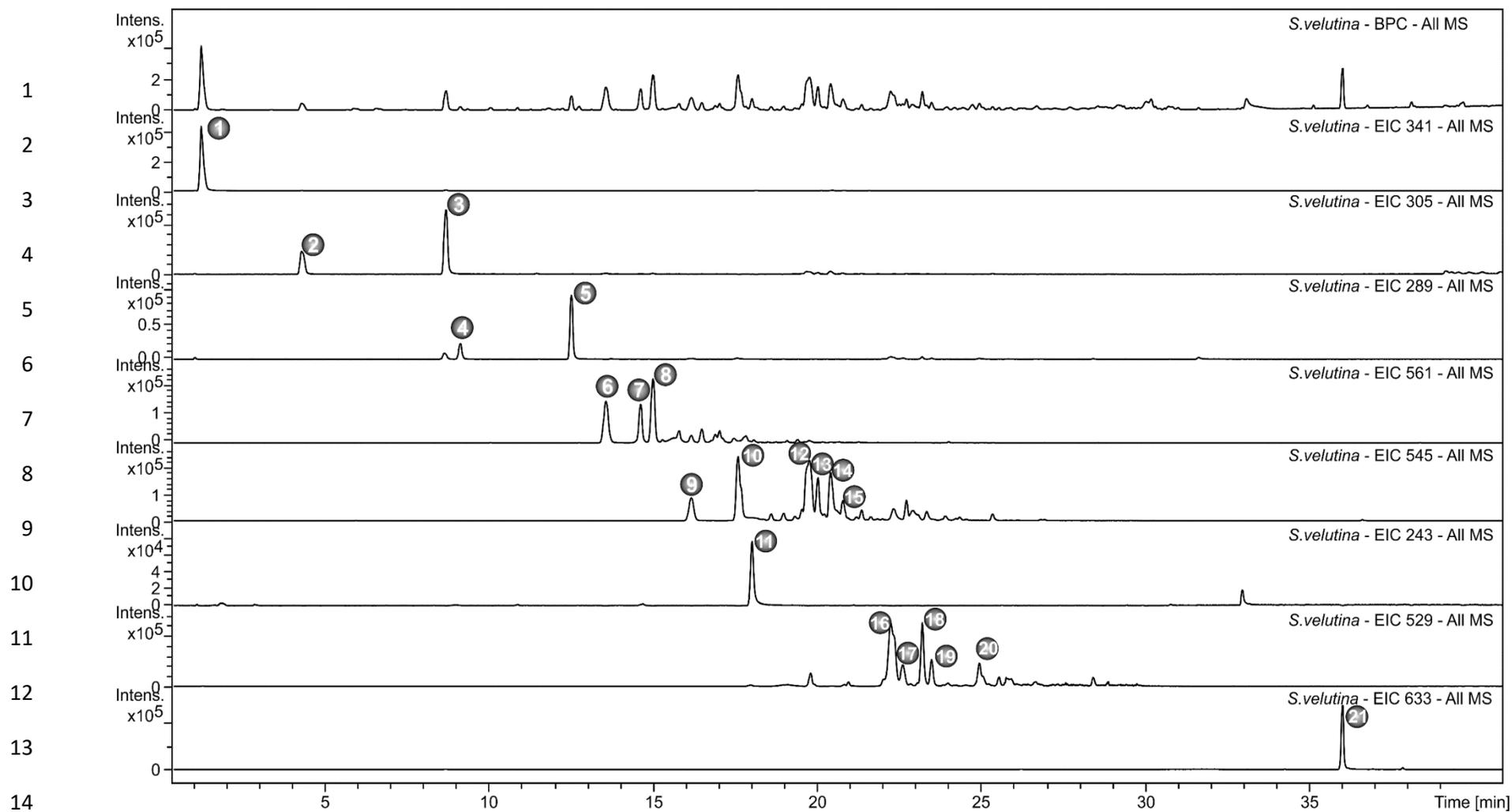
All data are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) with confidence limits of 95% were determined by nonlinear regression using the software GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA, USA). Significant differences between groups were determined using the unpaired Student's *t*-test (in apoptotic B16F10-Nex2 cell count, caspase-3 activity, determination of ROS levels, cell cycle phase, *in vivo* antitumor assay and *in vivo* pulmonary metastasis evaluation) for comparison between two groups and analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for comparison of two or more groups (in pan-caspase, intracellular calcium and necrostatin-1 inhibition) using the GraphPad

Prism 6 software (San Diego, CA, USA). The results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Phytochemical composition of ESVR

Compounds relative to the twenty one chromatographic peaks were detected in the ethanolic extract of *S. velutina* roots, including sugar derivatives, gallocatechin, epigallocatechin, catechin, epicatechin, butiniflavan-(epi)gallocatechin, butiniflavan-(epi)catechin, piceatannol, cassiaflavan-(epi)gallocatechin, cassiaflavan-(epi) catechin and dimeric tetrahydroanthracene derivatives (Figure 1 and Table 1).



15 **Figure 1.** Characterization of the compounds identified in ES/MS by HPLC-MS. Chromatograms with the base peaks and peaks
 16 identified in the extract.

Table 1. ESVR chemical profile as analyzed by UFLC-MS (negative mode)

Peak	Retention Time	UV	Molecular Formula	[M-H]	PPM Error	MS/MS	Compound
1	1.1	---	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₁	341.1086	0.6	341: 179	sugar derivative
2	4.2	270	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.0657	3.2	305:261, 221, 219, 179, 167, 165	galocatechin
3	8.6	270	C ₁₅ H ₁₄ O ₈	305.0660	2.3	305:261, 221, 219, 179, 167, 165	epigallocatechin
4	9.1	280	C ₁₅ H ₁₄ O ₉	289.0709	3.0	289: 245, 205, 203	catechin
5	12.5	280	C ₁₅ H ₁₄ O ₁₀	289.0714	1.3	289: 245, 205, 203	epicatechin
6, 7, 8	12.5/13.5/14.6	278	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	561.1402/561.1402	1.1	561: 407, 305, 177, 165	butiniflavan-(epi)galocatechin
9, 10	16.1/17.6	280	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	545.1453/545.1445	0.7	545: 391, 289, 245	butiniflavan-(epi)catechin
11	18	289/321	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	243.0662	0.3	243: 201, 159	piceatannol
12, 13, 14, 15	19.6/20/20.4/20.7	280	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	545.1441	2.3	545: 305, 239, 165	cassiaflavan-(epi)galocatechin
16, 17, 18, 19, 20	22.2/22.7/23.2/23.5/24.9	280	C ₃₀ H ₂₆ O ₉	529.1488	3.0	529: 289, 245, 239, 203	cassiaflavan-(epi)catechin
21	36.1	279/320/406	C ₃₄ H ₃₄ O ₁₂	633.1992	2.2	633: 615, 597, 579, 557, 555, 539, 317, 299, 298, 259	dimeric tetrahydroanthracene derivative

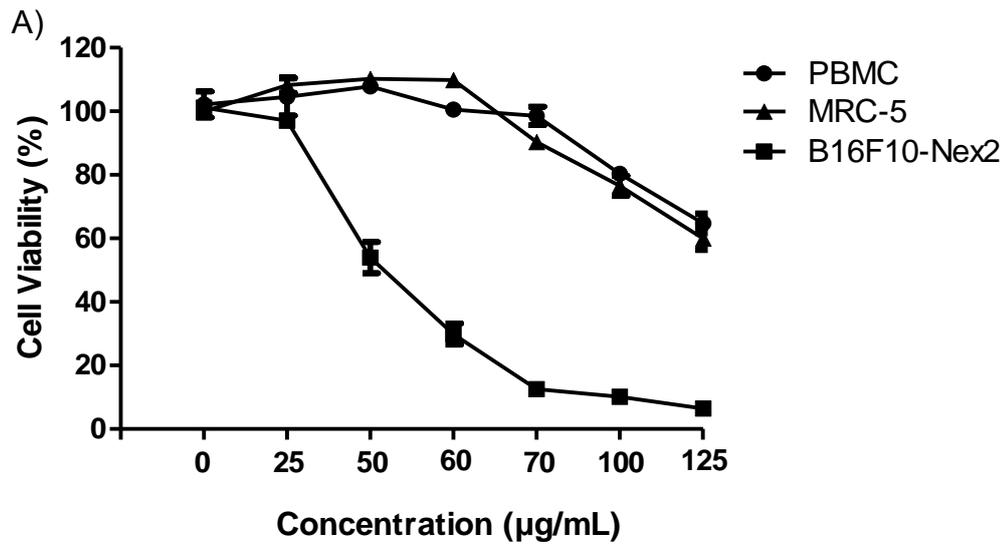
18 3.2. Cell viability assay

19 Figure 2 shows that B16F10-Nex2 cells were sensitive to ESVR in a
20 concentration-dependent manner after 24h (IC₅₀ of 52 µg/mL) and 48h (IC₅₀ of 59 µg/mL)
21 of treatment. In both treatment periods, the ESVR decreased the number of viable cells.
22 On the other hand, ESVR cytotoxicity was lower in the PBMC and MRC-5 cell lines than
23 in B16F10-Nex2 cells, it was observed that even after 48h incubation with the highest
24 dose tested (125 µg/mL) the extract was cytotoxic to only 20-30% of cell. Additionally, it
25 was evaluated the effect of ESVR against Human Melanoma Cell Lines SK-Mel-28 (IC₅₀
26 of 420.21 µg/mL in 24h and 330.48 µg/mL in 48h) and SK-Mel-103 (IC₅₀ of 245.23 µg/
27 L in 24h and 94.09 µg/mL in 48h) (reported in supplementary Figure 1). However, in
28 both SK-Mel cell lines the results were lower than those observed against B16F10-Nex2
29 cells. B16F10-Nex2 cells were chosen for the next analyzes, since they were more
30 sensitive the action of ESVR.

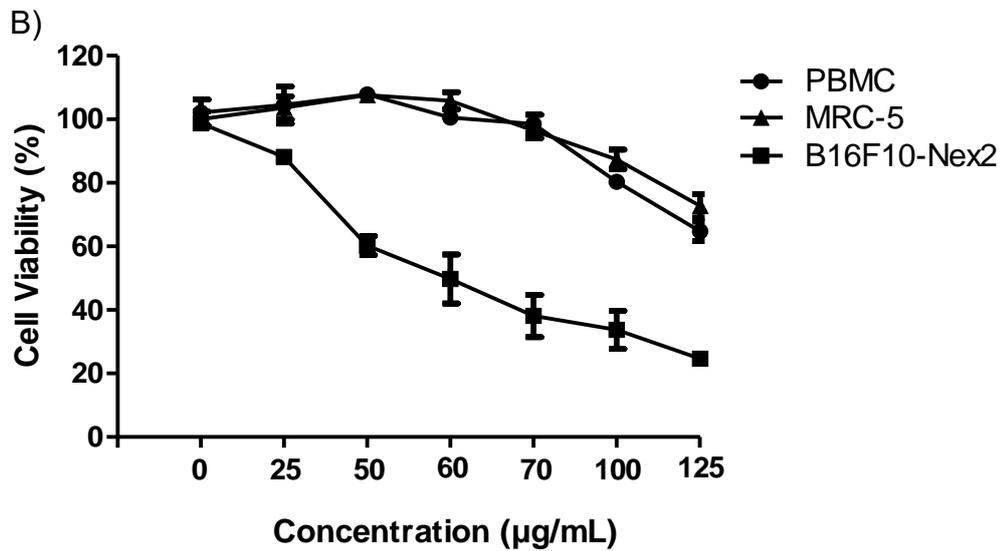
31

32

33



34



35

Figure 2. The cytotoxic effect of ESVR on PBMC, MRC-5 and B16F10-Nex2 cells treated with different ESVR concentrations for (A) 24 and (B) 48 h. The data are expressed as the means \pm SEM in three independent experiments in triplicate.

36

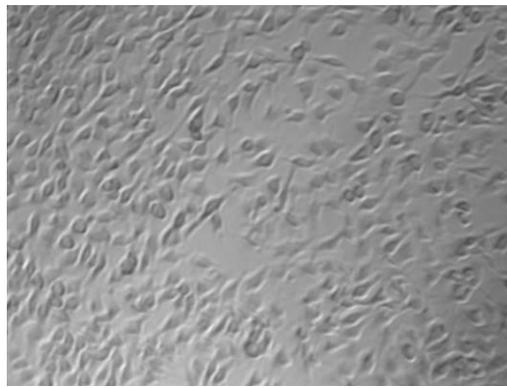
37

38 **3.3. Effects of ESVR on B16F10-Nex2 cells**

39 Figure 3 shows the effects of different ESVR concentrations on B16F10-Nex2
40 cell viability and morphology after 24 h of treatment. At images of the 25 to 60 µg/mL
41 of the extract concentration it was observed a reduction in the cell number, without
42 changing the morphology of unaffected cells, that remain attached to the extracellular
43 matrix present at the well. On the other hand, cells treated with doses equal or higher
44 than 70 µg/mL of the extract showed a marked reduction in the cell number and
45 strongly modified morphology of the remaining cells, that loose attachment to the
46 extracellular matrix.

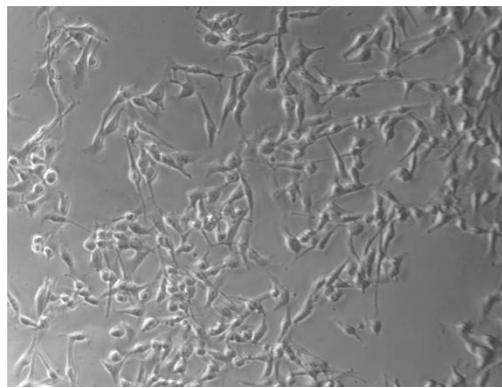
47

48



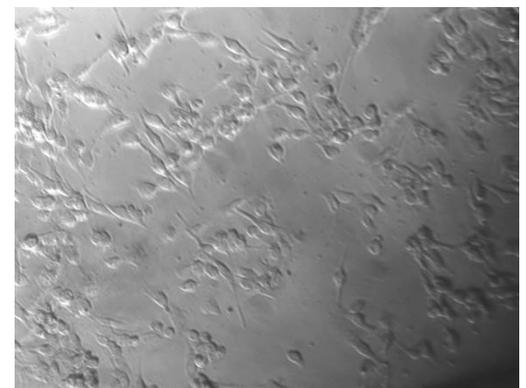
Control

49



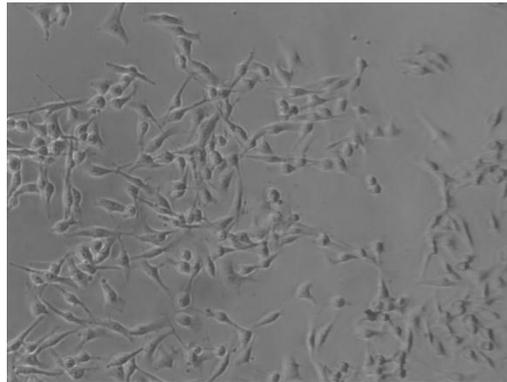
25 µg/mL

50



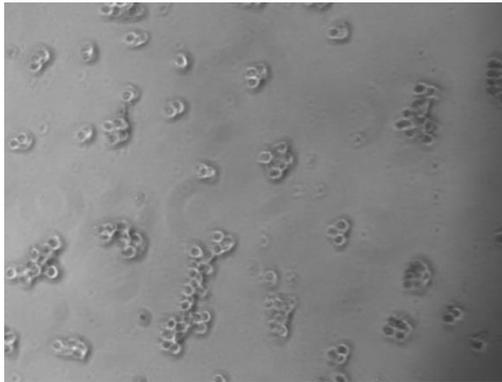
50 µg/mL

51

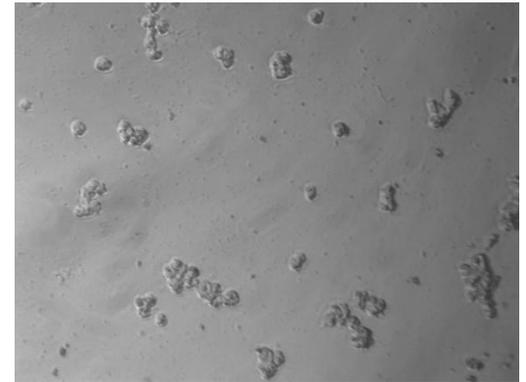


60 µg/mL

52

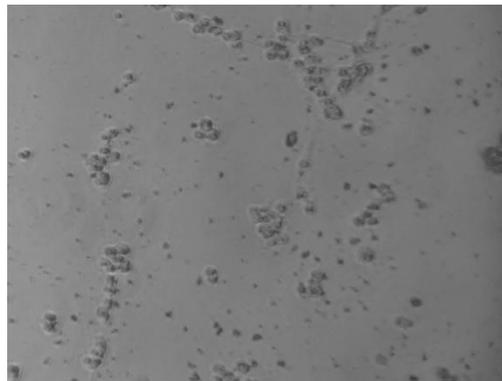


70 µg/mL



100 µg/mL

Figure 3. Reduced viability of B16F10-Nex2 cells treated with different ESVR concentrations for 24 h. Images are representative of those seen from at least three such fields of view per sample and three independent replicates.



125 µg/mL

53 **3.4 Cell death profile**

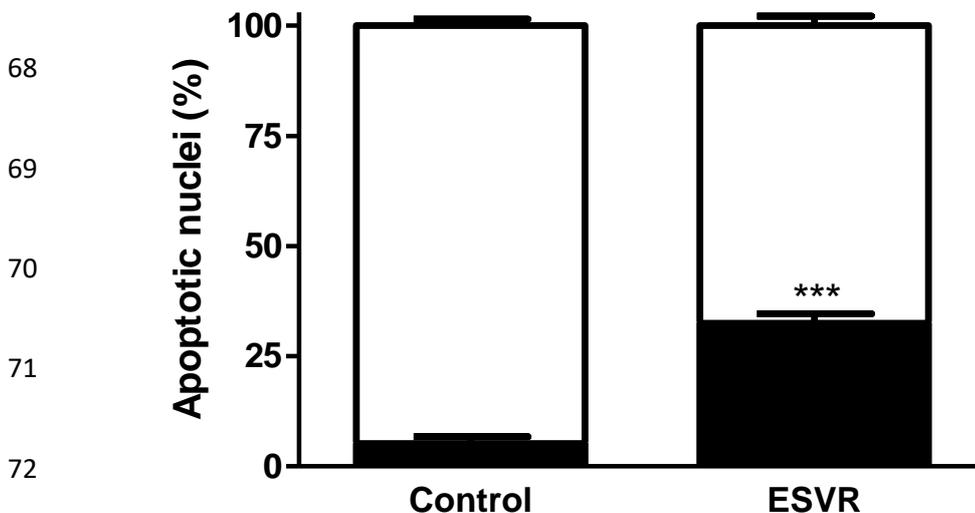
54 Cells were incubated with ESVR diluted in culture media at the IC₅₀ without annexin V-
55 FITC or propidium iodide. However, the fluorescence of the extract was similar to that
56 of the markers, thereby precluding the correct interpretation of these tests (data not
57 shown).

58

59 **3.5. Apoptotic B16F10-Nex2 cell count**

60 Nuclear morphological changes are characteristic of apoptotic cell death and
61 can be determined by microscopy using specific fluorescence markers. In these
62 analyzes, the number of apoptotic B16F10-Nex2 cells treated with ESVR (52 µg/mL),
63 counted under confocal microscopy shows that the extract promoted nuclear damage
64 in 32.4% of cells, whereas only 5.2% of untreated cells were damaged (Figure 4). Only
65 nuclei that showed extreme chromatin condensation, DNA fragmentation and high
66 fluorescence intensity were considered apoptotic nuclei.

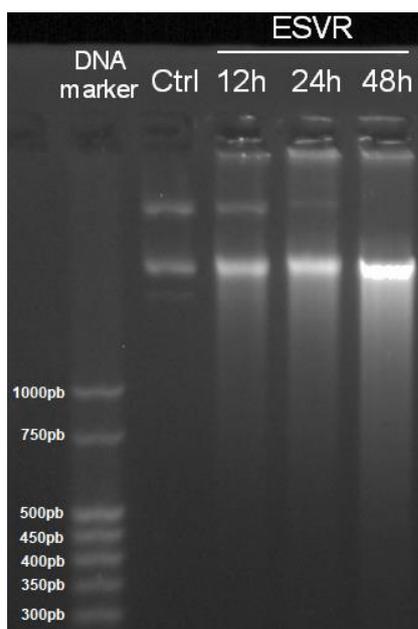
67



73

3.6. DNA fragmentation **Figure 4.** Count of apoptotic nuclei in B16F10-Nex2 cells treated for 24 h with 52 µg/mL of ESVR. The data are expressed as the means ± SEM of four independent experiments in duplicate. ***p < 0.001 compared with control.

74 Compounds that activate cell death pathways such as apoptosis are able to
75 induce DNA degradation. The DNA fragmentation data shown in Figure 5 demonstrate
76 that ESVR-treated B16F10-Nex2 cells show time-dependent DNA fragmentation,
77 which is observed after 12 h and is intensified after 24 h and 48 h of treatment. After
78 these incubation periods, the control cells showed no sign of DNA fragmentation.



79

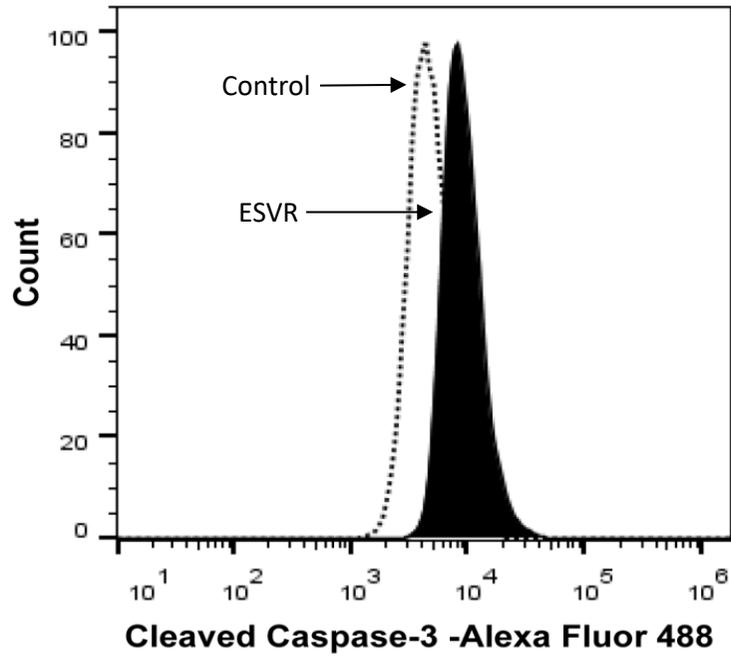
80 **Figure 5.** DNA fragmentation in B16F10-Nex2 cells analyzed by agarose gel
81 electrophoresis after 12 h, 24 h and 48h of treatment with ESVR. Ctrl = B16F10-
Nex2 cells after 48h without treatment with ESVR .

82

83 **3.7. Caspase-3 activity**

84 The caspase-3 is effector caspase that plays a central role in the execution
85 phase of apoptosis. Caspase-3 activation was assessed to identify the possible cell
86 death pathways activated by ESVR in melanoma cells. In this assay, Figure 6A shows
87 right-shifted fluorescence values, thus confirming caspase-3 activation and indicating
88 apoptosis-induced cell death. The increase in cleaved caspase-3 in ESVR-treated
89 B16F10-Nex2 cells was twice as high as that in control cells (Figure 6B).

A)



B)

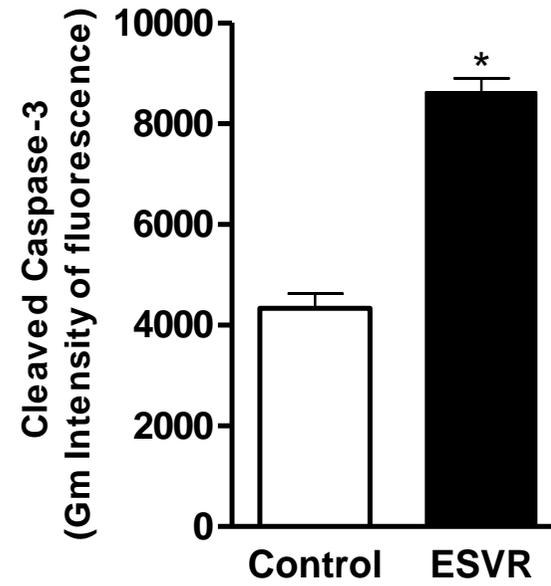
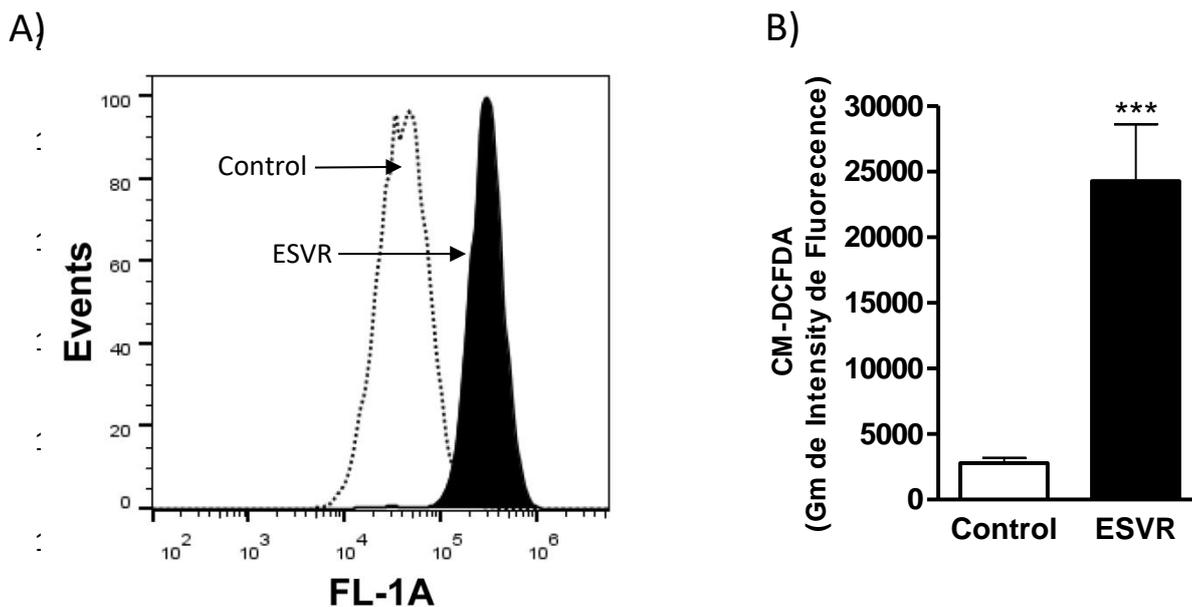


Figure 6. Caspase-3 activation by ESVR after 24 h represented in a histogram (A) and bar graph (B). * The data are expressed as the means \pm SEM of three independent experiments in duplicate. * $p < 0.05$ compared with control cells.

100 **3.8. Determination of the reactive oxygen species (ROS) levels**

101 ROS were evaluated in this study to verify whether were involved in ESVR-induced
102 cell death. The levels of ROS increased in ESVR-treated cells, as shown by the right-
103 shifted fluorescence values (Figure 7A). The mean values obtained in the
104 fluorescence intensity were 24.271 ± 4.309 for treated cells with ESVR and
105 2.787 ± 408 for the control cells (Figure 7B). The ROS levels increased 8.7-fold in
106 B16F10-Nex2 cells treated with the extract after 24 h of incubation compared with
107 control cells without treatment.

108



115

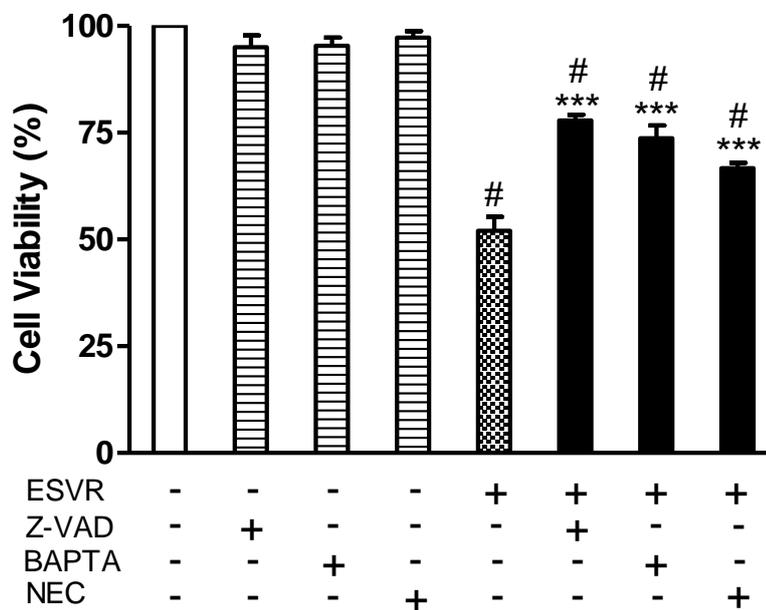
116 **Figure 7.** Determination of the levels of ROS in B16F10-Nex2 cells treated for 24 h
117 with 52 $\mu\text{g/mL}$ of ESVR, represented in a histogram (A) and bar graph (B). The data
118 are expressed as the means \pm SEM of three independent experiments in duplicate.
119 *** $p < 0.001$ compared with control cells.

117

118

119 **3.9. Pan-caspase, intracellular calcium and necrostatin-1 inhibition**

120 Aiming to identify cell death modalities induced by ESVR in B16F10-Nex2 cells,
 121 were analyzed different markers of apoptosis and necrosis. Figure 8 shows that neither
 122 control B16F10-Nex2 cells nor B16F10-Nex2 the cells treated with only the inhibitors
 123 showed changes in cell viability. Conversely, cells treated with ESVR (52 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for
 124 24 h showed $52.0 \pm 3.3\%$ viable cells. This result was partially reversed in the presence
 125 of the inhibitors Z-VAD-FMS ($77.9 \pm 1.4\%$), BAPTA-AM ($73.7 \pm 3.1\%$) and NEC-1 (66.7
 126 $\pm 1.2\%$).



127 **Figure 8.** Effect of pan-caspase (Z-VAD-FMK), intracellular calcium channels (BAPTA-AM)
 128 and necrostatin-1 (NEC) inhibitors on B16F10-Nex2 cells treated or untreated for 24 h with
 129 ESVR at a concentration of 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The data are expressed as the means \pm SEM of
 130 three independent experiments in duplicate. # $p < 0.05$ compared with negative control cells
 131 and *** $p < 0.001$ compared with ESVR-treated cells.

132 3.10. Cell cycle phases

133 Cell cycle control in tumor cells is considered an important therapeutic target for

134 the treatment of cancer. Thus, demonstrating the effects of the extract on the
135 progression of the cell cycle will contribute to a better understanding of its mechanisms
136 of action. Figure 9A shows histograms of the cell cycle distribution of control B16F10-
137 Nex2 cells and B16F10-Nex2 cells treated with ($\frac{1}{2}$ IC_{50} = 26 μ g/mL and IC_{50} = 52 μ g/mL
138 ESVR for 24 h. The control cells and cells treated with 26 μ g/mL of ESVR showed no
139 differences in cell cycle distribution (Figure 9B). The comparison between cells treated
140 with 52 μ g/mL of ESVR and control cells shows that ESVR promoted cell cycle arrest
141 at the sub G_0/G_1 phase ($54.3 \pm 3.8\%$ versus $42.3 \pm 2.6\%$, * $p < 0.05$) and decreased
142 the percentage of S phase cells ($22.5 \pm 2.2\%$ versus $36.6 \pm 4.2\%$, * $p < 0.05$) without
143 changing the number of cells in the G_2/M phase ($19.9 \pm 0.8\%$ versus $20.9 \pm 2.4\%$)
144 (Figure 9B).

145

146

147

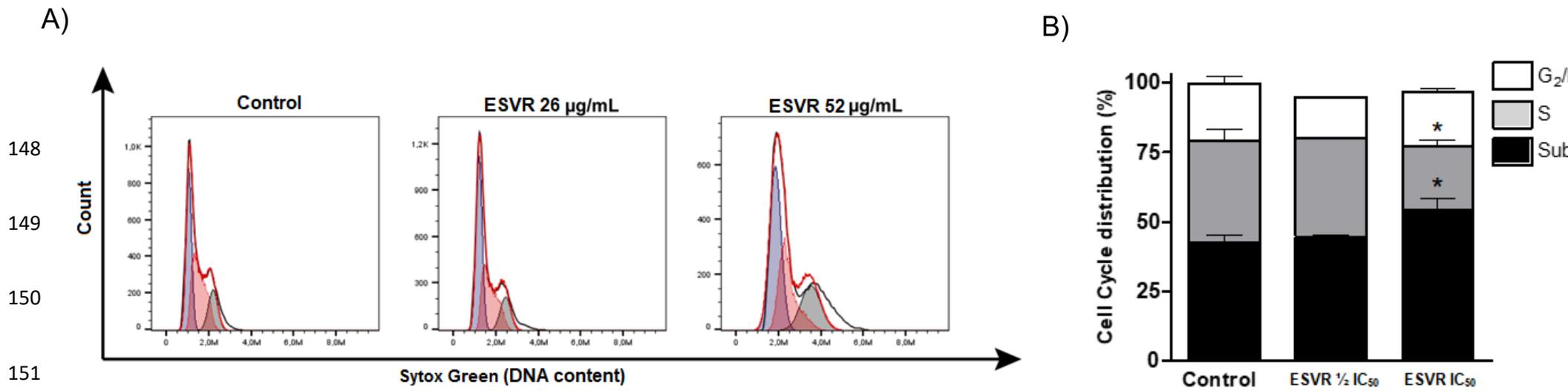


Figure 9. Histograms (A) and a bar graph (B) representative of the cell cycle distribution of control (untreated) B16F10-Nex2 cells and B16F10-Nex2 cells treated for 24 h with $\frac{1}{2}$ IC₅₀ = 26 µg/mL and IC₅₀ = 52 µg/mL ESVR. The data are expressed as the means \pm SEM of four independent experiments. *p < 0.05 compared with control cells.

153

154

155

156

157

158 **3.11. *In vivo* effect of ESVR on the tumor volume**

159 After observing that ESVR had a cytotoxic effect on B16F10-Nex2 cells *in vitro*,
160 we next evaluated the effect of the extract *in vivo* during tumor progression. ESVR
161 treatment of B16F10-Nex2-inoculated mice significantly delayed subcutaneous tumor
162 development in all animals analyzed (Figure 10A). Figure 10B shows that the mean
163 tumor volume of mice 30 days after the treatment was 57.5% smaller than the tumor
164 volume of the control mice.

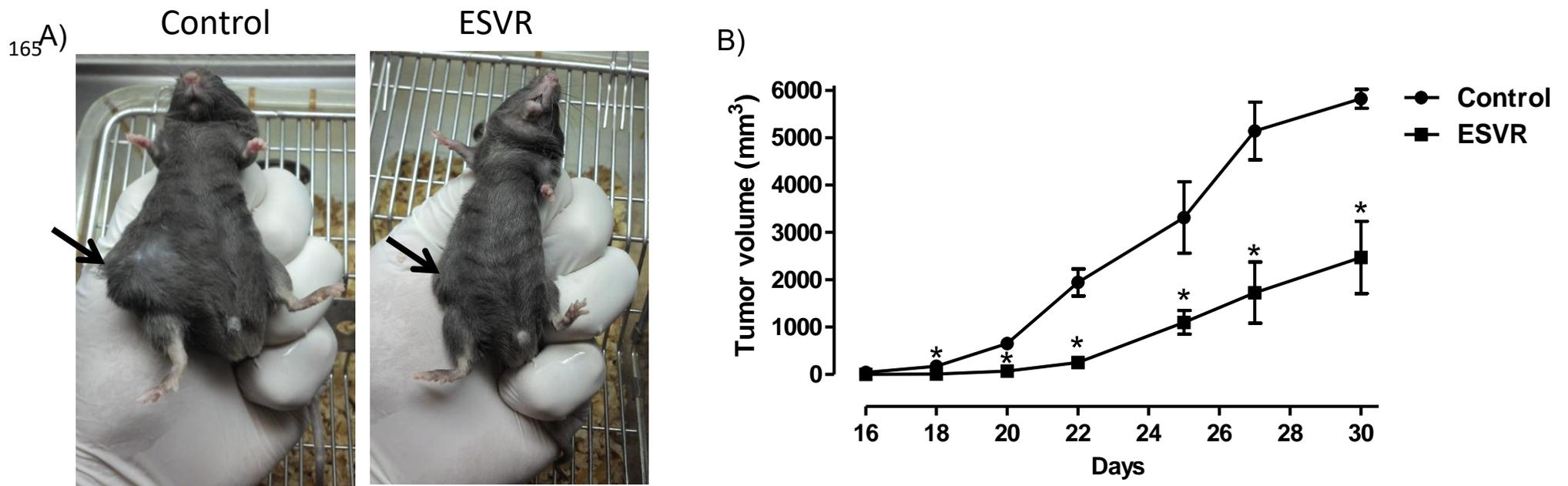


Figure 10. The effect of ESVR on the tumor volume of B16F10-Nex2 cells induced in C57BI-6 mice. Representative images of 30 days tumors (arrows) in (A) control animals treated with RPMI-1640 medium and animals treated with ESVR, (B) a representative plot of tumor volume progression during 30 days of treatment. The data are expressed as the means \pm SEM (n = 7). *p < 0.05 compared with the control group.

3.12. *In vivo* effect of ESVR on pulmonary metastasis

Next we analyzed the effect of ESVR on metastatic B16F10-Nex2 cells, developing in lungs after endovenous inoculation at caudal vein. It was observed that ESVR-treated animals showed 119 ± 25 pulmonary melanotic nodules 14 days after cells inoculation, while Control group showed 286 ± 6 pulmonary nodules, a 54% reduction (Figure 11).

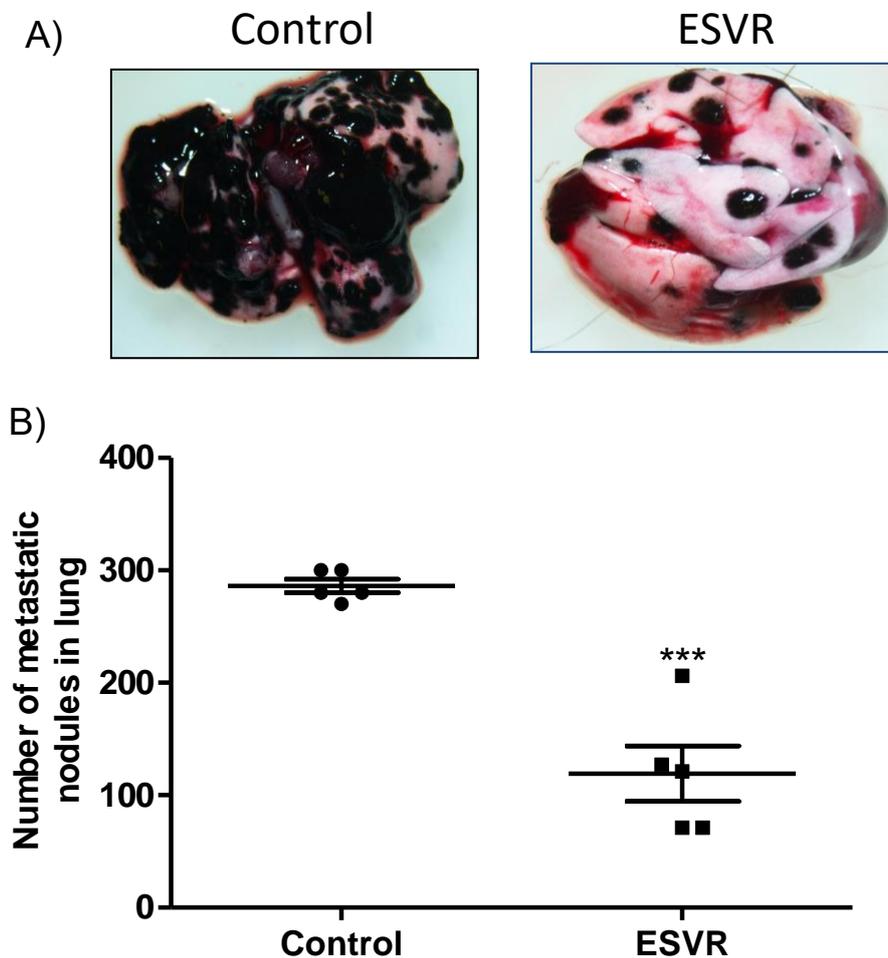


Figure 11. The effect of ESVR on the pulmonary metastasis of B16F10-Nex2 cells induced in C57Bl/6 mice. Representative lung images of (A) control animals treated with RPMI-1640 and animals treated with ESVR. (B) a graph representing the number of pulmonary metastasis in all animals, after 14 days of endogenous cell inoculation. The data are expressed as the means \pm SEM (n =5). ***p < 0.001 compared with the control group.

4. Discussion

The search for new anticancer drugs with greater selectivity and lower adverse effects is an ongoing process. Natural compounds are among the alternatives that stand out as promising sources of new molecules with pharmacological potential. Accordingly, several anticancer drugs of natural origin are available on the market [31]. In this context, scientific studies have shown that Brazilian biodiversity due to its various biomes provides various natural compounds with anticancer potential both *in vitro* [32,33] and *in vivo* [30,34]. In the present study, we assessed the anticancer effects of the ethanolic extract of the roots of *S. velutina*, a plant species native to Brazil whose phytochemical composition and potential pharmacological applications have been poorly studied.

Phytochemical analysis of ESVR identified its main compounds as flavonoid derivatives of the catechin and piceatannol (active metabolite of resveratrol) groups as well as dimeric tetrahydroanthracene derivatives. These phenolic compounds derived from plant secondary metabolism exhibit great structural diversity and are responsible for innumerable biological activities, including anticancer properties [35,36].

The assessment of the effect of ESVR on B16F10-Nex2 melanoma cell viability revealed a dose-dependent death profile. This effect was confirmed by microscopy, as shown by the activity of the extract at different concentrations. In addition, ESVR showed higher selectivity against B16F10-Nex2 cells than against leukocytes (PBMC) or fibroblasts (MRC5). This result is highly relevant because systemic collateral effects from chemotherapeutic agent activity are a consequence of reduced selectivity against tumor cells.

The ability of the extract to promote the death of melanoma cells may be related to the isolated or synergistic effects of its chemical constituents, since the main constituents and chemical classes identified in the ESVR are well described in the literature for their antitumor activities. Catechins are described by the ability to reduce the viability of breast carcinoma cells [37] and to promote cytotoxic effect in B16F10 murine melanoma cells [38]. Anthraquinone compounds have been reported as promising therapeutic agents for the treatment of malignant melanoma for presenting high cytotoxicity against different malignant melanoma cells and low toxicity to melanocytes and other primary cell [39]. Piceatannol, defined as a promising therapeutic agent for the treatment of various cancer, inhibited growth and induced apoptosis in human melanoma cell lines [40].

Different studies report that catechins [41,42], anthraquinones [39] and piceatannol [43, 44], induce apoptosis in tumor cells. Corroborate this, analysis of the mechanism whereby ESVR promoted B16F10-Nex2 cell death showed an increased number of apoptotic nuclei, which are characterized by chromatin condensation and DNA fragmentation, characteristic stages of death by apoptosis [45]. Apoptosis is considered a cell death process essential to homeostasis, mainly activated by extrinsic and intrinsic pathways [46]. In the extrinsic pathway, apoptotic receptors promote extracellular signaling. Conversely, in the intrinsic pathway, activation occurs in response to intracellular damage mediated by the mitochondria [47], a process characterized by the release of proapoptotic proteins into the cytosol, thereby promoting caspase activation and nuclear apoptosis.

Caspases are essential apoptotic cell death mediators [48]. Among these proteases, caspase-3 is one of the main effectors of programmed cell death because

it is directly involved in nuclear apoptosis and cell death [49]. In this study, ESVR-treated B16F10-Nex2 cells showed doubled activated caspase-3 levels. In addition, the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK reduced the percentage of cell death, thus demonstrating the involvement of caspases in the mechanism of cell death promoted by the extract.

Assessment of the activity of inhibitors showed that calcium and the necroptosis pathway are among the mechanisms involved in ESVR-induced cell death. High cytoplasmic Ca^{2+} levels are responsible for mitochondrial membrane permeabilization with cytochrome c release, thereby enhancing the signs of apoptosis [50,51,52].

Necroptosis is a cell death that show characteristics of necrosis, but unlike of necrosis may be regulated receptor-interacting proteins 1 (RIP1) and 3 (RIP3) [53]. Furthermore, recent studies show that oxidative stress may promote necroptosis activation [59,60]. Although necroptosis is not the main mechanism of death characterized by the action of ESVR, this finding is interesting, once can be an alternative form of cell death to populations of cells exhibiting resistance to death by apoptosis.

Conversely, cancer cells also have a persistent pro-oxidative state and high ROS levels [54]. This different metabolism promotes an adaptive response that plays a key role in cancer cell proliferation, cell death signaling disruption, metastasis and resistance to antitumor drugs [55, 56]. Nevertheless, cancer cells become vulnerable to pro-oxidant agents that further increase ROS levels, thus promoting cell death [54].

Some flavonoids, the main compounds of ESVR, are described in the literature as pro-oxidant agents in cancer cells [41,57] because they can directly increase ROS production, resulting in superoxide radical formation [58], a mechanism

whereby ESVR may have contributed to B16F10-Nex2 cell death because the intracellular ROS levels were high. Furthermore, anthracene derivatives, another group of compounds identified in ESVR, are described for inducing apoptosis by increasing ROS production [59].

Another activity promoted by the extract was cell cycle arrest at the sub G₀/G₁ phase, accompanied by a decrease in the percentage of S phase cells. Some flavonoids, such as catechins, can cause cell cycle arrest at the sub G₀/G₁ phase of the cell cycle [60, 61]. Piceatannol, decreases cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), which is responsible for cell cycle progression from the G₁ phase to the S phase [62]. Thus, considering the importance of the cyclin-dependent kinases involved in cell cycle regulation and the uncontrolled cell proliferation in tumor cells, compounds capable of inhibiting the cell cycle progression of these cells may be important alternatives for tumor volume control [63, 64].

In this study, after confirmed *in vitro* antitumor action in B16F10-NEX2 murine melanoma cells, we demonstrated that ESVR produces antitumor activity on tumor volume progression and pulmonary nodule formation *in vivo*. Our data from the *in vivo* antitumor assessment showed that primary tumor progression in ESVR-treated mice decreased by more than 50% compared with control mice. Cutaneous melanoma is one of the most aggressive forms of cancer, and no fully effective pharmacological therapy for advanced-stage metastatic melanoma is currently available [65,66]. In these cases, metastases are responsible for the poor prognosis [67], affecting several organs, such as the bones, liver and lungs [68]. The progression of pulmonary metastasis in ESVR-treated mice was markedly reduced in the formation of pulmonary nodules. This result may be related to the ability of the extract to reduce the migration

and invasion of melanoma cells into the lungs. These effects may be related to the chemical constituents of ESVR, once the epigallocatechin (one of the identified catechins), anthraquinones, and the resveratrol (precursor molecule of piceatannol) were compounds reported to inhibit tumor growth [69,70,71] and progression of pulmonary metastasis [70] in animal models for melanoma. In addition, phenolic compounds are well described because they hamper metastasis by decreasing metalloprotease-9 expression in murine melanoma cells [72,73]. Moreover, other studies showed that the epigallocatechin, can inhibit genes that synthesize proteins related to extracellular matrix degradation and cellular mobility, thereby reducing the process of melanoma metastasis [74].

In conclusion, this study demonstrated that ESVR contains flavonoid derivatives of catechins, anthraquinones and piceatannol among its chemical constituents and promotes B16F10-Nex2 melanoma cell death via apoptosis induced by caspase-3 activation, the elevation of intracellular calcium and ROS levels and cell cycle arrest at the sub G_0/G_1 phase. Furthermore, the extract showed *in vivo* antitumor activity in models of tumor volume progression and pulmonary nodule formation. These promising results open the door for further studies, both with the crude extract and with fractions isolated from *Senna velutina* roots, exploring its potential use in the treatment of melanoma and other cancers.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do

Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

5. Reference

- [1] GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators, “Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015,” *Lancet*, vol. 388, no. 10053, pp. 1459-544, 2016.
- [2] M. Eggermont, A. Spatz, C. Robert, “Cutaneous melanoma,” *Lancet*, vol. 383, pp.816–827, 2014
- [3] B. C. Bastian, “The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia,” *Annual Reviews Pathology*, vol. 9, pp. 239–271, 2014.
- [4] D. C. Whiteman, C. A. Whiteman, A. C. Green, “Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies,” *Cancer Causes and Control*, vol. 12, no. 1, pp. 69-82, 2001.
- [5] S. Gandini, F. Sera, M. S. Cattaruzza et al., “Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors,” *European Journal of Cancer*, vol. 41, no. 14, pp. 2040-2059, 2005.
- [6] World Health Organization, 2016, <http://www.who.int/cancer/en/>.
- [7] F. Erdmann, J. Lortet-Tieulent, J. Schuz, “International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008 - are recent generations at higher or lower risk?,” *Internacional Journal of Cancer*, vol. 132, no. 2, pp. 385–400, 2013.
- [8] H. Tsao, M. B. Atkins, A. J. Sober, “Medical progress — management of cutaneous melanoma,” *New England Journal of Medicine*, vol. 351, pp. 998–1012, 2004.
- [9] M. Patel, E. Smyth, P. B. Chapman et al., “Therapeutic implications of the emerging molecular biology of uveal melanoma,” *Clinical Cancer Research*, vol. 17, no. 8, pp. 2087-2100, 2011.

- [10] A. M. Eggermont, C. Robert, "New drugs in melanoma: it's a whole new world," *European Journal of Cancer*, vol. 47, no. 14, pp. 2150–2157, 2011.
- [11] T. Kim, R. N. Amaria, C. Spencer, A. Reuben, Z. A. Cooper, J. A. Wargo, "Combining targeted therapy and immune checkpoint inhibitors in the treatment of metastatic melanoma," *Cancer Biology & Medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 237-246, 2014.
- [12] B. S. Kalal, D. Upadhyaya, V. R. Pai, "Chemotherapy Resistance Mechanisms in Advanced Skin Cancer," *Oncology Reviews*, vol. 11, no. 1, pp. 326, 2017.
- [13] L. R. Strickland, H. C. Pal, C. A. Elmets, F. Afaq, "Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals," *Cancer Letters*, vol. 359, no. 1, 20-35, 2015.
- [14] S. J. Chatterjee, S. Pandey, "Chemo-resistant melanoma sensitized by tamoxifen to low dose curcumin treatment through induction of apoptosis and autophagy," *Cancer Biology & Therapy*, vol. 11, no. 2, pp 216-228, 2011.
- [15] A. Ghorbani, A. Hosseini, "Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies", *Avicenna Journal of Phytomedicine*, vol. 5, no. 2, pp. 84-97, 2015.
- [16] E. Solowey, M. Lichtenstein, S. Sallon, H. Paavilainen, H. Lorberboum-Galski, "Evaluating medicinal plants for anticancer activity," *The Scientific World Journal*, vol. 2014, 2014.
- [17] D. J. Newman, G. M. Cragg, "Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014," *Journal of natural products*, vol. 79, no. 3, pp. 629-661, 2016.
- [18] J. Clardy, C. Walsh, "Lessons from natural molecules," *Nature*, vol. 432, no. 7019, pp. 432- 829, 2004.
- [19] S. L. Jothy, A. Torey, I. Darah et al, "*Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn: A promising traditional herb in health improvement," *Molecules*, vol. 17, no. 9, pp. 10292-10305, 2012.
- [20] G. K. Varghese, L. V. Bose, S. Habtemariam, "Antidiabetic components of *Cassia alata* leaves: identification through α -glucosidase inhibition studies," *Pharmaceutical Biology*, vol. 51, no. 3, pp. 345-349, 2013.

- [21] Mokgotho MP, Gololo SS, Masoko P, Mdee LK, Mbazima V, Shai LJ, Mampuru L. Isolation and chemical structural characterisation of a compound with antioxidant activity from the roots of *Senna italica*," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 4, 2013.
- [22] A. D. C. Susunaga-Notario, S. Pérez-Gutiérrez, M. Á. Zavala-Sánchez et al., "Bioassay-guided chemical study of the anti-inflammatory effect of *Senna villosa* (Miller) HS Irwin & Barneby (Leguminosae) in TPA-induced ear edema," *Molecules*, vol. 19, no. 7, pp. 10261-10278, 2014.
- [23] G. Aviello, I. Rowland, C. I. Gill, et al., "Anti-proliferative effect of rhein, an anthraquinone isolated from *Cassia* species, on Caco-2 human adenocarcinoma cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol.14, no 7, pp. 2006-2014, 2010.
- [24] J. F. Campos, D. T. H. de Castro, M. J. Damião et al., "The Chemical Profile of *Senna velutina* leaves and their antioxidant and cytotoxic effects," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, 12 pages, 2016.
- [25] R. M. Pereira, G. Á. Ferreira-Silva, M. Pivatto et al., "Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*,(-)-cassine and (-)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G₁/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression," *Toxicology in Vitro*, vol. 31, pp. 86-92, 2016.
- [26] P. T. O. Saiki, B. Silva, C. Lomônaco, "Expression of reproductive and vegetative characters of *Senna velutina* (Vogel) HS Irwin & Barneby (Leguminosae, Caesalpinioideae) in two distinct" Cerrado" environments," *Brazilian Journal of Botany*, vol. 31, no. 2, pp. 363-369, 2008.
- [27] S. M. Loverde-Oliveira, M. N. Freitas, P. K. B. Araújo, I. B. C. Costa, "Fragmento de cerrado urbano da Universidade Federal de Mato Grosso, campus de Rondonópolis, Mato Grosso," *Biodiversidade*, vol. 9, no. 1, 2010.
- [28] E. J. Paredes-Gamero, M. N. Martins, F. A. Cappabianco, J. S. Ide, A. Miranda, "Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1820, no. 7, pp. 1062-1072, 2012.

- [29] V. W. Moraes, A. C. Caires, E. J. Paredes-Gamero, T. Rodrigues, "Organopalladium compound 7b targets mitochondrial thiols and induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells," *Cell Death Disease*, vol. 6, no. 4, article e658, 2013.
- [30] F.V. Pereira, A.C. Melo, F.M. de Melo, D. Mourão-Sá, P. Silva, R. Berzaghi, C.C. Herbozo, J. Coelho-Dos-Reis, J.A. Scutti, C.S. Origassa, R.M. Pereira, L. Juliano, M.A. Juliano, A.K. Carmona, N.O. Câmara, M. Tsuji, L.R. Travassos, E.G. Rodrigues," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 7, article e1178420, 2016.
- [31] B. A. Shen, "New Golden Age of Natural Products Drug Discovery," *Cell*, vol. 163, no. 3, pp. 1297-1300, 2015.
- [32] J. F. Campos, P. P. T. Espindola, H. F. V. Torquato et al., "Leaf and root extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) promote apoptotic death of leukemic cells via activation of intracellular calcium and caspase-3," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 14, no. 8, article 466, 2017.
- [33] T. Bonamigo, J. F. Campos, A. S. Oliveira et al., "Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome," *PLoS One*, vol. 12, no 9, pp. 1-19, 2017.
- [34] G. B. Longato, L. Y. Rizzo, I. M. Sousa et al, "*In vitro* and *in vivo* anticancer activity of extracts, fractions, and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves," *Planta Medica*, vol. 77, no. 13, pp.1482-1488, 2011.
- [35] W. Y. Huang, Y. Z. Cai, Y. Zhang, "Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention," *Nutrition and Cancer*, vol. 62, no.1, pp. 1–20, 2010.
- [36] S. Gorlach, J. Fichna, U. Lewandowska, "Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs," *Cancer Letters*, vol. 366, no. 2, pp. 141–149, 2015.
- [37] L. Schroder, P. Marahrens, J. G. Koch, et al. "Effects of green tea, matcha tea and their components epigallocatechin gallate and quercetin on MCF7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells." *Oncology Reports*, vol. 41, no. 1, pp. 387-396, 2018.
- [38] C. C. Chen, D. S. Hsieh, K. J. Huang, Y. L. Chan, P. D. Hong, M. K. Yeh, C. J. Wu

“Improving anticancer efficacy of (-)-epigallocatechin-3-gallate gold nanoparticles in murine B16F10 melanoma cells.” *Drug Design Development and Therapy*, vol. 8, pp. 459–474, 2014.

[39] M. Genov, B. Kreiseder, M. Nagl, E. Drucker, et. al. “Tetrahydroanthraquinone Derivative (\pm)-4- Deoxyaustrocortilutein Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Melanoma Cells via Upregulation of p21 and p53 and Downregulation of NF-kappaB.” *Journal of Cancer*, vol. 7, n^o 5, pp. 555-568, 2016.

[40] M. Du, Z. Zhang, T. Gao “Piceatannol induced apoptosis through up-regulation of microRNA-181a in melanoma cells.” *Biological Research*, vol. 50, no. 36, 2017.

[41] S. Li, L. Wu, J. Feng et al. “*In vitro* and *in vivo* study of epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis in aerobic glycolytic hepatocellular carcinoma cells involving inhibition of phosphofructokinase activity,” *Scientific Reports*, vol. 6, article 28479, 2016.

[42] K. Phuriwat, P. Pattamaphron, R. Lysiane, P. Dumrongsak, S. Piyarat, “Epistructured catechins, EGCG and EC facilitate apoptosis induction through targeting de novo lipogenesis pathway in HepG2 cells,” *Cancer Cell International*, vol. 18, no. 46, 2018.

[43] G. A. Potter, L. H. Patterson, E. Wanogho et al., “The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1,” *British Journal of Cancer*, vol. 86, no. 5, pp. 774-778, 2002.

[44] Y.H. Kim, C. Park, J.O. Lee et al., “Induction of apoptosis by piceatannol in human leukemic U937 cells through down-regulation of Bcl-2 and activation of caspases,” *Oncology Reports*, vol. 19, no. 4, pp. 961-967, 2008.

[45] S. Nagata, “Apoptotic DNA fragmentation,” *Experimental Cell Research*, vol. 256, no. 1, pp. 12–18, 2000.

[46] G. Xu, Y. Shi, “Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis,” *Cell Research*, vol. 17, no. 9, pp. 759-71, 2007.

- [47] T. Vanden Berghe, W. J. Kaiser, M. J. Bertrand, P. Vandenabeele, "Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling," *Molecular & Cellular Oncology*, vol. 2, no. 4, e975093, 2015.
- [48] D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, "Caspase functions in cell death and disease," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 5, no. 4, article a008656, 2013.
- [49] A. G. Porter, R. U. Janicke, "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis," *Cell Death & Differentiation*, vol. 6, no. 2, pp. 99–104, 1999.
- [50] R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington et al., "Close contacts with the endo-plasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses," *Science*, vol. 280, no. 5370, pp. 1763–1766, 1998.
- [51] Y. Yan, C. L. Wei, W. R. Zhang, H. P. Cheng, J. Liu, "Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling," *Acta Pharmacologica Sinica*, vo. 27, no. 7, pp. 821–6, 2006.
- [52] C. Giorgi, A. Romagnoli, P. Pinton, R. Rizzuto, "Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death," *Current Molecular Medicine*, vol. 8, no. 2, pp. 119–130, 2008.
- [53] M. D'Arcy. "Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy." *Cell Biology Internacional*, 2019.
- [54] L. Gibellini, M. Pinti, M. Nasi et al, "Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercetin," *Cancers (Basel)*, vol. 2, no. 2, pp. 1288–131, 2010.
- [55] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, "Targeting cancer cells by ROS mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?," *Nature Review Drug Discovery*, vol. 8, pp. 579–91, 2009.
- [56] L. Zhu, L. Ren, Y. Chen, et al., "Redox status of high-mobility group box 1 performs a dual role in angiogenesis of colorectal carcinoma," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 19, no. 9, pp. 2128–35, 2015.
- [57] C. Martin-Cordero, A. J. Leon-Gonzalez, J. M. Calderon-Montano, E.

BurgosMoron, M. Lopez-Lazaro, "Pro-oxidant natural products as anticancer agents," *Current Drug Targets*, vol. 13, no. 8, pp. 1006–1028, 2012.

[58] W. F. Hodnick, E. B. Milosavljevic, J. H. Nelson, R. S. Pardini, "Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids," *Biochemical Pharmacology*, vol. 37, no. 13, pp. 2607–2611, 1988.

[59] S. Q. Xie, Z. Q. Zhang, G. Q. Hu, M. Xu, B. S. Ji, "HL-37, a novel anthracene derivative, induces Ca(2+)-mediated apoptosis in human breast cancer cells," *Toxicology*, vol. 254, no. 1-2, pp. 68-74, 2008.

[60] G. J. Du, Z. Zhang, X. D. Wen, "Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea," *Nutrients*, vol. 4, no. 11, pp. 1679-1691, 2012.

[61] I. Cordero-Herrera, M. A. Martín, L. Bravo, L. Goya, S. Ramos, "Epicatechin gallate induces cell death via p53 activation and stimulation of p38 and JNK in human colon cancer SW480 cells," *Nutrition and Cancer*, vol. 65, no. 65, pp. 718-728, 2013.

[62] Y.M. Lee, Y. Lim do, H. J. Cho et al., "Piceatannol, a natural stilbene from grapes, induces G1 cell cycle arrest in androgen insensitive DU145 human prostate cancer cells via the inhibition of CDK activity," *Cancer Letters*, vol. 285, no. 2, pp. 166-173, 2009.

[63] W. Nam, J. Tak, J. K. Ryu et al., "Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells," *Head Neck*, vol. 29, no. 4, pp. 335–340, 2007.

[64] S. Diaz-Moralli, M. Tarrado-Castellarnau, A. Miranda, M. Cascante, "Targeting cell cycle regulation in cancer therapy," *Pharmacology & Therapeutics*, vol.138, no. 2, pp. 255–271, 2013.

[65] Y. Kotobuki, L. Yang, S. Serada et al, "Periostin accelerates human malignant melanoma progression by modifying the melanoma microenvironment," *Pigment Cell Melanoma Research*, vol. 27, no. 4, pp. 630–639, 2014.

[66] F. Zhao, X. He, J. Sun et al., "Cancer stem cell vaccine expressing ESAT-6-gpi

and IL-21 inhibits melanoma growth and metastases.” *American Journal of Translational Research*, vol. 7, no. 10, pp. 1870-1882, 2015

[67] E. Maverakis, L. A. Cornelius, G. M. Bowen et al, “Metastatic melanoma—a review of current and future treatment options,” *Acta Dermato-venereologica*, vol. 95, no. 5, pp. 516-527, 2015.

[68] F. Tas, “Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors,” *Journal of Oncology*, vol. 2012, article ID 647684, 2012.

[69] J. Zhang, Z. Lei, Z. Huang, X. Zhang, Y. Zhou, Z. Luo, W. Zeng, J. Su, C. Peng, X. Chen. “Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) suppresses melanoma cell growth and metastasis by targeting TRAF6 activity.” *Oncotarget*, vol. 7, 79543–79557, 2016.

[70] J. Xie, J.P. Yun, Y.N. Yang, F. Hua, X.W. Zhang, H. Lin, et al. “A novel ECG analog 4-(S)-(2,4,6-trimethylthiobenzyl)-epigallocatechin gallate selectively induces apoptosis of B16-F10 melanoma via activation of autophagy and ROS.” *Scientific Reports*, 7 , pp. 42194, 2017.

[71] H. J. Ku, O. S. Kwon, B. S. Kang, D. S. Lee, H. S. Lee, J. W. Park. “IDH2 knockdown sensitizes tumor cells to emodin cytotoxicity in vitro and in vivo.” *Free Radical Research*, vol. 50, no. 10, pp 1089-1097, 2016.

[72] H. G. Farina, M. Pomies, D. F. Alonso, D. E. Gomez, “Antitumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer,” *Oncology Reports*, vol. 16, no. 4, pp. 885-892, 2006.

[73] S. J. Pradhan, R. Mishra, P. Sharma, G. C. Kundu, “Quercetin and sulforaphane in combination suppress the progression of melanoma through the down-regulation of matrix metalloproteinase-9,” *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 1, no. 6, pp. 915-920, 2010.

[74] M. W. Roomi, T. Kalinovsky, A. Niedzwiecki, and M. Rath, “Modulation of MMP-2 and -9 secretion by cytokines, inducers and inhibitors in human melanoma A-2058 cells,” *Oncology Reports*, vol. 37, no. 6, pp. 3681–3687, 2017.