

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR**

LUÍS ANTÔNIO LOUREIRO MAUÉS

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTINEOPLÁSICA
DE FLAVONÓIDES DA ESPÉCIE *Brosimum acutifolium* EM
MODELO DE GLIOBLASTOMA *in vitro***

Belém

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

LUÍS ANTÔNIO LOUREIRO MAUÉS

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTINEOPLÁSICA
DE FLAVONÓIDES DA ESPÉCIE *Brosimum acutifolium* EM
MODELO DE GLIOBLASTOMA *in vitro***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, área de concentração Neurociências, como requisito final para a obtenção do grau de doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luíz Martins do Nascimento

Belém

Maio/2013

LUÍS ANTÔNIO LOUREIRO MAUÉS

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTINEOPLÁSICA
DE FLAVONÓIDES DA ESPÉCIE *Brosimum acutifolium* EM
MODELO DE GLIOBLASTOMA *in vitro***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, área de concentração Neurociências, como requisito final para a obtenção do grau de doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. José Luíz Martins do Nascimento

Banca Avaliadora:

Prof^ª. Dra. Maria Elena Crespo-Lopez – Avaliadora
Laboratório de Farmacologia Molecular – ICB/UFPA

Prof^º. Dr. Milton Nascimento da Silva – Avaliador
Laboratório de Cromatografia Líquida – ICEN/UFPA

Prof^º Dr. Renato Augusto DaMatta – Avaliador
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF

Belém

Mai/2013

AGRADECIMENTOS

É difícil expressar em palavras o sentimento de gratidão por todos aqueles que sempre estiveram perto, confiando e apoiando, a realização deste trabalho. Gostaria expressar o quanto sou grato a todos em especial:

Ao Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento, meu orientador, por ter confiado em minha capacidade, permitindo a realização deste trabalho.

À banca avaliadora por aceitar participar neste processo avaliativo.

À Nádia Couto da Central de Extrações pelo fornecimento dos flavonoides testados neste trabalho.

À Erica Cardoso pela fundamental ajuda na execução desse trabalho. Obrigado por tudo.

À técnica Neidiane Ramos por cuidar do LNMC permitindo a boa execução do trabalho de todos.

Às minhas amigas Barbarella de Matos Macchi e Gilmara Tavares Bastos por estarem ao meu lado dando força e auxílio por todos esses anos.

Ao prof. Dr. Moises Miranda pelo auxílio com a citometria de fluxo; a técnica Fernanda do LBE pela M.E.; e ao Lab. de Citogenética pelo uso do sistema de captura de imagem em contraste de fase.

A todos os colegas e amigos do LNMC e de outros laboratórios que não poderia deixar de lembrá-los, obrigado por tudo.

À UFPA; PPGNBC; CAPES e FAPESPA.

RESUMO

Dentre os tumores que acometem o sistema nervoso, o glioblastoma multiforme (GBM), destaca-se por seu alto grau de agressividade e baixo prognóstico, apresentando em média uma sobrevida de 15 meses a partir do diagnóstico. O presente estudo objetivou investigar a atividade antiproliferativa e antineoplásica de quatro flavonoides isolados da espécie *Brosimum acutifolium* (Huber), duas flavanas: 4'-hidroxi-7,8-(2'',2'')-dimetilpirano) flavana (BAS-1) e 7,4'-dihidroxi-8,(3,3-dimetilalil)-flavana, (BAS-4); e duas chalconas: 4,2'-dihidroxi-3',4'-(2'',2'')-dimetilpirano)-chalcona (BAS-6) e 4,2',4'-trihidroxi-3'-(3,3-dimetilalil)-chalcona (BAS-7), em glioblastoma C6 de rato *in vitro*. Nossos resultados mostraram boa atividade citotóxica para as flavanas (BAS-1, -4) e para a chalcona BAS-7, com IC₅₀ menor que 100 µM em teste de viabilidade pelo MTT, já a chalcona BAS-6, não demonstrou atividade citotóxica nas concentrações testadas. Estes flavonoides mostram ser menos citotóxico para célula não neoplásica (glia), com grau de segurança maior para a BAS-4 e BAS-7, uma vez que apresentaram menor efeito citotóxico à célula não neoplásica e menores índices hemolíticos. A análise de migração celular mostrou que o tratamento com BAS-1, BAS-4 e BAS-7 em baixas concentrações foi efetivo em promover inibição da migração celular. Estes três flavonoides também foram muito promissores em inibir a formação e o crescimento de colônia, além de promover parada no ciclo celular, com substancial aumento na população SubG0 para o tratamento com BAS-1 e BAS-4 com 100 µM. As flavanas BAS-1 e BAS-4 também mostraram maior capacidade de promover a perda na integridade do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e aumento para marcação com anexina V, indicativo de que estas drogas promovem morte por apoptose. No entanto a análise por microscopia eletrônica demonstrou marcadamente no tratamento com a BAS-4 a presença de vacúolos autofágicos, sugestivo que o processo de morte neste tratamento ocorre tanto por apoptose quanto autofagia. Com base nestes resultados pode-se concluir que dos flavonoides testados a BAS-1, BAS-4 e BAS-7 possuem potencial como agente antineoplásico na terapia do GBM, sendo a BAS-4 a mais promissora de todas.

Palavras- chaves: *Brosimum acutifolium*; flavonoides; glioblastoma; GBM; C6; apoptose, autofagia.

ABSTRACT

Among the tumors that affect the nervous system, glioblastoma multiforme (GBM) is notable by its high degree of aggressiveness and poor prognosis, with an average survival of 15 months from diagnosis. The present study aimed to investigate the antiproliferative and antineoplastic activity of four flavonoids isolated from species *Brosimum acutifolium* (Huber). two flavans: 4'-hydroxy-7,8-(2'',2''-dimethylpyran)-flavan (BAS-1) and 7,4'-dihydroxy-8-(3,3-dimethylallyl)-flavan (BAS-4), and two chalcones: 4,2'-dihydroxy-3',4'-(2'',2''-dimethylpirano)-chalcone (BAS-6) and 4,2',4'-trihydroxy-3'-(3,3-dimethylallyl)-chalcone (BAS-7), tested on rat C6 glioblastoma *in vitro*. Our results showed good cytotoxic activity for flavans (BAS-1, -4) and the chalcone BAS-7, with IC50 less than 100 μ M in the MTT viability test, since the chalcone BAS-6, showed no cytotoxicity at the concentrations tested. These flavonoids showed less cytotoxicity for non-neoplastic cell (glia), with higher degree of security for the BAS and BAS-4-7, once showed lower cytotoxic effect on non-neoplastic cell, and less hemolytic. Analysis of cell migration showed that treatment with BAS-1; -4 and -7 at low concentrations was effective in promoting the inhibition of cell migration. These three flavonoids were also very promising in inhibiting colony formation and growth, and promote cell cycle arrest with a substantial increase in population SubG0 for treatment with BAS-1 and -4 with 100 μ M. The flavans BAS-1 and -4 also showed increased ability to promote losing in the integrity of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and increased for staining with Annexin V, indicating that these drugs cause death by apoptosis. However the analysis by electron microscopy showed markedly the presence of autophagic vacuoles in the treatment with BAS-4 suggesting that the process of cell death occurs by apoptosis as well as autophagy. Based on these results it can be concluded that the flavonoids BAS-1, -4, and -7 have potential as an anticancer agent in the therapy of GBM and BAS-4 is the most promising of all.

Keywords: *Brosimum acutifolium*; flavonoids; glioblastoma; GBM; C6; apoptosis, autophagy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Exsicata da espécie <i>Brosimum acutifolium</i> herborizado no herbário da EMBRAPA. (Fonte: Central de Extração da UFPA).....	03
Figura 02: Estrutura básica de um flavonoide e seu sistema de numeração. (Fonte: TRUEBA, 2003).....	04
Figura 03: Biossíntese da chalcona, um intermediário biossintético de flavonoides, e de uma flavanona, no exemplo a biossíntese do flavonoide naringenina. (Fonte: adaptada de DEWICK, 2009).....	05
Figura 04: Exemplo de alguns flavonoides e suas respectivas subclasses. (Fonte: LEITE, 2009).....	06
Figura 05: Flavonoides de <i>Brosimum acutifolium</i> . BAS-1: (2S)-4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)-flavana; BAS-2: (2S)-4'-hidroxi-7,8-(3''-hidroxi-2'',2''-dimetildihidropirano)-flavana; BAS-3: (2S)-4'-hidroxi-7,8-[2''(2-hidroisopropil)-dihidrofurano]-flavana; BAS-4: (2S)-7,4'-dihidroxi-8,(3,3-dimetilalil)-flavana; BAS-5: (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavana; BAS-6: 4,2'-dihidroxi-3',4'-(2'',2''-dimetilpirano)-chalcona; BAS-7: 4,2',4'-trihidroxi-3'-(3,3-dimetilalil)-chalcona; e BAS-8: 4',7-dihidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-flavanona. (Fonte: TORRES, 1998).....	09
Figura 06: Controle do ciclo celular efetuado pelas ciclinas A; B e E associadas com suas respectivas cinases dependentes de ciclinas (CDK ou CDC). Também é representado a extensão da fosforilação da proteína relacionada ao retinoblastoma (pRb) (Fonte: WEINBERG, 2008).....	11
Figura 07: Inibidores de cinases dependentes de ciclina. as INK4 (p16 ^{INK4A} , p15 ^{INK4B} , p18 ^{INK4C} , p19 ^{INK4D}), são específicas para complexos CDK4/6. A p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1} e p57 ^{Kip2} têm atividade mais ampla, inibindo nos estágios finais do ciclo (Fonte: WEINBERG, 2008).....	12
Figura 08: Vias de apoptose. É mostrado o processo “via receptores de morte” também chamada de “via extrínseca” e a “via mitocondrial” ou “via intrínseca”. (Fonte: http://www.sabiosciences.com/images/CellularApoptosisPathway).....	15
Figura 09: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma. (Fonte: INCA, 2011).....	17
Tabela 01. Principais tipos de tumores do Sistema Nervoso. (Fonte: Adaptado de Vescovi <i>et al.</i> , 2006).....	18
Figura 10: Possível relação para a ontogênese da célula propagadora do câncer cerebral (BCPC) e da formação do glioblastoma multiforme (GBM). (Fonte: Modificado de VAN MEIR <i>et al.</i> , 2010).....	19
Tabela 02: Classificação dos tumores do SNC pela OMS. (Fonte: Modificado de NIETO-SAMPEDRO <i>et al.</i> , 2011).....	20
Figura 11: Histopatologia de um caso típico de glioblastoma mostrando tecido tumoral celular glial com necrose central (x), com pseudopalisada nuclear perinecrotica e proliferação microvascular (setas). Coloração com hematoxilina & eosina; magnificação original 100x. (Fonte: PREUSSER <i>et al.</i> , 2011).....	21

Figura 12: Alvo molecular na terapia de gliomas malignos. (Fonte: Agarwal <i>et al.</i> , 2011).....	23
Figura 13: Viabilidade celular de glioblastoma C6 tratado por 24 h com a droga BAS-1 nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μ M. O gráfico menor mostra a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) em relação ao grupo Controle (meio de cultivo). $n = 3-4$ e $**p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	34
Figura 14: Curva temporal de viabilidade do glioblastoma C6. A linha cheia representa o grupo Controle e a linha tracejada o grupo tratado com 75 μ M de BAS-1. A análise foi efetuada nos tempos 0; 3; 12; 24 e 48 h após o tratamento. $n = 3-4$. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ em comparação ao tempo zero e $\#p < 0,01$ em comparação ao mesmo tempo no grupo controle (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	35
Figura 15: Viabilidade celular de glioblastoma C6 tratado por 24 h com a droga BAS-4 nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μ M. O gráfico menor representa a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) em relação ao grupo Controle (meio de cultivo). $n = 3-4$ e $**p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	36
Figura 16: Curva temporal de viabilidade do glioblastoma C6. A linha cheia representa o grupo Controle e a linha tracejada o grupo tratado com 100 μ M de BAS-4. A análise foi efetuada nos tempos 0; 3; 12; 24 e 48 h após o tratamento. $n = 3-4$. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ em comparação ao tempo zero e $\#p < 0,01$ em comparação ao mesmo tempo no grupo controle (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	37
Figura 17: Viabilidade celular de glioblastoma C6 tratado por 24 h com a droga BAS-6 nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μ M. O gráfico menor representa a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) em relação ao grupo Controle (meio de cultivo). $n = 3-4$ e $*p < 0,05$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	38
Figura 18: Viabilidade celular de glioblastoma C6 tratado por 24 h com a droga BAS-7 nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μ M. O gráfico menor representa a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) em relação ao grupo Controle (meio de cultivo). $n = 3-4$ e $**p < 0,05$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	39
Figura 19: Curva temporal de viabilidade do glioblastoma C6. A linha cheia representa o grupo Controle e a linha tracejada o grupo tratado com 100 μ M de BAS-7. A análise foi efetuada nos tempos 0; 3; 12; 24 e 48 h após o tratamento. $n = 3-4$. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ em comparação ao tempo zero e $\#p < 0,01$ em comparação ao mesmo tempo no grupo controle (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	40
Figura 20: Viabilidade celular de cultura de glia tratada por 24 h com as drogas BAS (-1; -4; -6 e -7) nas concentrações 100 e 150 μ M, mais o grupo controle e Veículo (DMSO 0,3 %). $n = 3-4$ e $*p < 0,05$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	41
Figura 21: Ensaio de hemólise para a incubação com os flavonoides BAS-1, BAS-4 e BAS-7 nas concentrações de 150 e 100 μ M. C+ Controle positivo. $**p < 0,01$ em relação ao controle positivo e $\#p < 0,01$ em relação intragrupo a concentração ao lado (ANOVA, seguido do teste de Tukey).....	42
Figura 22A: Microscopia de contraste de fase após tratamento por 24 h com as drogas BAS-1 e BAS-4 em diferentes concentrações, mais o controle. As setas brancas indicam células picnóticas, as setas verdes células com vacuolização. Objetiva de 40x. Escala 10 μ m.....	44

- Figura 22B:** Microscopia de contraste de fase após tratamento por 24 h com as drogas BAS-6 (150 μM) e BAS-7 em diferentes concentrações. As setas brancas indicam células picnóticas, as setas verdes células com vacuolização. Objetiva de 40x. Escala 10 μm 45
- Figura 23:** Ensaio de migração celular das células C6 tratadas com BAS-1; BAS-4 e BAS-7 nas concentrações de 25 μM e 50 μM . Também é mostrado o padrão de migração do controle e do tratamento com veículo (DMSO 0,3 %), nos tempos 0, 24 e 48 horas de incubação. Microscopia de contraste de fase. Aumento de 50x..... 46
- Figura 24:** Capacidade de formação de colônias de células C6 após o tratamento prévio por 24h com as drogas BAS-1 (50; 75 e 100 μM); BAS-4 (50; 75 e 100 μM) e BAS-7 (50; 100 e 150 μM). C – controle e V – veículo (0,3 % DMSO). Foram semeadas 1000 células viáveis por placa e no 14º dia de cultivo as colônias foram coradas com cristal violeta..... 48
- Figura 25:** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo com uso de iodeto de propídio, em células C6 após 24 h de tratamento com a droga BAS-1 nas concentrações de 25 μM , 50 μM , 75 μM e 100 μM , mostrando os parâmetros SubG0, G1/G0, S e G2/M. Também é mostrado o padrão de ciclo celular dos grupos controle e veículo (DMSO 0,3 %)...... 50
- Figura 26:** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo com uso de iodeto de propídio, em células C6 após 24 h de tratamento com a droga BAS-4 nas concentrações de 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM e controle, mostrando os parâmetros SubG0, G1/G0, S e G2/M..... 51
- Figura 27:** Análise do ciclo celular por citometria de fluxo com uso de iodeto de propídio, em células C6 após 24 h de tratamento com a droga BAS-7 nas concentrações de 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM e 150 μM e controle, mostrando os parâmetros SubG0, G1/G0, S e G2/M..... 52
- Figura 28:** Análise da integridade do potencial mitocondrial por citometria de fluxo com JC-1. A fluorescência verde elevada representa células com perda do potencial mitocondrial, a fluorescência vermelha elevada com baixa fluorescência verde indica as células viáveis. É mostrado o padrão do branco (ausência de JC-1), controle positivo (células fixadas), controle e tratamento com BAS-1 nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM 53
- Figura 29:** Análise da integridade do potencial mitocondrial por citometria de fluxo com JC-1. A fluorescência verde elevada representa células com perda do potencial mitocondrial, a fluorescência vermelha elevada com baixa fluorescência verde indica as células viáveis. É mostrado o padrão do controle e tratamento com BAS-4 nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 μM 54
- Figura 30:** Análise da integridade do potencial mitocondrial por citometria de fluxo com JC-1. A fluorescência verde elevada representa células com perda do potencial mitocondrial, a fluorescência vermelha elevada com baixa fluorescência verde indica as células viáveis. É mostrado o padrão do controle e tratamento com BAS-7 nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 μM 55
- Figura 31:** Análise por citometria de fluxo para apoptose/necrose usando como marcador anexina V-FITC e iodeto de propídio. É mostrado o padrão de 56

distribuição das células nos quadrantes viáveis, apoptose, apoptose tardia e necrose para o branco (sem marcadores), o controle (incubado somente com meio de cultivo) e o veículo (incubado com 0,3 % de DMSO).....

Figura 32: Análise por citometria de fluxo para apoptose/necrose, usando como marcador anexina V-FITC e iodeto de propídio, em células C6 tratadas por 24 h com BAS-1 nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μ M. Também é mostrado o padrão de marcação para o branco (sem marcador) e controle (incubado somente com meio de cultivo). Os quadrantes representam a distribuição das células em viáveis, apoptose, apoptose tardia e necrose..... 57

Figura 33: Análise por citometria de fluxo para apoptose/necrose, usando como marcador anexina V-FITC e iodeto de propídio, em células C6 tratadas por 24 h com BAS-4 nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 μ M, e controle. Os quadrantes representam a distribuição das células em viáveis, apoptose, apoptose tardia e necrose..... 58

Figura 34: Análise por citometria de fluxo para apoptose/necrose, usando como marcador anexina V-FITC e iodeto de propídio, em células C6 tratadas por 24 h com BAS-7 nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μ M, e controle. Os quadrantes representam a distribuição das células em viáveis, apoptose, apoptose tardia e necrose..... 59

Figura 35a: MET de glioblastoma C6. É mostrada a morfologia normal das células do controle em **A** (menor magnificação) e em **B** (destaque ampliado) apresentando organelas e núcleo com aspecto normal. Em **C** (menor magnificação) e **D** (ampliação) é demonstrado o padrão morfológico do tratamento com veículo (0,3% de DMSO), revelando não haver mudança no aspecto das estruturas celulares. Em **E** (menor magnificação) e **F** (destaque ampliado) é mostrado o padrão morfológico após o tratamento por 24 h com 75 μ M da droga BAS-1, onde é possível ver a ocorrência de processo de vacuolização (#), acúmulo de pequenas cisternas de membrana no interior da célula (seta) e uma figura com várias cisternas aglomeradas de lúmen expandido (§). **N** – núcleo; * - mitocôndrias; **G** – complexo de Golgi..... 61

Figura 35b: Microscopia eletrônica de transmissão de glioblastoma C6. Em **G** (menor magnificação) e **H** (destaque ampliado) é mostrada as alterações ultraestruturais após a incubação por 24 h com 75 μ M de BAS-4, onde é possível observar um número elevado de vacúolos no citosol (setas finas). Em **I** (menor magnificação) e **J** (ampliação) é mostrada as alterações ultraestruturais decorrente da incubação por 24 h com 100 μ M de BAS-4, nele podemos constatar além do elevado número de vacúolos (setas finas), a presença também de figura de mielina (seta cheia). Em **K** (menor magnificação) e **L** (ampliação) é mostrada as alterações ultraestruturais decorrente da incubação por 24 h com 150 μ M de BAS-7, onde é possível observar a presença de vacúolos (setas finas) e corpos eletrodensos no citosol (cabeça de seta). **N** – núcleo..... 62

LISTA DE ABREVIATURAS

- A1: Proteína da família Bcl-2, pró-apoptótica
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- Akt ou PKB: Proteína cinase B
- Apaf-1: Fator 1 ativador de protease apoptótica
- Apo1L : Ligante do receptor de morte, antígeno 1 de apoptose
- Apo2L: Ligante do receptor de morte, antígeno 2 de apoptose
- Apo3L: Ligante do receptor de morte, antígeno 3 de apoptose
- ARE: Elemento de resposta antioxidante
- ASK-1: Cinase-1 regulada por sinal de apoptose
- Bad: Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2
- Bak: Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2
- BAS: *Brosimum acutifolium* substância
- BAS-1: (2S)-4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)-flavona
- BAS-2: (2S)-4'-hidroxi-7,8-(3''-hidroxi-2'',2''-dimetildihidropirano)-flavona
- BAS-3: (2S)-4'-hidroxi-7,8-[2''(2-hidroisopropil)-dihidrofurano]-flavona
- BAS-4: (2S)-7,4'-dihidroxi-8,(3,3-dimetilalil)-flavona
- BAS-5: (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavona
- BAS-6: 4,2'-dihidroxi-3',4'-(2'',2''-dimetilpirano)-chalcona
- BAS-7: 4,2',4'-trihidroxi-3'-(3,3-dimetilalil)-chalcona
- BAS-8: 4',7-dihidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-flavanona
- Bax: Proteína da família Bcl-2, pró-apoptótica
- Bcl-2: Proteína antiapoptótica, relacionada ao gene do linfoma de célula B-2
- Bcl-w: Proteína antiapoptótica da família Bcl-2
- Bcl-XL: Proteína antiapoptótica da família Bcl-2
- Bid: Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2
- Bim: Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2
- C6: Linhagem de glioblastoma de rato
- CD95L: Ligante do receptor de morte
- CDKs (ou CDCs): Cinases dependentes de ciclina
- c-Jun: Proteína formadora do fator de transcrição AP-1
- COX-2: Enzima cicloxigenase 2
- DAXX: Proteína adaptadora

DDs: Domínio de morte

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco, meio nutritivo para célula

DISC: Complexo de sinalização indutor de morte

EDTA: Etilenodiaminotetracético

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico

EGFRvIII: Variante mutante do EGFR

ER: Receptor de estrogênio

ERK: Cinase regulada por sinal extracelular

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FADD: Domínio de morte associado a Fas (proteína)

Fas : Receptor de morte

FasL: Ligante do receptor de morte Fas

FBS: Soro fetal bovino

FGF2: Fator 2 de crescimento de fibroblasto

FITC: Isotiocianato de Flúoresceína

GBM: Glioblastoma multiforme

GFAP: Proteína acídica fibrilar glial

Hrk: Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2

IAPs: Inibidor de proteínas de apoptose

IC₅₀: Concentração capaz de inibir 50 %

EC₅₀: Concentração eficaz em produzir 50 % de efeito

INK4: Proteína supressora de tumor, inibidora de cinase Cdk4 e Cdk6.

JC-1: Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

JNK: Cinase c-Jun NH₂-terminal

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno

Mcl-1: Proteína antiapoptótica da família Bcl-2

mTOR: Alvo da rapamicina em mamíferos

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-E2: Fator nuclear 2 derivado de eritróide

Nrf2: Fator 2 relacionado ao NF-E2, fator de transcrição

NF-κB: Fator nuclear kappa-B

Noxa: Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2

NQOs: Quinona oxidoreduases

PI: Iodeto de Propídio

p14^{ARF}: Proteína de 14 kDa que inibe mdm2, promovendo

p16^{INK4A}: Proteína de 16 kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Ink

p15^{INK4B}: Proteína de 15 kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Ink

p18^{INK4C}: Proteína de 18 kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Ink

p19^{INK4D}: Proteína de 19 kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Ink

p21^{Cip1} (p21^{Waf1}): Proteína de 21 kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Cip

p27^{Kip1}: Proteína de 27 kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Kip

p57^{Kip2}: Proteína de 57 kDa inibidora de CDK (CDKI) da família Kip

p38 MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno p38

p53 ou TP53: Proteína supressora tumoral de 53 kDa

p70^{S6K}: Proteína cinase ribossomal S6 de 70 kDa

PARP: Poli-(ADP-Ribose) polimerase

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinase

PBS: Tampão fosfato salino

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaqueta

PDGFR: Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta

pRb: Proteína relacionada ao retinoblastoma

PTEN: Enzima fosfatase e homóloga à Tensina, conhecida como supressora tumoral

Puma: Proteína pró-apoptótica da família Bcl-2

Ras: GTPase monomérica que auxilia na condução de sinal de receptores tirosina cinase, frequentemente em resposta a sinais que estimulam a divisão celular.

S100B: Proteína específica glial, expressa principalmente em astrócitos

SAPK: Proteína cinase ativada por estresse

Smac/Diablo: Segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria

SNC: Sistema nervoso central

TGF- β : Fator de crescimento transformante β

TNFR-1: Receptor-1 do fator de necrose tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

TRADD: Proteína associada ao domínio de morte do TNFR-1

TRAIL: Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF

UV – ultravioleta

4E-BP1: proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E

$\Delta\Psi_m$: Potencial de Membrana Mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	USO DE PLANTAS MEDICINAIS PELA HUMANIDADE.....	1
1.2	BROSIMUM ACUTIFOLIUM.....	2
1.3	FLAVONOIDES.....	4
1.4	CICLO CELULAR.....	10
1.5	APOPTOSE E NECROSE.....	13
1.6	CÂNCER.....	16
1.7	GLIOMAS.....	19
1.8	GLIOBLASTOMA.....	21
1.9	GLIOBLASTOMA C6.....	24
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	FLAVONOIDES TESTADOS.....	26
3.2	CULTURA CELULAR DE GLIOBLASTOMA C6 DE RATO.....	26
3.3	CULTURA DE CÉLULAS DA GLIA.....	27
3.4	VIABILIDADE CELULAR.....	28
3.5	ENSAIO DE HEMÓLISE.....	28
3.6	MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE.....	29
3.7	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	29

3.8	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA.....	30
3.9	ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	30
3.10	INTEGRIDADE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$).....	31
3.11	ANÁLISE DE APOPTOSE/NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	32
3.12	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	32
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4	RESULTADOS.....	34
4.1	VIABILIDADE CELULAR.....	34
4.2	VIABILIDADE DE CÉLULAS NÃO NEOPLÁSICA (GLIA).....	41
4.3	ENSAIO DE HEMÓLISE.....	42
4.4	MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE.....	43
4.5	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	46
4.6	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA.....	47
4.7	ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
4.8	ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$).....	52
4.9	ANÁLISE DE APOPTOSE/NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	55
4.10	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	60
5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS PELA HUMANIDADE

A humanidade sempre buscou na natureza uma forma eficiente de sanar suas enfermidades. O emprego de plantas para o tratamento e a cura de doenças é prática tão antiga quanto à própria história humana. No entanto, por muito tempo, o uso dos recursos naturais tanto de origem mineral, animal e principalmente vegetal, com fins terapêuticos, baseou-se apenas no conhecimento etnofarmacológico, passado ao longo das gerações, sem que houvesse estudos científicos capazes de desvendar os reais princípios responsáveis por sua eficácia.

O reino vegetal, devido a sua imensa variedade de espécies, constitui a principal fonte de recurso natural para a pesquisa de possíveis agentes farmacológicos. No entanto, para que o pesquisador possa ter melhor direcionamento sobre qual espécie a ser investigada é fundamental a participação do conhecimento etnobotânico, o qual se ocupa do estudo do conhecimento e das conceituações desenvolvidas por qualquer sociedade a respeito do mundo vegetal, baseando-se em dois pontos principais: a coleta de plantas e a coleta de informações sobre o uso destas plantas (RADOMSKI, 2003).

Um dos principais procedimentos etnobotânicos utilizados pela humanidade para a descoberta das propriedades medicinais das plantas, foi através da observação do comportamento dos animais, como exemplo, a observação de que chimpanzés consomem em jejum folhas de certas plantas que os livram de vermes intestinais permitiu a descoberta de um potente antibiótico, a tiarubina A. Inúmeras espécies vegetais também tiveram seus efeitos farmacológicos comprovados a partir de experiências efetuadas no próprio homem, primeiro baseando-se no uso empírico das plantas, seguido da avaliação dos sinais e sintomas surgidos como consequência de seu uso (RADOMSKI, 2003).

Assim a construção do arsenal de informações sobre o uso terapêutico de plantas ao longo da história baseou-se, sobretudo, no conhecimento intuitivo de homens e mulheres que com o passar do tempo aprenderam a diferenciar as ervas benéficas daquelas tóxicas à saúde (LEITE, 2009).

O Brasil devido sua grande extensão territorial com diversos biomas é considerado um dos países com maior biodiversidade do mundo, contando com cerca de 50 mil espécies de plantas superiores. Deste total, estima-se que na Amazônia exista aproximadamente de 25 a 30 mil espécies, 16 mil na Mata Atlântica, 7 mil no Cerrado e as demais espécies distribuídas na Caatinga e na Floresta Subtropical (RADOMSKI, 2003). No entanto, considera-se que

apenas menos de 1% das espécies vegetais brasileiras tenham sido investigadas sob o ponto de vista químico e farmacológico (FERRO, 2008), o que demonstra um grande potencial de recursos no solo brasileiro, e em especial na região Amazônica, a serem investigados.

1.2 BROSIMUM ACUTIFOLIUM

A espécie *Brosimum acutifolium* pertence a família Moraceae, a qual inclui aproximadamente 50 gêneros e 1.500 espécies, predominantemente tropicais e subtropicais, estando representada no Brasil por 27 gêneros com cerca de 250 espécies (JACOMASSI *et al.*, 2007). Os representantes dessa família são predominantemente arbóreos ou arbustivos, sendo raros os herbáceos. Após incisão, quase todos tem um látex que flui, em alguns casos, de forma abundante das folhas, galhos e troncos (JOLY, 1976).

Muitas espécies de Moraceae são comercialmente exploradas pela indústria de madeira, papel, borracha e na produção da seda. Além disso, algumas espécies são de grande importância na produção de moléculas biologicamente ativas (JACOMASSI *et al.*, 2007).

Segundo León (2005) a família Moraceae está dividida em cinco tribos: Moreae, Artocarpeae, Castilleae, Dorstenieae e Ficeae. O gênero *Brosimum* pertence a tribo Dorstenieae e se distribui em toda a América tropical, foi descrito pela primeira vez por Swartz em 1788, que se baseou em duas espécies da Jamaica, *B. alicastrum* e *B. spurium*. Atualmente este gênero encontra-se subdividido em dois subgêneros, *Brosimum* e *Feroliai*, este último compreende cinco espécies morfológicamente bem definidas, diferente do subgênero *Brosimum* que se encontra subdividido em três seções: *Piratinera*, *Brosimopsis* e *Brosimum* (BERG, 1972 apud TORRES, 1998).

O gênero *Brosimum* é constituído de 40 espécies, ocupando uma área que compreende desde o México, Grandes Antilhas, Cuba, Jamaica até o sul do Brasil. Treze dessas espécies são encontradas na Bacia Amazônica, das quais duas (*B. melanopotamicum* e *B. potabile*) são exclusivas dessa região (BERG, 1972 apud TORRES, 1998).

A espécie *B. acutifolium* (Fig. 01), encontra-se subdividida em 3 subespécies: *B. acutifolium subsp acutifolium*, *B. acutifolium subsp interjectum* e *B. acutifolium subsp obovatum* (BERG 1972 apud TORRES 1998). A espécie *B. acutifolium* (Huber) Ducke, tem como sinônimos botânicos: *Brosimopsis obovata* Ducke, *Brosimum caniceps* Standl., *Piratinera acutifolia* (Huber) Pittier e é popularmente conhecida como amapá doce, mururé-da-terra-firme, mercúrio vegetal, mercúrio-da-terra-firme, ahua jonra, bois mondan, congona,

leche-caspi, manichi, muira-piranga, murare, murerú, murure-vermelho, mururi, urupi, takini, takweni, tamamuri (PLANTAMED, 2012; RAINFOREST-DATABASE, 2012).



Figura 01: Exsicata da espécie *Brosimum acutifolium* herborizado no herbário da EMBRAPA. (Fonte: Central de Extração da UFPA).

O uso da *B. acutifolium* é comum na medicina popular Amazônica, os índios Shipibo-Conibo no rio Ucayali, utilizam a casca em decocções para distúrbios gastro-intestinais, para purificar o sangue e regular o sistema nervoso. Os índios Wayãpi, na Guiana, também atribuem propriedades mágicas para a árvore, eles creem que o látex ajuda a protegê-los de feitiços ruins, também preparam decocção das raízes para tratar dores de cabeça e melhorar a memória, e usam a casca em banhos para tratar febres (RAINFOREST-DATABASE, 2012).

Também é conhecido o uso da *B. acutifolium* Huber subsp. *acutifolium* como alucinógeno em ritual xamanístico por índios das Guianas e do estado do Pará, da qual Moretti *et al.* (2006) comprovaram a presença do alucinógeno bufotenina como exclusivo desta subespécie.

Esta espécie é amplamente utilizada na medicina popular no tratamento do reumatismo e da artrite, bem como para as úlceras gástricas e úlceras da pele. Também é relatado seu uso como afrodisíaca e tônica, sendo usada no passado no tratamento da sífilis, que devido este uso, foi-lhe conferida o nome popular de "mercúrio vegetal", já que o uso de

compostos mercuriais constituía o tratamento principal para a sífilis no final de 1800 e início de 1900 (RAINFOREST-DATABASE, 2012).

Da casca da *B. acutifolium* já foram isolados vários compostos de diferentes classes de metabólitos, dentre estes, destaca-se a presença de compostos fenólicos como os flavonoides, cujas moléculas são grande interesse biológico (TORRES *et al.*, 1997, 1998, 2000; TAKASHIMA *et al.*, 2002, 2005).

1.3 FLAVONOIDES

O estudo dos chamados metabólitos secundários, tornou-se de maior interesse quando alguns cientistas, em meados do século XIX e início do século XX, estabeleceram a relação destes com a cura de várias patologias. Os metabólitos secundários são moléculas biossintetizadas a partir dos metabólitos primários (lipídios, carboidratos e aminoácidos), por intermédio de reações enzimáticas ocorridas no interior das células vegetais (LEITE, 2009).

Como exemplo dos principais grupos de compostos do metabolismo secundário, podemos citar: os alcaloides, os ácidos orgânicos, os compostos fenólicos (simples ou complexos como os taninos), as cumarinas, os glicosídeos cardiotônicos, as antraquinonas, as saponinas, as lignanas, as mucilagens, os óleos essenciais, as gomas, os compostos sulfurados e os flavonoides (FERRO, 2008).

Os flavonoides constituem um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificado entre os produtos de origem vegetal, principalmente dentre as angiospermas, sendo quase ausente em algas. O termo flavonoide deriva do latim *flavus*, que significa amarelo, em virtude da cor que estes conferem às flores. Quimicamente são heterosídeos, cujo esqueleto base contém 15 carbonos derivados dos fenilpropanoides (Fig. 02) (FERRO, 2008).

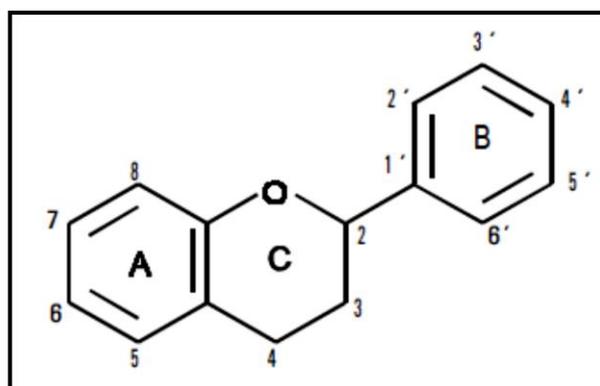


Figura 02: Estrutura básica de um flavonoide e seu sistema de numeração. (Fonte: TRUEBA, 2003).

Os flavonoides resultam da condensação de uma unidade 4-hidroxicinamoil-CoA, originada da rota do chiquimato, com três moléculas de malonil-CoA, integrante da rota do acetato, sob ação da enzima chalcona sintase. O acoplamento dessas quatro moléculas promove a formação de uma chalcona, que está em equilíbrio com a forma cíclica de uma flavanona (Fig. 03). Por sua vez, as chalconas atuam como precursoras de vasto número de derivados flavonóidicos, os quais são classificados em subclasses, como flavanonas, flavonas, flavonóis, flavanonóis, leucoantocianidinas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas e biflavonoides (Fig. 04). (LEITE, 2009).

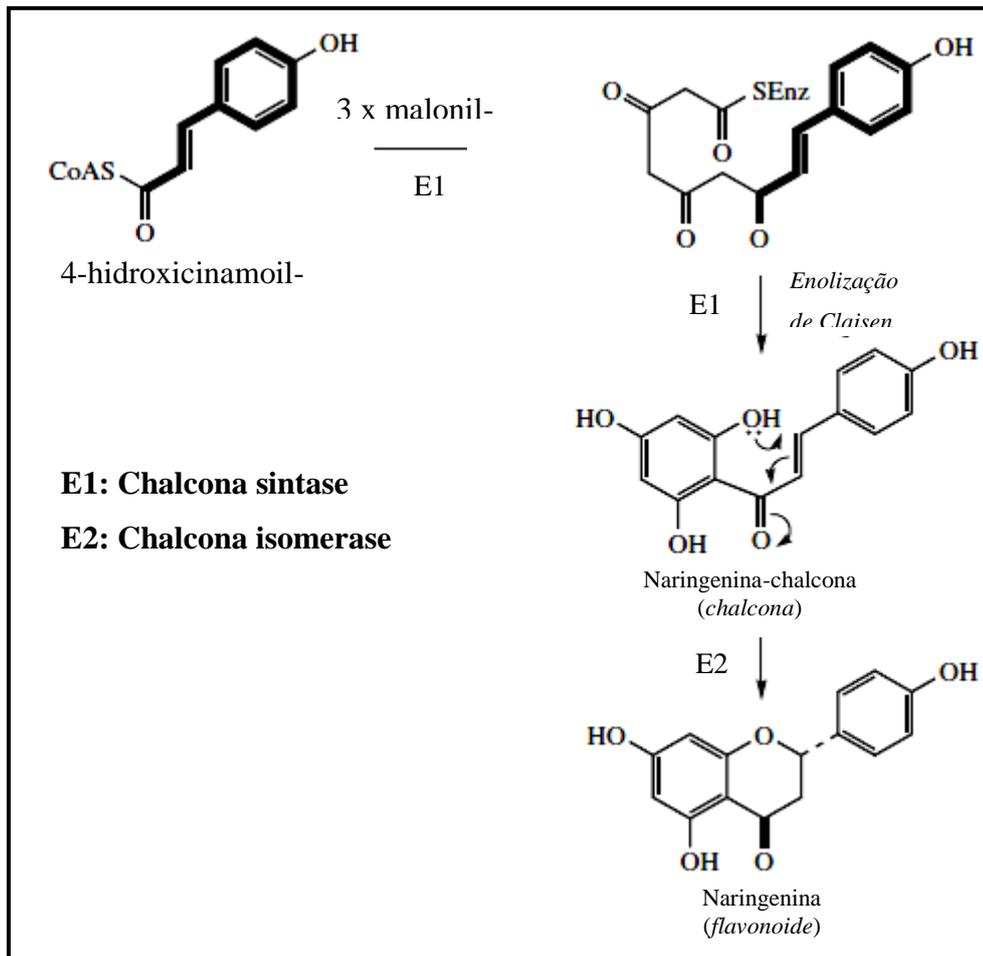


Figura 03: Biossíntese da chalcona, um intermediário biossintético de flavonoides, e de uma flavanona, no exemplo a biossíntese do flavonoide naringenina. (Fonte: adaptada de DEWICK, 2009).

São conhecidos mais de 4200 flavonoides, os de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (geninas ligadas a unidade de açúcar), mas também podem aparecer na forma livre (geninas sem unidade de açúcar) (FERRO, 2008; LEITE, 2009).

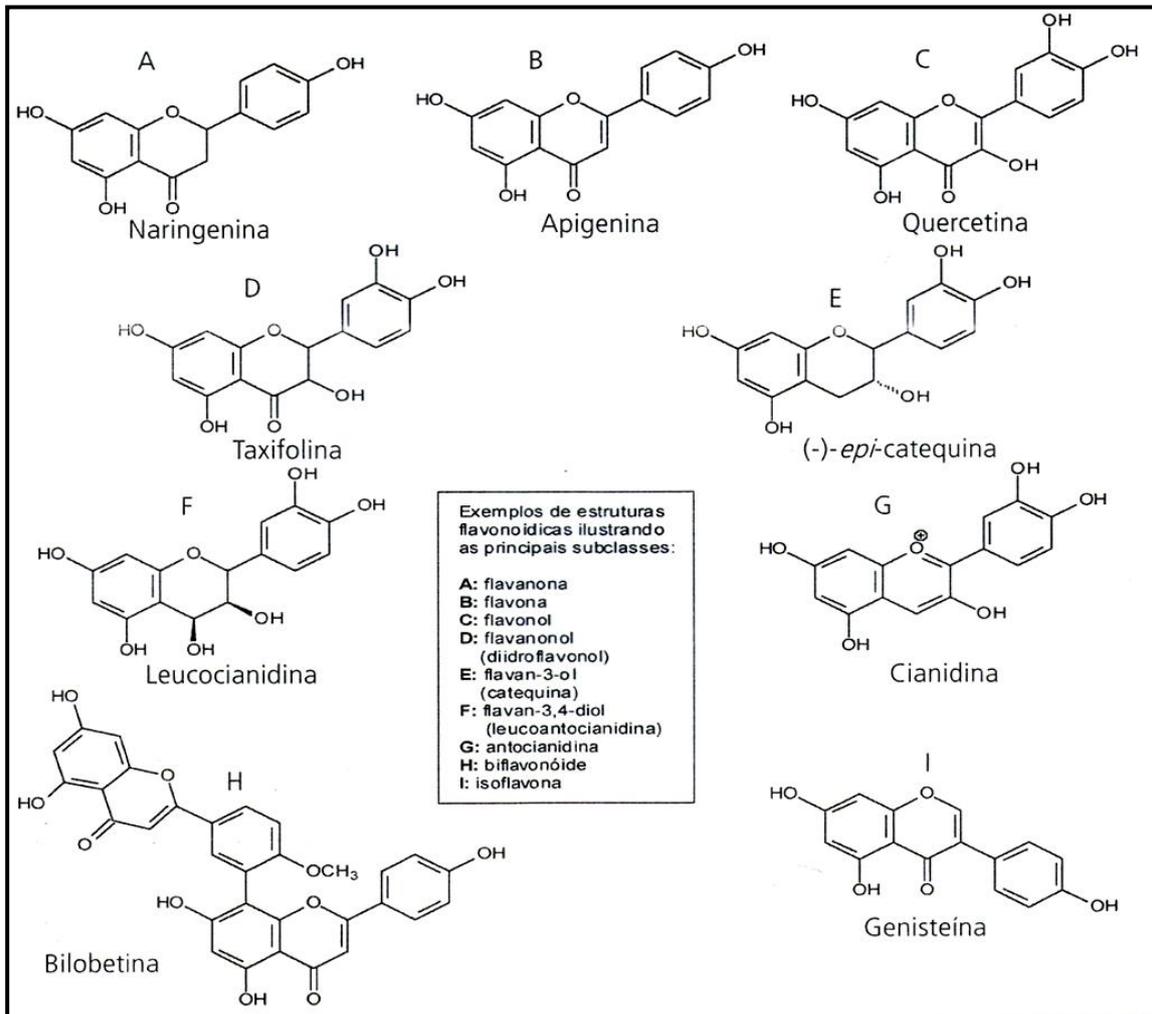


Figura 04: Exemplo de alguns flavonoides e suas respectivas subclasses. (Fonte: LEITE, 2009).

Estudos farmacocinéticos demonstram que os glicosídeos flavônicos apresentam baixa absorção direta no trato gastrointestinal (devido a presença do açúcar), já as geninas livres são capazes de atravessar a parede intestinal mais facilmente, sendo assim melhor absorvidas em relação aos glicosídeos, no entanto, quando os glicosídeos flavônicos são ingeridos na dieta humana, esses compostos sofrem hidrólise por bactérias presentes na flora intestinal, liberando a genina que será absorvida no intestino (LEITE, 2009).

Os flavonoides são regularmente consumidos na dieta e estão presentes em alta concentração em frutos e em outros alimentos de origem vegetal, como no chá e em outras bebidas. Assim muitos dos benefícios à saúde relacionados à dieta Mediterrânea, baseada no consumo do vinho como acompanhamento nas alimentações, são atribuídos a presença de compostos fenólicos, dentre os quais os flavonoides (JOHNSON *et al.*, 2009).

Estudos sugerem que a presença dos flavonoides nos vegetais estaria envolvida na proteção dos tecidos da planta contra uma exposição crônica a luz ultravioleta, já que estas moléculas apresentam propriedades antioxidantes. Assim, o consumo de flavonoides pode fornecer proteção de curto e de longo prazo contra o estresse oxidativo, através de uma variedade de mecanismos (JOHNSON *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011).

Muitos flavonoides são potentes antioxidantes, neutralizando espécies reativas de oxigênio (EROs) tóxicas, por doar íons hidrogênio. No entanto, potencialmente ainda mais importante, os flavonoides podem modular múltiplas vias de sinalização intracelular e induzir a expressão de proteínas de fase II, as quais são reguladas pelo fator de transcrição, fator 2 relacionado ao NF-E2 (Nrf2), o qual se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) no núcleo das células, especificamente na região promotora dos genes que transcrevem enzimas antioxidantes endógenas. A ativação Nrf2/ARE induz a produção da γ -glutamylcisteína ligase e glutathione-sintetase, enzimas que regulam etapas chave na biossíntese da glutathione, além disso induz superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, peroxiredoxinas, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), quinona oxidoreduzases (NQOs) e hemoxigenases (JOHNSON *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011).

Juntas essas enzimas participam de um potente mecanismo antioxidante de defesa celular que protegem contra o estresse oxidativo ao catalisar uma variedade de reações que neutralizam EROs, eletrófilos tóxicos e carcinógenos (JOHNSON *et al.*, 2009; LEE *et al.* 2011). Assim, o consumo de flavonoides pode fornecer proteção de curto e de longo prazo contra o estresse oxidativo através de uma variedade de mecanismos.

Além da ação antioxidante, os flavonoides também são conhecidos por apresentarem muitas outras propriedades terapêuticas tais como efeito anti-inflamatório, antialérgico, hepato protetor, antitrombótico, antiviral e atividade anticarcinogênica (AALINKEEL *et al.*, 2008). Por exemplo, a apigenina, um flavonoide relativamente não tóxico e não mutagênico, pode suprimir a ativação do fator nuclear Kappa-B (NF- κ B) mediado por fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K) / proteína cinase B (também chamada Akt). Este fator nuclear é um indutor de proteínas antiapoptóticas, principalmente a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) (KANG *et al.*, 2009), a qual está diretamente relacionada ao processo inflamatório. Assim, com a supressão

da via do NF- κ B, é possível explicar a resposta anti-inflamatória que muitos flavonoides apresentam.

Evidências recentes mostram que os flavonoides e seus metabólitos exercem outros efeitos intracelulares, incluindo a habilidade de modular diretamente a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), a qual regula um amplo número de processos, incluindo crescimento e diferenciação celular, expressão gênica, mitose, mobilidade celular, metabolismo, sobrevivência da célula, apoptose e embriogênese (KIM *et al.*, 2008).

Torres (1998) isolou oito flavonoides (Fig. 05) da espécie *B. acutifolium*, que para praticidade, foram nomeados de BAS (*Brosimum acutifolium* substância). Destes, cinco são flavanas: (2S)-4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)-flavana (**BAS-1**); (2S)-4'-hidroxi-7,8-(3''-hidroxi-2'',2''-dimetildihidropirano)-flavana (**BAS-2**); (2S)-4'-hidroxi-7,8-[2''(2-hidroisopropil)-dihidrofurano]-flavana (**BAS-3**); (2S)-7,4'-dihidroxi-8,(3,3-dimetilalil)-flavana (**BAS-4**), denominada brosimina B (TORRES *et al.*, 2000); (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavana (**BAS-5**). Duas são chalconas: 4,2'-dihidroxi-3',4'-(2'',2''-dimetilpirano)-chalcona (**BAS-6**), também conhecida como hidroxilonchocarpina, e 4,2',4'-trihidroxi-3'-(3,3-dimetilalil)-chalcona (**BAS-7**), também conhecida como 4-hidroxiisocordoina ou isobavachalcona; e uma flavanona: 4',7-dihidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-flavanona (**BAS-8**), também chamada de isobavachina. No presente trabalho foram testados quatro destes oito flavonoides, as flavanas **BAS-1** e **BAS-4**, e as chalconas **BAS-6** e **BAS-7**, visto que estas formam pares que apresentam apenas como diferença estrutural a ciclização molecular com a formação de um novo anel heterocíclico.

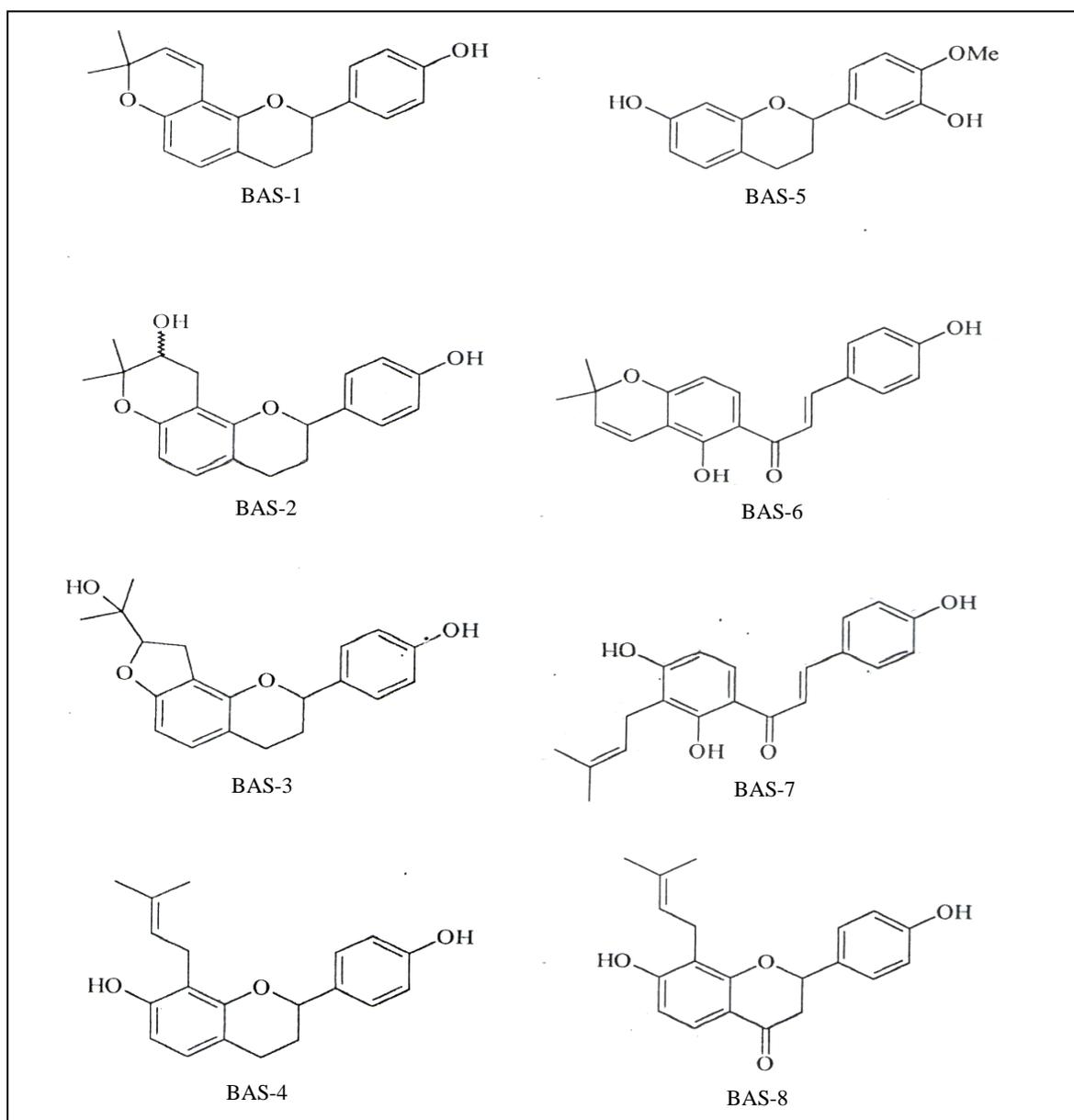


Figura 05: Flavonoides de *Brosimum acutifolium*. **BAS-1:** (2S)-4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)-flavana; **BAS-2:** (2S)-4'-hidroxi-7,8-(3''-hidroxi-2'',2''-dimetildihidropirano)-flavana; **BAS-3:** (2S)-4'-hidroxi-7,8-[2''(2-hidroisopropil)-dihidrofurano]-flavana; **BAS-4:** (2S)-7,4'-dihidroxi-8,(3,3-dimetilalil)-flavana; **BAS-5:** (2S)-7,3'-dihidroxi-4'-metoxiflavana; **BAS-6:** 4,2'-dihidroxi-3',4'-(2'',2''-dimetilpirano)-chalcona; **BAS-7:** 4,2',4'-trihidroxi-3'-(3,3-dimetilalil)-chalcona; e **BAS-8:** 4',7'-dihidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-flavanona. (Fonte: TORRES, 1998).

1.4 CICLO CELULAR

O destino das células no organismo é ditado pelos sinais que cada uma delas recebe de seus arredores, assim, quase todos os tipos de células normais não proliferarão a menos que sejam induzidas a fazê-lo por fatores de crescimento mitogênicos. Além disso, sinais extracelulares podem também fazer com que a célula adentre em um estado diferenciado, pós-mitótico, do qual ela não retornará para continuar proliferando (WEINBERG, 2008).

Durante o ciclo de vida das células eucarióticas, a replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN) está limitada a um intervalo de tempo específico, a fase S. Vários mecanismos de controle asseguram que cada sequência de ADN cromossômico seja replicado apenas uma única vez no período de uma divisão celular até a próxima. Durante a fase de mitose chamada M, observa-se a divisão dos cromossomos homólogos e a distribuição destes de modo igualitário permitindo o surgimento de duas células filhas. Durante o ciclo celular duas fases de intervalo, onde o conteúdo de ADN da célula não sofre alteração são observadas e chamadas de G1 e G2, uma do fim da fase M até a fase S e a outra separando a fase S da fase M, respectivamente (Fig. 06) (ALFIERI *et al.*, 2009).

Quando privada de fatores de crescimento, as células de mamíferos deixam a fase G1 e entram num estado quiescente reversível referido como G0. Após a restauração dos fatores de crescimento, vias de transdução de sinal são ativadas, levando para o início da fase S. Um ponto de controle importante na transição de G0/G1 para S é chamado de ponto de restrição (R), e é definido como o ponto do ciclo celular em G1, após o qual uma célula, mesmo após a remoção de fatores de crescimento, irá entrar na fase S (Fig. 06) (ALFIERI *et al.*, 2009).

Outros dois pontos de controle são observados: o ponto de verificação G2/M, onde o sistema de controle desencadeia os eventos mitóticos iniciais que levam ao alinhamento dos cromossomos no fuso metafásico, e o ponto de transição entre metáfase e anáfase, onde o sistema de controle estimula a separação das cromátides-irmãs, levando a conclusão da mitose e da citocinese (BLAGOSKLONNY & PARDEE, 2002; ALBERTS *et al.*, 2010).

O controle do ciclo celular é realizado por proteínas cinase dependentes de ciclinas (CDKs) (Fig. 06). Durante a maior parte da fase G1 do ciclo celular, duas CDKs de atividade similar, CDK4 e CDK6, estão ativas e dependem das ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3). Após o ponto R na fase tardia de G1, as ciclinas do tipo E (E1 e E2) associam-se à CDK2 para permitir a fosforilação de substratos apropriados requeridos para a fase S. À medida que a célula entra na fase S, as ciclinas do tipo A (A1 e A2), substituem as ciclinas E como parceiras da CDK2 e assim permitem a progressão da fase S. Mais tarde na fase S, as ciclinas

A trocam de parceiras, deixando a CDK2 e associando-se a CDK1 chamada CDC2. À medida que segue o ciclo celular, adentrando a fase G₂, as ciclinas A são substituídas como parceiras de CDC2 pelas ciclinas tipo B (B1 e B2). Finalmente, no início da fase M, os complexos formados entre CDC2 e ciclinas B desencadeiam vários eventos da prófase, anáfase e telófase (KALDIS & ALEEM, 2005; FOIJER & RIELE, 2006; WEINBERG, 2008).

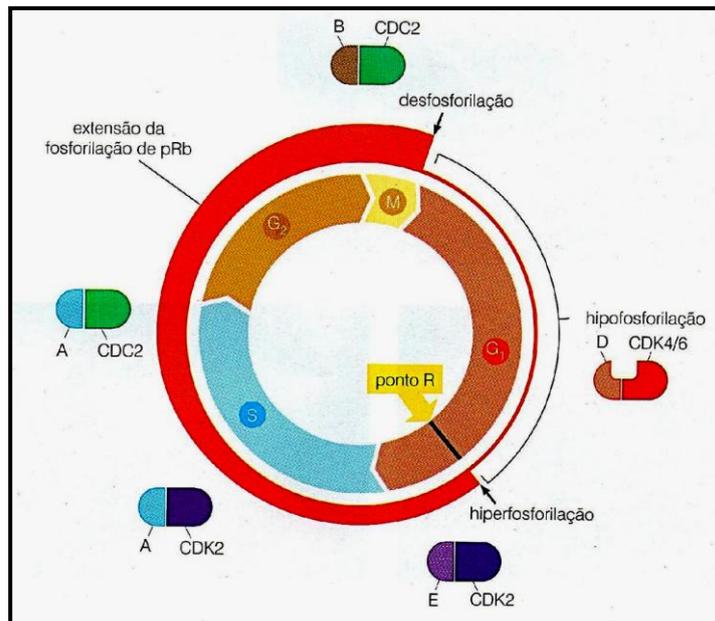


Figura 06: Controle do ciclo celular efetuado pelas ciclinas A; B e E associadas com suas respectivas cinases dependentes de ciclinas (CDK ou CDC). Também é representado a extensão da fosforilação da proteína relacionada ao retinoblastoma (pRb) (Fonte: WEINBERG, 2008).

Os complexos ciclina-CDK também são regulados por inibidores de CDK (Fig. 07). Um grupo de quatro dessas proteínas, as INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}), são específicas para complexos CDK4 e CDK6, não tendo efeito sobre CDC2 e CDK2. Os três inibidores remanescentes, p21^{Cip1} (algumas vezes chamado p21^{Waf1}), p27^{Kip1} e p57^{Kip2} têm atividade mais ampla, inibindo nos estágios finais do ciclo (FOIJER & RIELE, 2006; WEINBERG, 2008).

A proteína relacionada ao retinoblastoma (Rb) através de seu grau de fosforilação controla o progresso do ciclo celular, ela age durante a maior parte da fase G₁ inibindo o progresso do ciclo, porém ao ser hiperfosforilada no final de G₁ deixa de ser ativa, e assim permite com que a células passe pelo ponto R (WEINBERG, 2008; ALFIERI *et al.*, 2009).

Os genes reguladores do ciclo celular têm uma grande importância para o crescimento dos gliomas. As vias Rb e p53, que governam a transição da fase G1 para S do ciclo celular, podem sofrer mutações de inativação no glioblastoma. A ausência ou mau funcionamento destes guardiões do ciclo celular torna as células tumorais sensíveis à divisão celular impulsionada por mitógenos constitutivamente ativos, tais como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), fazendo com que estas células proliferem intensamente (NIETO-SAMPEDRO *et al.*, 2011).

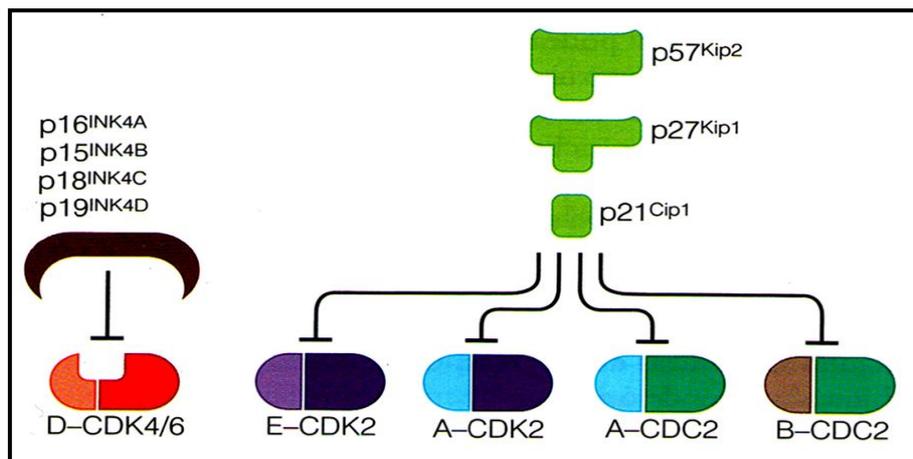


Figura 07: Inibidores de cinases dependentes de ciclina. as INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}), são específicas para complexos CDK4/6. A p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2} têm atividade mais ampla, inibindo nos estágios finais do ciclo (Fonte: WEINBERG, 2008).

As MAPKs pertencem a uma família altamente conservada de serina/treonina cinases, incluindo cinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) e cinase c-Jun NH2-terminal (JNK). São todas moléculas de sinalização importantes no controle da resposta celular a estímulos de fora da célula, e podem ter seu funcionamento alterado por tratamento farmacológico, tornando-se assim importantes alvos investigados na pesquisa de novos quimioterápicos voltados para a terapia de muitos cânceres (KANDIL *et al.*, 2013; KHARAZIHA *et al.*, 2013; YANAE *et al.*, 2011).

Já a p53, em caso de agressão ao ADN é conhecida por ativar a transcrição de genes como *Noxa*, *Puma*, *Bax*, *Apaf-1*, *Fas*, os quais participam no mecanismo de morte por apoptose, assim como reprimir a transcrição de *Bcl-2* e *IAP*, os quais tem papel anti-apoptótico. Contudo, independente do controle transcricional sobre esses genes, a p53 também tem sido envolvida no programa apoptótico por ativar diretamente a proteína Bax a permeabilizar a mitocôndria (BRAS *et al.*, 2005).

1.5 APOPTOSE E NECROSE

Historicamente duas formas de morte celular são distinguidas, a necrose e a apoptose (morte celular programada). A necrose é frequentemente definida como uma forma “violenta”, acidental, de morte celular iniciada por estímulo ambiental e resultando em uma rápida ruptura da homeostasia. Como principal característica da necrose, a célula incha e a integridade da membrana plasmática é perdida, com um subsequente influxo de água e a saída de conteúdo da célula para a periferia. O metabolismo energético é finalmente interrompido e as organelas celulares desintegradas. Quando ocorre no tecido, tal processo pode desencadear uma resposta inflamatória (BOUJRAD, 2007; BRAS *et al.*, 2005).

Já a apoptose tem sido descrita como uma sequência típica de eventos, iniciada com o arredondamento da célula, perdendo o contato com a sua vizinhança, a célula condensa e a membrana plasmática sofre convulsão. No núcleo o ADN condensa e forma uma capa ao longo da membrana nuclear interna. Por fim a célula apoptótica pode dividir-se em corpos apoptóticos, que são vesículas contendo partes do conteúdo celular, os quais serão fagocitados por macrófagos ou por células na vizinhança, sem provocar um processo inflamatório (BOUJRAD, 2007). Neste processo ocorre exposição de fosfatidilserina na face extracelular da membrana plasmática, a qual tem papel sinalizador para o processo de fagocitose pelo macrófago. Desse modo a detecção da exposição de fosfatidilserina no lado extracelular da membrana plasmática é comumente usada na pesquisa como indicador de célula em apoptose (SCHUTTERS & REUTELINGSPERGER, 2010).

O processo apoptótico pode ser dividido em três fases: iniciação, decisão e degradação. Em muitos casos, a apoptose ocorre quando uma família de cisteína proteases conhecida como caspases são ativadas, podendo assim o processo de morte ser referido como caspase dependente ou independente. Recentemente, dados também indicam que haja uma via ativa de necrose programada caspase independente (BOUJRAD, 2007).

De acordo com o envolvimento lisossomal, o processo de morte celular programada pode ocorrer de três formas. O processo de morte celular programada do tipo I, caracterizado pelo enrugamento celular, fragmentação do ADN oligonucleosomal, condensação da cromatina levando ao aparecimento de núcleo picnótico e desintegração controlada da célula dentro dos chamados corpos apoptóticos (BRAS *et al.*, 2005).

Em contraste, o tipo II é caracterizado por autofagocitose de organelas celulares. Esta forma de morte celular é caracterizada primariamente pela formação de vacúolos autofágicos, tão bem como pela dilatação da mitocôndria e do retículo endoplasmático e leve alargamento

do Golgi. Por fim o vacúolo autofágico fusionará com os lisossomos permitindo que os componentes celulares sequestrados possam ser degradados (BRAS *et al.*, 2005).

O tipo III, semelhante à necrose, é caracterizado pela ausência de implicação lisossomal e pode ser subdividido em duas categorias, IIIA e IIIB. Ambas são marcadas pelo inchaço de organelas intracelulares, quebra da membrana plasmática, e desintegração do citoplasma, embora o tipo IIIB envolva uma destruição mais moderada do citoplasma, em conjugação com dilatação de cisternas do retículo endoplasmático rugoso e a habilidade de matar a célula por heterofagocitose (BRAS *et al.*, 2005).

A morte celular programada do tipo I, ou apoptose, é a melhor caracterizada. A característica chave desse processo é a ativação de caspases. Este modo de morte pode ser ativado “via receptores de morte” também conhecida como “via extrínseca”, ou pela “via mitocondrial” também chamada “via intrínseca” (Fig. 08) (BOUJRAD, 2007).

A via intrínseca envolve perda do potencial de membrana mitocondrial em resposta ao sinal de morte, levando a permeabilização da membrana externa desta organela. Isto dispara a liberação de moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c e Smac/Diablo no citoplasma. O citocromo c liga-se ao fator 1 ativador de protease apoptótica (Apaf-1), auxiliando na oligomerização e recrutamento de procaspase-9 para formar um apoptossomo funcional. Ao mesmo tempo, Smac/Diablo inibem o Inibidor de Proteínas de Apoptose (IAPs). O complexo apoptossomo proteoliticamente processa procaspase-9 para a forma ativa, o qual por fim leva a morte celular por ativar o efetor caspase-3 (Fig. 08) (ARYA *et al.*, 2007).

A via extrínseca transduz o sinal de morte através da ligação de um “ligante de morte extracelular” como TNF- α , ligante Fas [FasL]/Apo1L/CD95L, Trail/Apo2L, Apo3L, aos seus respectíveis receptores de superfície celular (Fig. 08). Permitindo que o domínio de morte (DDs) destes receptores (receptor-1 do fator de necrose tumoral (TNFR-1) e receptor Fas) interajam com seus respectivos adaptadores moleculares TRADD e FADD gerando o complexo sinalizador de indução de morte (DISC) que ativa caspase-8, a qual por sua vez dispara caspase 3 mediando eventos de morte celular (ARYA *et al.*, 2007; BOUJRAD, 2007).

A via apoptótica induzida por Fas também pode recrutar a proteína adaptadora DAXX em vez de FADD, para ativar a cinase-1 regulada por sinal de apoptose (ASK-1), a qual ativa SAPK/JNK e assim disparar a apoptose (ARYA *et al.*, 2007).

A via de sinal de morte extrínseca está ligada a via intrínseca através das proteínas da família Bcl-2, a qual inclui membros tanto pró- (Bax, Bad, Bak, Bid, Bim, Puma, Noxa, Hrk) e antiapoptótico (Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 e Bcl-2). É o balanço entre as proteínas desta

família com funções opostas que atuam decidindo a liberação do citocromo c e Smac/Diablo da mitocôndria (Fig. 08) (ALMAWI *et al.*, 2004; ARYA *et al.*, 2007).

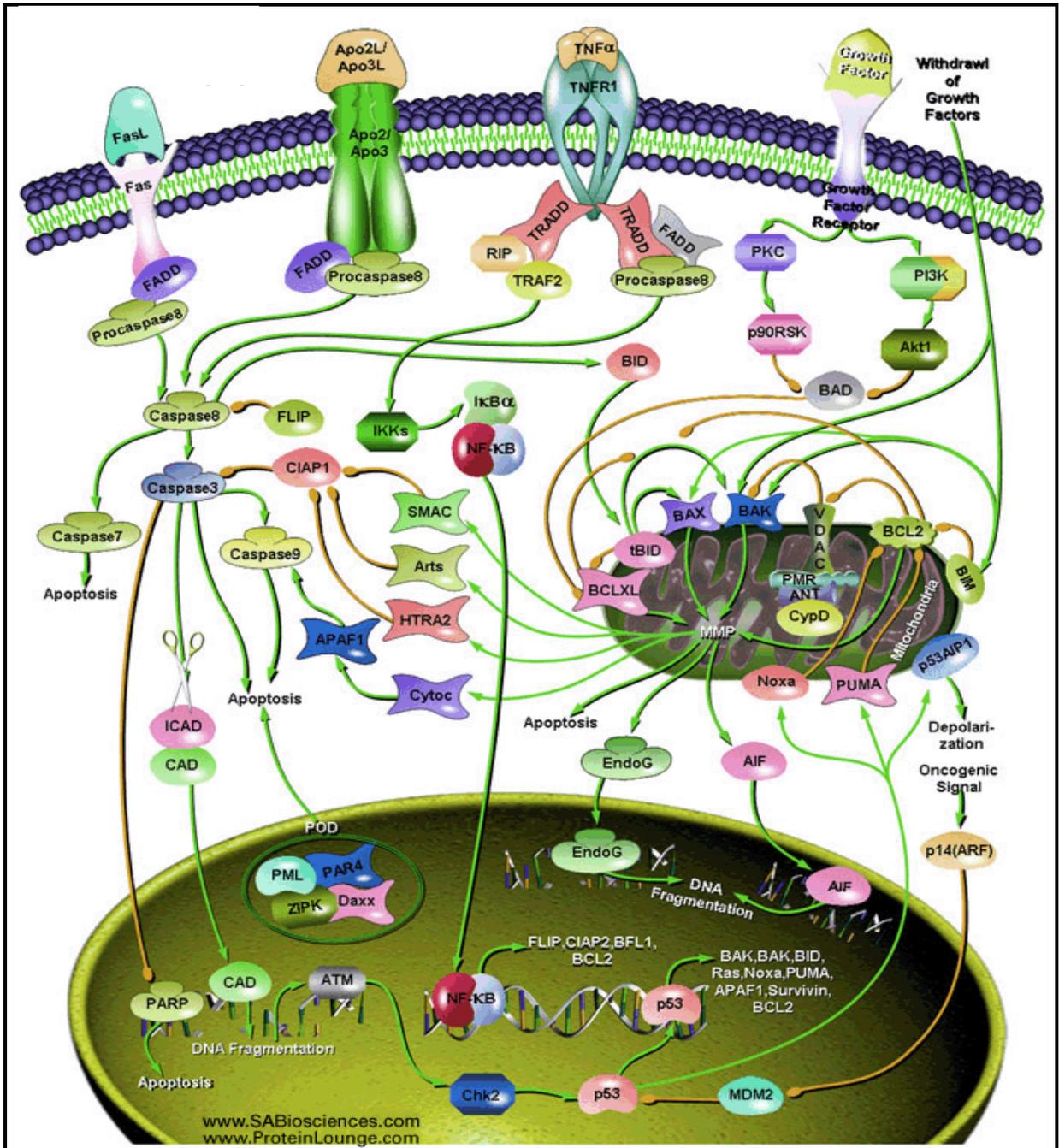


Figura 08: Vias de apoptose. É mostrado o processo “via receptores de morte” também chamada de “via extrínseca” e a “via mitocondrial” ou “via intrínseca”. (Fonte: <http://www.sabiosciences.com/images/CellularApoptosis Pathway>).

Os sinais de indução de morte estão intimamente ligados a sinais de sobrevivência. Uma destas cascatas que promove a sobrevivência da célula utiliza a serina/treonina cinase (Akt), a qual é ativada através do fosfoinositídeo 3 cinase (PI(3)K) por vários fatores de crescimento. A fosforilação estabiliza Akt, o qual além de ativar o NF- κ B, induz fosforilação do Bad, o qual resulta em maior dissociação do Bcl-XL. O Bad fosforilado é sequestrado pela proteína citosólica 14-3-3, esta não permite sua translocação para a mitocôndria e consequentemente os eventos apoptóticos a seguir não serão disparados (ARYA *et al.*, 2007).

Assim a aferição da taxa de ativação dos diferentes tipos de caspases, ou a quantificação dos elementos da família Bcl-2, ou medição da taxa de ativação da Akt, em testes com drogas experimentais, serve como indicador da eficácia ou não do tratamento em conduzir a ativação de morte por processo apoptótico.

1.6 CÂNCER

O câncer é um termo usado para doenças nas quais células anormais tendem a se dividir descontroladamente podendo invadir o tecido ao seu redor, constituindo as chamadas neoplasias (NCI, 2012). Não há um único tipo de câncer, na verdade o câncer engloba um conjunto de doenças com mais de cem tipos diferentes, haja vista que não é uma simples coleção homogênea de células, ao invés disso, um tumor é um sistema orgânico constituído de compartimento neoplásico, com vasculatura associada, células inflamatórias, e componentes celulares e extracelulares reativos (RICH & EYLER, 2008; INCA, 2011).

As células neoplásicas também podem sair do local de origem e se espalhar através da corrente sanguínea ou linfática para outras partes do corpo num processo conhecido como metástase. Desde que as células neoplásicas não se tornem invasivas, o tumor é considerado benigno, o que normalmente permite sua remissão completa por destruição ou remoção. Um tumor é considerado um câncer apenas se for maligno, ou seja, se suas células tiverem adquirido a capacidade de invadir tecidos adjacentes (ALBERTS *et al.*, 2010; NCI, 2012).

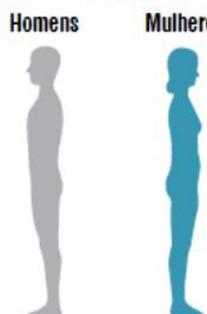
O processo pelo qual células normais tornam-se progressivamente malignas exige uma aquisição sequencial de mutações que surgem como resposta de dano ao genoma. Esta agressão genômica pode resultar de processos endógenos (erros na replicação do ADN, ataque de radicais livres gerados durante o metabolismo) ou decorrente de interações com agentes exógenos (radiação ionizante, agentes químicos cancerígenos). As células possuem meios de

reparo a tais danos, mas por várias razões, ocorrem mutações com mudanças permanentes no genoma levando ao desenvolvimento de neoplasias (BERTRAM, 2001).

Muitos cânceres são nomeados pelo órgão ou tipo de célula da qual se originou, por exemplo, um câncer que se origina do cólon é chamado de câncer de cólon, cânceres que tem origem de células basais da pele são chamados de carcinoma de células basais (NCI, 2012). Assim, os cânceres são classificados de acordo com os tecidos e os tipos celulares dos quais eles derivam. Os derivados de células epiteliais são denominados de carcinomas (câncer mais comum em humanos). Os sarcomas são os tumores derivados do tecido conectivo ou de células musculares. Os cânceres que não se enquadram em nenhuma dessas duas categorias incluem as várias leucemias e linfomas, assim como os cânceres derivados do sistema nervoso (ALBERTS *et al.*, 2010; NCI, 2012).

Os tumores benignos e malignos recebem nomes apropriados, por exemplo, um tumor benigno de origem epitelial com uma estrutura do tipo glandular é um adenoma, enquanto o tumor maligno é um adenocarcinoma, do mesmo modo um condrioma e um condriossarcoma são tumores benigno e maligno do tecido cartilaginoso (ALBERTS *et al.*, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas com câncer. No Brasil as estimativas para o ano de 2012/2013 apontam à ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, 257.870 para o sexo masculino e 260.640 para o feminino (Fig. 09). O câncer de pele do tipo não melanoma (134 mil) será o mais incidente na população, seguido pelos de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2011).

Homens				Mulheres			
Localização primária	casos novos	percentual		Localização primária	casos novos	percentual	
Próstata	60.180	30,8%		Mama Feminina	52.680	27,9%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%		Colo do Útero	17.540	9,3%	
Cólon e Reto	14.180	7,3%		Cólon e Reto	15.960	8,4%	
Estômago	12.670	6,5%		Glândula Tireoide	10.590	5,6%	
Cavidade Oral	9.990	5,1%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%	
Esôfago	7.770	4,0%		Estômago	7.420	3,9%	
Bexiga	6.210	3,2%		Ovário	6.190	3,3%	
Laringe	6.110	3,1%		Corpo do Útero	4.520	2,4%	
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%		Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%	
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%	

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 09: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma. (Fonte: INCA, 2011).

O câncer do sistema nervoso central (SNC) representa aproximadamente 2% de todas as neoplasias malignas, sendo estimado entorno de 3,7/100.000 pessoas/ano para os homens e 2,6/100.000 pessoas/ano para o sexo feminino, mostrando assim uma incidência mais alta no sexo masculino de 6:4. (MCCARTHY *et al.*, 2009; SCHNEIDER, *et al.*, 2010). No Brasil, estima-se que no ano de 2012 houve 4.820 novos casos em homens e 4.450 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5/100 mil homens e 4/100 mil mulheres (INCA, 2011).

Durante as últimas décadas, a incidência e a mortalidade relacionadas a tumores do SNC aumentaram na maioria dos países desenvolvidos. Parte desse aumento atribui-se à introdução de novas tecnologias diagnósticas, como a tomografia computadorizada, a ressonância magnética, entre outras (MCCARTHY *et al.*, 2009; INCA, 2011). Tais tumores compreendem uma grande família de câncer com mais de 160 tipos (RICH & EYLER, 2008). A maioria se origina no cérebro, nervos cranianos e meninges. A distribuição etária apresenta característica peculiar, possuindo um pico em crianças e outro em adultos acima dos 45 anos. São usualmente confinados dentro do tecido nervoso e somente raramente se espalham para outras partes do corpo. Dependendo do tipo celular predominante na massa tumoral os tumores derivados do neuroepitélio podem ser classificados em diferentes tipos (Tabela 01) (VESCOVI *et al.*, 2006).

Classificação dos Tumores Cerebrais pela OMS	
Tumores Astrocíticos	- Astrocitoma difuso (Grade II) - Astrocitoma anaplásico (Grade III) - Glioblastoma (Grade IV)
Tumores Oligodendrogliais	- Oligodendroglioma
Gliomas Mistos	- Oligoastrocitoma
Tumores Ependimais	- Ependimoma
Tumores Neuronal e Misto	- Gangliocitoma
Tumores Neuronal/Glial	- Tumor neuroepitelial disembrionário - Ganglioglioma
Tumores embrionais	- Neuroblastoma - Meduloepitelioma - Ependimoblastoma
Tumores do Neuroectoderma Primitivo	- Meduloblastoma

Tabela 01. Principais tipos de tumores do Sistema Nervoso. (Fonte: Adaptado de Vescovi *et al.*, 2006).

1.7 GLIOMAS

Os gliomas são os tumores malignos primários mais comuns do SNC, cerca de 30% a 40% de todos os tumores intracraniais (SCHNEIDER, *et al.*, 2010). Eles formam um grupo heterogêneo de tumores que apresentam algumas semelhanças histológicas com a glia, que incluem os astrócitos e oligodendrócitos (LIM *et al.*, 2011; RICH & EYLER, 2008).

Quanto à etiologia, observa-se que somente de 1% a 5% dos gliomas podem ser classificados como hereditários, a grande maioria é esporádica (SCHNEIDER, *et al.*, 2010). A célula que dá origem ao glioma é normalmente desconhecida. Uma teoria maior postula que células-tronco neurais ou progenitores neurais sofram eventos transformantes quando ainda estão em uma fase de amplificação em trânsito durante o desenvolvimento. Outras evidências apontam para a desdiferenciação induzida por mutação de células cerebrais maduras, tais como astrócitos e oligodendrócitos (Fig. 10) (VAN MEIR *et al.*, 2010).

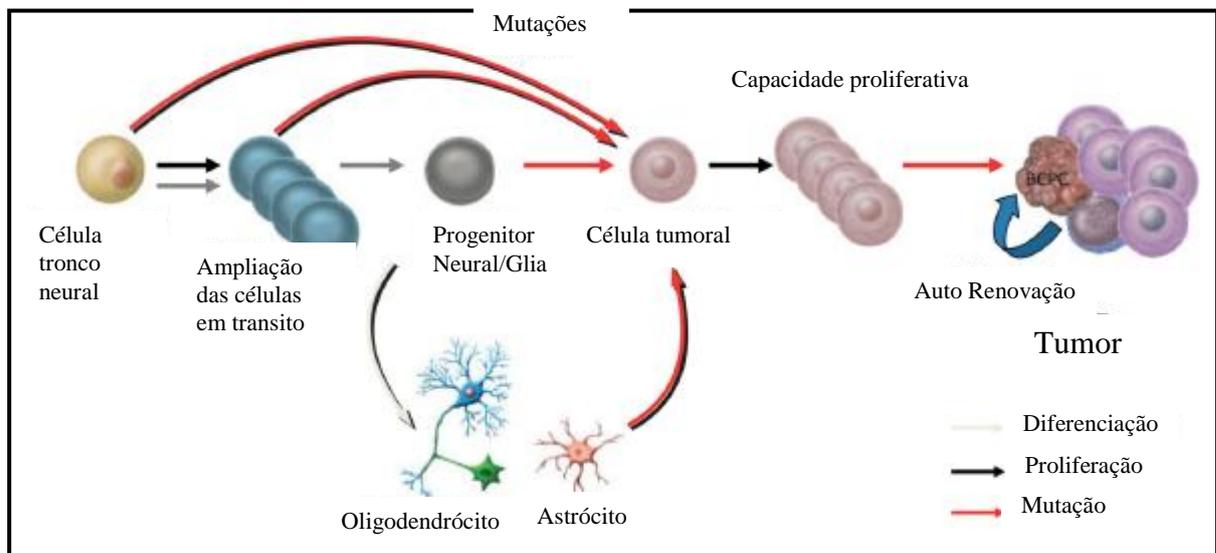


Figura 10: Possível relação para a ontogênese da célula propagadora do câncer cerebral (BCPC) e da formação do glioblastoma multiforme (GBM). (Fonte: Modificado de VAN MEIR *et al.*, 2010).

Os principais tipos de gliomas são os astrocitomas, oligodendrogliomas, gliomas mistos e ependimomas, sendo os astrocitomas a grande maioria (LIM *et al.*, 2011). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os astrocitomas histologicamente em quatro graus de prognóstico: grau I (astrocitoma pilocítico), grau II (astrocitoma difuso), grau III

(astrocitoma anaplásico) e grau IV (glioblastoma mutiforme ou GBM) (Tabela 02) (NIETO-SAMPEDRO *et al.*, 2011; KESARI, 2011).

Classificação dos Tumores do SNC pela OMS		
Grau I	Astrocitoma Pilocítico	É um astrocitoma de crescimento lento que usualmente não se espalha para outras partes do SNC.
Grau II	Astrocitoma de Baixo Grau	É também um astrocitoma de crescimento lento, mas cresce mais rápido que o astrocitoma pilocítico (Grau I). E pode ou não invadir o tecido cerebral normal ao redor e dende a reaparecer após o tratamento.
Grau III	Astrocitoma Anaplásico	Este astrocitoma maligno cresce mais rápido que o astrocitoma de grau II. Invade o tecido do cérebro e reaparece após o tratamento.
Grau IV	Glioblastoma Multiforme (GBM)	É o mais maligno e de crescimento rápido dos astrocitomas. Vários diferentes tipos de células podem ser observadas no tumor sob microscópio, incluindo astrócitos e oligodendrócitos. Áreas de necrose podem ser observadas no centro do tumor. O GBM invade muito rapidamente o tecido cerebral normal.

Tabela 02: Classificação dos tumores do SNC pela OMS. (Fonte: Modificado de NIETO-SAMPEDRO *et al.*, 2011).

A maioria dos tumores malignos no cérebro pertence aos grupos dos astrocitomas anaplásicos (OMS grau III) e dos glioblastomas (OMS grau IV). Os astrocitomas anaplásicos são neoplasmas difusamente infiltrantes, que demonstram anaplasia focal ou dispersa e um alto índice de proliferação comparado com astrocitomas de menor grau (OMS grau I e II). O diagnóstico histológico é principalmente baseado na atipia nuclear e atividade mitótica. Radiologicamente, apresentam-se como massas com contraste parcial aumentado devido à limitada desruptura da barreira hematoencefálica (VAN MEIR *et al.*, 2010).

O GBM é uma das formas mais agressiva e letal de câncer, a sua característica patognomônica quanto ao nível tecidual é a presença de áreas de proliferação vascular e/ou necrose (Fig. 11). Radiologicamente, os GBM apresentam contorno irregular e uma zona periférica com forte contraste realçado ao redor de uma área escura, hipodensa necrosada (VAN MEIR *et al.*, 2010).

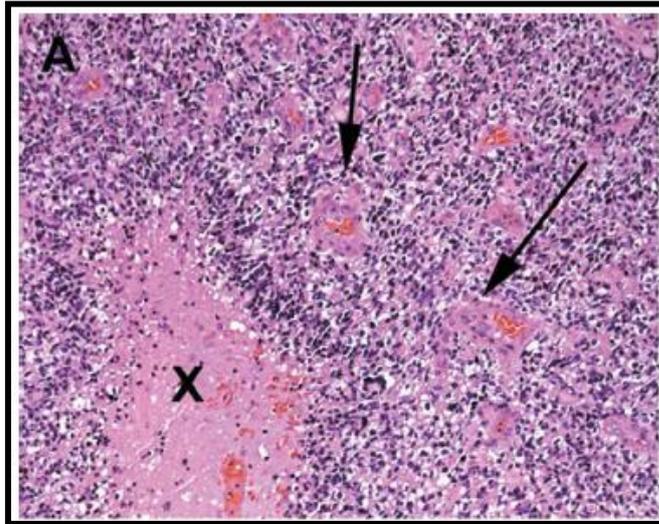


Figura 11: Histopatologia de um caso típico de glioblastoma mostrando tecido tumoral celular glial com necrose central (x), com pseudopalisada nuclear perinecrotica e proliferação microvascular (setas). Coloração com hematoxilina & eosina; magnificação original 100x. (Fonte: PREUSSER *et al.*, 2011).

1.8 GLIOBLASTOMA

Segundo Jacob *et al.* (2009) o GBM é responsável por 12-15% de todos os tumores cerebrais e de 50-60% dos astrocitomas. Sua incidência é menor que 10/100000 habitantes, mas a sobrevida média após o diagnóstico é de pouco mais de um ano. A incidência é razoavelmente constante em todo o mundo, levando à conclusão que fatores ambientais, geográficos e nutricionais provavelmente não desempenham um papel significativo para sua incidência, tendo seu pico entre 45 e 70 anos, com uma crista em torno dos 58 anos. A incidência em crianças é rara, somente 8,8% das crianças com tumor do SNC tem GBM e casos congênitos são extremamente raros. Não há predisposição familiar, porém ele é um pouco mais comum nos homens que nas mulheres (1,5:1) e observa-se que a incidência em negros é menor que de outros grupos étnicos como brancos, latinos e asiáticos.

A maioria dos GBM surge como tumor primário, embora aproximadamente 10% tenha uma história progressiva clínica de um astrocitoma de grau menor, neste caso estes são também denominados glioblastomas secundários e normalmente se desenvolvem em pacientes mais jovens, com média de idade de 45 anos (BRENNAN, 2011; LIM *et al.*, 2011; VAN MEIR *et al.*, 2010).

A maioria dos GBM parecem ter como origem uma ação espontânea, apesar de várias doenças genéticas estarem associadas a uma maior incidência, incluindo esclerose tuberosa, a

neurofibromatose tipo 1 e tipo 2, síndromes de von Hippel Lindau, Turcot e Li-Fraumeni (IACOB *et al.*, 2009; PREUSSER *et al.*, 2011).

Segundo Iacob *et al.* (2009) há uma associação comprovada entre o GBM e exposição à radiação ionizante ou cloreto de polivinila (um polímero utilizado normalmente na construção civil), mas não foram encontradas ligações entre GBM e tabagismo, dieta, uso de telefones celulares ou campos eletromagnéticos, no entanto, uma observação preocupante é o fato de que a incidência do GBM está aumentando em todas as faixas etárias, de forma que não pode ser explicado pelo envelhecimento da população ou melhores técnicas de detecção precoce.

A superexpressão de oncogenes e várias mutações que levam à perda da função de genes supressores tumorais concorrem para a gênese do GBM. A amplificação de oncogenes, tais como o receptor de fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), bem como a perda de supressores tumorais como *PTEN* no cromossoma 10, *p53* no cromossomo 17, ou *p16^{INK4A}* são algumas das alterações genéticas mais comuns em GBM (BRENNAN, 2011; IACOB *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2011).

A disfunção *p53* interrompe a via seguinte da *p14^{ARF}*, o que impede o processo de apoptose e promove mais a instabilidade genômica. Geralmente, as mutações ocorrem com a perda do alelo de tipo selvagem restante, de tal modo que as células tumorais expressam apenas *p53* aberrante (IACOB *et al.*, 2009).

Segundo Iacob *et al.* (2009) nos glioblastomas secundários, os quais constituem <10% de todos os GBM, a mutação *TP53* é frequente e ocorre em cerca de dois terços dos casos. Já em GBM primário apenas 25-30% dos casos têm mutações do gene *p53*, portanto, no total e sem subclassificação, cerca de 2/3 de todos os GBM tem padrão do tipo selvagem de *p53*.

A divisão clínica em GBM primário e secundário também é relevante do ponto de vista de como diferentes eventos genéticos estão incriminados em seu desenvolvimento. Assim para o GBM primário, os principais fatores considerados são: a amplificação do *EGFR*, a perda de *PTEN* e *INK4a*, todas ocorrendo quase simultaneamente ou em um breve período de instabilidade genômica, correlacionando-se com uma história clínica rápida, muitas vezes inferior a 3 meses. Já no GBM secundário, há uma distinta sucessão de eventos genéticos e o curso é mais prolongado: inicialmente, há ativação de vias de transdução de sinalização, normalmente através da superexpressão de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), do receptor do PDGF (PDGFR), do Fator 2 de crescimento de fibroblasto (FGF2) (em vez de *EGFR*); mutação *p53*; amplificação de *CDK4*; perda do *Rb* e perda de *PTEN* liberando a via Akt (AGARWAL *et al.*, 2011; IACOB *et al.*, 2009).

A principal forma de ativação da Ras em GBM é através de EGFR, que pode estar tanto superexpresso, e assim ser estimulado por fatores de crescimento exógenos, ou numa forma constitutivamente ativo, como é o caso de certas variantes mutantes, tal como o EGFRvIII e assim influenciar na proliferação celular (IACOB *et al.*, 2009).

Quanto à terapia do GBM, observa-se que o tratamento padrão consiste de remoção cirúrgica do tumor, seguida por quimioterapia e radioterapia. A temozolomida é o agente quimioterápico mais comumente usado (BRENNAN, 2011; LIM *et al.*, 2011; PREUSSER *et al.*, 2011). É um agente metilante oral, com excelente biodisponibilidade, sendo espontaneamente hidrolisada a seu metabólito ativo no pH fisiológico, o qual rapidamente penetra no SNC e metila ADN na posição O6 e N7 da guanina e na posição N3 da adenina (CAVALIERE *et al.*, 2007). Outra forma de tratamento é através do uso de nitrosureias, agentes alquilantes, que incluem a carmustina e a lomustina, longamente utilizadas como agente padrão no tratamento de gliomas de alto grau. Estes agentes lipofílicos, que rapidamente penetram a barreira hematoencefálica, agem formando adutos com o ADN que são convertidos em ligações cruzadas dentro do ADN (CAVALIERE *et al.*, 2007)

Como as anormalidades nas vias de transdução de sinal são características comuns de muitos tumores cerebrais resultando na proliferação descontrolada de células, sobrevivência e resistência a apoptose, dentre os esforços mais atrativos atuais na terapia do GBM estão o de uso de pequenas moléculas inibidoras de tirosina cinases ou que sejam capazes de inibir os receptores das mesmas e assim impedir sua atividade, tais como as mostradas na figura 12.

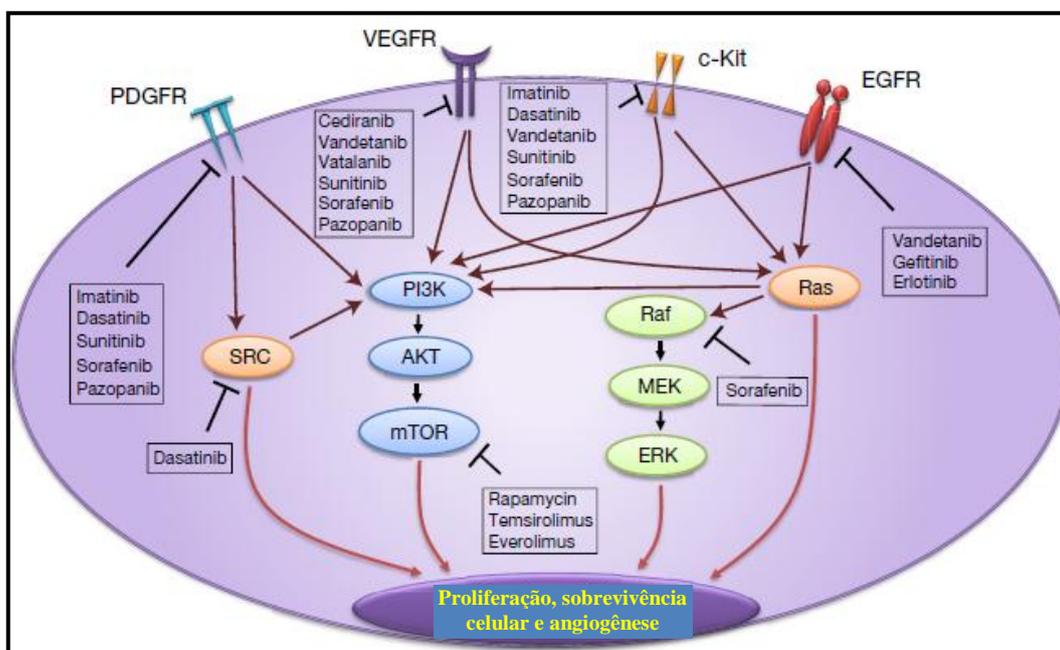


Figura 12: Alvo molecular na terapia de gliomas malignos. (Fonte: Agarwal *et al.*, 2011).

Apesar da intensa investigação ao longo das últimas décadas, o prognóstico do GBM continua sendo desalentador, pois a maioria dos pacientes com GBM morrem dentro de aproximadamente 15 meses a partir do diagnóstico (LIM *et al.*, 2011; RICH & EYLER 2008; VESCOVI *et al.*, 2006), o que justifica o grande interesse na pesquisa de novos agentes auxiliares para esta terapia, dentre os quais pode-se destacar o uso dos flavonoides, visto que muitos compostos desta classe já foram relatados como possuindo atividade contra muitos tipos de câncer (THOMAS *et al.*, 2012).

1.9 GLIOBLASTOMA C6

A linhagem celular do glioma C6 foi desenvolvida no final dos anos de 1960 no “Sweet’s laboratory” por administração repetida de metilnitrosourea em ratos Wistar-Furth adultos (JACOBS *et al.*, 2011).

As células do glioma C6 compartilham vários marcadores tumorais histopatológicos específicos com o GBM humano. O tumor de glioma C6, quando implantado em ratos Wistar, demonstra regiões de invasão focal dentro do tecido nervoso similar ao padrão infiltrado difuso visto em GBM, além de apresentar áreas de necrose, polimorfismo nuclear e elevada razão mitótica. Em termo de marcador histopatológico, as células C6 expressam a proteína S100B, mas não expressam GFAP (proteína acídica fibrilar glial), e variável nível de vimetina (JACOBS *et al.*, 2011).

A genética da linhagem C6 oferece adicional comparação com o GBM. O gene supressor de tumor p16, conhecido por ter uma alta razão de mutação em GBM, com mutações no locus p16/CDKN2/NK4A, também ocorre em células de tumor C6. No entanto o supressor de tumor p53, um dos mais frequentes genes mutados em GBM humano, difere na linhagem C6 por apresentar proteína p53 tipo selvagem com mínima expressão de PTEN (JACOBS *et al.*, 2011).

Por estas características a linhagem celular C6 é utilizada amplamente como ferramenta de pesquisa tanto *in vitro* quanto *in vivo* no estudo sobre o comportamento e o tratamento do GBM (GROBEN *et al.*, 2002; HWANG *et al.*, 2010; TANABE *et al.*, 2011). Assim, neste trabalho nós propomos um estudo da ação dos flavonoides da *B. acutifolium* como agente antineoplásico no modelo de GBM *in vitro* de células C6.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antineoplásico dos flavonoides BAS-1; BAS-4; BAS-6 e BAS-7, isolados da espécie vegetal *Brosimum acutifolium* (Huber) Ducke em modelo *in vitro* de glioblastoma multiforme.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico de flavonoides isolados da espécie *B. acutifolium* em cultura de células de glioblastoma C6 de rato;
- Demonstrar o grau de segurança no tratamento com estas drogas, pela análise da viabilidade de células não neoplásica e do teste de hemólise;
- Avaliar se concentrações dos flavonoides testados que não/pouco alteram a viabilidade celular são capazes de modificar a capacidade migratória das células C6 *in vitro*;
- Avaliar se uma exposição prévia das células C6 aos flavonoides é capaz de modificar a capacidade de formação de colônia destas células;
- Investigar se o tratamento com estes flavonoides altera o padrão de distribuição das células C6 no ciclo celular;
- Investigar se o tratamento com estes flavonoides gera alteração na integridade do potencial de membrana mitocondrial;
- Caracterizar o padrão de morte no tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium*, se apoptótico ou necrótico, por citometria de fluxo pela marcação com Anexina-V e iodeto de propídio;
- Descrever as alterações ultraestruturais decorrentes do tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium* por microscopia eletrônica de transmissão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FLAVONOIDES TESTADOS

Os flavonoides (2S)-4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)-flavana (BAS-1) PM = 308; 7,4'-dihidroxi-8-(3,3-dimetilalil)-flavana (BAS-4) PM = 310; 4,2'-dihidroxi-3',4'-(2'',2''-dimetilpirano)-chalcona (BAS-6) PM = 322; e 4-hidroxiisocordoina ou 4,2',4'-trihidroxi,3'-(3,3-dimetilalil)-chalcona (BAS-7) PM = 324; foram isolados da casca da espécie *B. acutifolium* na Central de Extração da Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Pará.

Uma solução estoque dos flavonoides preparada previamente a 50 mM em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada a -20°C foi utilizada para o preparo das concentrações a serem testadas por diluição em meio de cultivo no momento do tratamento.

3.2 CULTURA CELULAR DE GLIOBLASTOMA C6 DE RATO

As células de glioblastoma C6 de rato foram cultivadas em garrafas de cultivo de 25 cm², com meio nutritivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 10 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de gentamicina, em estufa a 37° C e atmosfera com 5 % de CO₂, efetuando-se a troca do meio a cada dois dias, até atingirem confluência adequada.

Para a realização dos experimentos as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS: NaCl 8 g/L; KCl 0,2013 g/L; Na₂HPO₄·7H₂O 1,1528 g/L e KH₂PO₄ 0,1905 g/L) e dissociadas quimicamente (2 ml de tripsina 0,05 %; EDTA 0,02 % em PBS / 5 min), seguido de inativação da tripsina com 4 ml de meio de cultivo e centrifugação (1500 rpm / 5 min). O precipitado celular foi ressuspensão com 5 ml de meio e a concentração celular determinada por contagem em hemocítômetro de uma alíquota diluída em solução do corante vital azul trypan 0,4% em PBS.

Para os experimentos de viabilidade celular as células foram semeadas na densidade de 1x10⁵ cél./ml em placas de cultivo de 24 poços com 500 µl/poço. Para a microscopia de contraste de fase, ensaio de migração celular e análise da integridade do potencial de membrana mitocondrial, a mesma densidade de célula foi semeada em placas de 12 poços com 1 ml/poço, e para os ensaios de formação de colônia, análise do ciclo celular, e de apoptose/necrose por citometria de fluxo as células foram cultivadas em placas de 6 poços

com 2 ml/poço. Para a realização da microscopia eletrônica de transmissão, em virtude de o processamento necessitar quantidade amostral maior de células, foi semeada 2×10^5 cél./ml em garrafas de cultivo de 75 cm² com 15 ml de meio. As células foram cultivadas em estufa de CO₂ por 24 h e então realizado o tratamento com diferentes concentrações dos flavonoides conforme a necessidade experimental. Para o teste de migração celular o tratamento foi efetuado após 48 h com o intuito de se obter melhor confluência entre as células.

3.3 CULTURA DE CÉLULAS DA GLIA

As células gliais foram utilizadas como parâmetro comparativo de modelo de célula não neoplásica do SNC. Para a obtenção destas células, um rato de dois dias pós-natal, foi rapidamente decapitado, o encéfalo dissecado, pequenos pedaços do córtex cerebral foram removidos e dissociados quimicamente (solução de tripsina / 5 min), seguido de dissociação mecânica e centrifugação (1500 rpm / 5 min). O conteúdo celular foi semeado em garrafa de 75 cm² e cultivado em estufa de CO₂ por duas semanas. Ao atingir confluência as células foram lavadas com PBS, dissociadas quimicamente (solução de tripsina / 5 min), centrifugadas, suspensas em meio e determinada a concentração de células por contagem em hemocítmetro com o uso do corante vital azul trypan. As células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^5 cél./ml com volume de 500 µl/poço e mantidas em estufa de CO₂ por 24 h até a realização do tratamento com os flavonoides testados para o ensaio de viabilidade.

3.4 VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade dos flavonoides da *B. acutifolium* foi avaliada pela análise da viabilidade celular estimada pelo método proposto por Tim Mosmann (1983) com modificações, o qual consiste na conversão do cromógeno solúvel, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), pela ação de desidrogenases presentes em células viáveis, em formazan pouco solúvel, o qual forma precipitado escuro no interior das células, podendo ser solubilizado e lido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm.

Foram realizados ensaios de curva de concentração dos flavonoides para determinar quais concentrações apresentariam melhores respostas citotóxicas no glioblastoma C6;

também foram realizadas curvas temporais de viabilidade para demonstrar se o efeito citotóxico promovido pelo flavonoide na célula C6 poderia ser imediato ou tardio; e ensaio de viabilidade em cultura de glia para determinar o grau de segurança do tratamento em um modelo de célula não neoplásica.

Para o ensaio da curva de concentração, 24 h após o semeio na placa de teste, as células foram incubadas nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μM dos flavonoides BAS-1; BAS-4; BAS-6 e BAS-7. O grupo Controle foi incubado apenas com meio de cultivo e o grupo Veículo com meio de cultivo contendo 0,3 % de DMSO, concentração igual a apresentada na maior concentração de droga testada. Para todos os tratamentos foram utilizados $n = 4$. Ao completar 24 h, o meio foi removido e as células incubadas por 2 h em estufa de CO_2 com solução de 0,5 mg/ml de MTT em meio de cultivo. Ao término deste período, o sobrenadante foi removido e o formazan incorporado às células solubilizado com 300 μl de DMSO. Para a leitura em espectrofotômetro o volume foi completado com 1 ml de água destilada e imediatamente a absorvância foi determinada em comprimento de onda de 570 nm, contra um branco (300 μl de DMSO mais 1 ml de água destilada). Os resultados foram expressos como percentagem do grupo Controle.

Para o ensaio da curva de tempo, após 24 h do semeio na placa de teste, as células foram tratadas nas concentrações de 75 μM para a BAS-1 e 100 μM para a BAS-4 e BAS-7, concentrações determinadas pela boa atividade demonstrada na curva de concentração. No grupo controle foi adicionado apenas o meio de cultivo, sendo efetuada a incubação com MTT nos tempos de 0 h; 3 h; 12 h; 24 h e 48 h de tratamento e o resultado expresso como percentagem do tempo de zero hora. Para este ensaio foram usados $n = 3$.

Para o ensaio de viabilidade em cultura de glia, após 24 h do semeio destas células em placa de cultivo, foi realizado o tratamento nas concentrações de 100 e 150 μM dos flavonoides BAS-1, BAS-4, BAS-6 e BAS-7, além do grupo controle (somente com meio de cultivo), por um período de 24 h, seguido da realização do MTT como anteriormente descrito. Neste ensaio foram usados $n = 3$.

3.5 ENSAIO DE HEMÓLISE

Para investigar se a morte provocada pelos flavonoides testados poderia ser em decorrência de uma desestruturação na integridade de membrana plasmática foi realizado o ensaio de hemólise.

O sangue de um rato foi coletado com heparina, centrifugado (3000 rpm / 5min), os eritrócitos lavados com solução salina (NaCl 0,85%; CaCl₂ 10mM), novamente centrifugados e suspensos a 2 % em solução salina (solução de eritrócito).

A incubação do ensaio foi realizada em placa de 96 poços, nele 100 µl dos flavonoides BAS-1, BAS-4 e BAS-7 nas concentrações de 200 µM e 300 µM (diluídos em salina) foram adicionados na presença de 100 µl da solução de eritrócito, de modo que a concentração de incubação dos flavonoides foi de 100 µM e 150 µM. Como branco de cada amostra 100 µl do respectivo flavonoide foi adicionado a 100 µl de salina. Como controle positivo de hemólise foram incubados 80 µl de salina, mais 20 µl de Triton X-100 a 1% e 100 µl da solução de eritrócitos. Como controle negativo 100 µl de salina contendo 0,6 % de DMSO, quantidade igual a da maior concentração do flavonoide testado, foi adicionado a 100 µl da solução de eritrócito. Após 1 h de incubação a placa foi centrifugada e 100 µl do sobrenadante transferido para outra placa de 96 poços, a qual foi lida em leitora de microplaca com filtro para 450 nm. Os resultados foram expressos como percentagem em relação ao controle positivo.

3.6 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

Para demonstrar o padrão morfológico das células C6 após o tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium* foi realizada a captura de imagem com câmera digital acoplada a microscópio invertido com uso de objetiva de 40X. As células foram semeadas em placa de 12 poços e após 24 h, realizada a incubação com os flavonoides BAS-1, BAS-4, BAS-6 e BAS-7 em diferentes concentrações por 24 h, efetuando-se a captura de imagem ao fim deste período.

3.7 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar a influência dos flavonoides da *B. acutifolium* na capacidade de migração das células C6, foi realizado o ensaio de migração celular em placa de 12 poços. Após 48 h do semeio nas placas de cultivo, foi realizado com a ponta de uma ponteira de 100 µl uma lesão transversal na área central da superfície de cultivo de cada poço. As células foram lavadas com PBS e efetuado o tratamento com as drogas BSA-1; BAS-4; e BAS-7 nas concentrações

de 25 e 50 μM , além do Controle e do Veículo. A migração celular para a área lesionada foi acompanhada por captura de imagem usando câmera digital acoplada a microscópio invertido com contraste de fase, com uso de objetiva de 4x, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h de tratamento.

3.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Para avaliar se a exposição previa aos flavonoides poderia comprometer a capacidade proliferativa das células C6 posteriormente a esta exposição, foi realizado o ensaio de formação de colônias. Para a realização deste ensaio as células C6 foram primeiramente semeadas em placa de 6 poços, ao completar 24 h de cultivo foi realizado o tratamento nas concentrações eleitas de 50; 75; 100 μM dos flavonoides BAS-1 e BAS-4, e 50, 100 e 150 μM da BAS-7, além do Controle (meio de cultivo) e do Veículo (0,3 % de DMSO).

Após 24 h de incubação as culturas foram lavadas 2x com PBS, dissociadas quimicamente com solução de tripsina (700 μl / 5 min), seguida de inativação (1,5 ml de meio de cultivo) e centrifugação (1500 rpm / 5min). O conteúdo celular foi ressuspenso em 1 ml de meio e efetuada a quantificação em hemocitômetro de uma alíquota diluída 1:1 em solução de azul trypan 0,4 %.

Uma alíquota de 1000 células viáveis de cada tratamento foi semeada em placa de 6 cm de diâmetro e cultivadas por 14 dias, efetuando-se a troca de meio a cada 3 dias. Ao fim deste período a cultura foi lavada com PBS e corada com cristal violeta 0,25 % / etanol 50 % por 30 min, seguida de 2 lavagens com PBS e realização da captura digital de imagem.

3.9 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar a influência dos flavonoides testados sobre o ciclo celular das células C6, foi realizada a análise do ciclo celular por citometria de fluxo com uso do marcador fluorescente de ácidos nucleicos iodeto de propídio (PI). Para esta análise, após 24 h do semeio em placa de 12 poços as células foram tratadas com os flavonoides nas concentrações de 25; 50; 75 e 100 μM para a BAS-1 e 25; 50; 75; 100 e 150 μM para a BAS-4 e BAS-7, por 24 h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, com recuperação das células soltas e dissociadas com solução de tripsina, seguido de inativação da tripsina, centrifugação, lavagem do precipitado com PBS, nova centrifugação e fixação em álcool 70 % a 4 °C por no

máximo 1 semana. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes por ressuspensão em PBS seguido de centrifugação. O precipitado celular foi então tratado com 50 µl de RNase (100 µg/ml) a 37 °C por 15 min, seguido da adição de 200 µl de PI (50 µg/ml) e incubação no escuro por 10 minutos, efetuando-se a análise em citômetro de fluxo (*BD FACSCanto II*), com o registro de 10000 eventos por amostra.

3.10 INTEGRIDADE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$)

Como a perda da integridade do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), devido a formação de poros na membrana permitindo a liberação de citocromo c para o citosol, está intimamente relacionada ao desencadeamento de processo apoptótico, foi realizada a análise da integridade do $\Delta\Psi_m$ por citometria de fluxo usando o marcador JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), o qual forma agregado no interior de mitocôndrias intactas gerando fluorescência vermelha, em mitocôndrias onde o $\Delta\Psi_m$ entrou em colapso, o marcador não se acumula dentro das mesmas, permanecendo no citosol na forma monomérica o qual gera fluorescência verde.

Após 24 h do semeio das células C6 em placas de 12 poços, foi realizada a incubação por 24 h nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µM da BAS-1 e nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 µM para BAS-4 e BAS-7, para o controle foi utilizado apenas meio de cultivo e no veículo 0,3 % de DMSO. Após este período as células foram lavadas com PBS, com recuperação das células soltas, dissociadas quimicamente com solução de tripsina, centrifugadas e suspensas com 250 µl de uma solução de JC-1 a 20 µM em PBS e incubada por 15 minutos no escuro até a realização da leitura em citômetro de fluxo (*BD FACSCanto II*) com captura de emissão em 590 nm (vermelho) e 530 nm (verde). Como branco para calibração efetuou-se apenas a leitura de uma amostra de células normais na ausência de JC-1. Também foi realizado um controle positivo com células fixadas por 30 min em álcool 70%, lavadas com PBS e processadas com JC-1.

3.11 ANÁLISE DE APOPTOSE/NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para caracterizar de forma específica o padrão de morte celular envolvido no tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium*, foi realizada a análise de apoptose/necrose com o “*kit Annexin V-FITC*” (assay designs), o qual se baseia na capacidade da Anexina V-FITC se ligar a fosfatidilserina exposta na face extracelular da membrana de células em processo de apoptose e a incapacidade do iodeto de propídio (PI) de penetrar em células com a membrana plasmática íntegra, podendo marcar apenas aquelas em necrose ou apoptose tardia.

Neste experimento, após 24 h do semeio das células C6 em placa de 6 poços, foi realizado a incubação por 24 h com os flavonoides nas concentrações de 25; 50; 75 e 100 μM para a BAS-1 e 25; 50; 75; 100 e 150 μM para a BAS-4 e BAS-7, após a incubação as células foram lavadas com PBS, com recuperação das células soltas, dissociadas quimicamente com solução de tripsina, centrifugadas, lavadas com PBS gelado, novamente centrifugadas e suspensas com tampão de ligação gelado (*protocolo do fabricante*).

Numa alíquota de 96 μl do sobrenadante celular foi adicionado 1 μl da Anexina V-FITC e 2,5 μl de PI (250 $\mu\text{g/ml}$), com incubação por 10 min em banho de gelo protegido da luz. Após este período o volume foi completado para 250 μl com tampão de ligação e realizada a leitura em citômetro de fluxo (*BD FACSCanto II*). Um branco contendo apenas células normais sem marcação foi efetuado para determinação dos quadrantes representativos de células viáveis, apoptose recente, apoptose tardia e necrose.

3.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para demonstrar as alterações ultraestruturais decorrente do tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium*, foi realizada a análise por microscopia eletrônica de transmissão. Para isto as células C6 foram incubadas por 24 h com diferentes concentrações dos flavonoides: 75 μM BAS-1; 75 μM e 100 μM BAS-4 e 150 μM BAS-7, também foi realizado um controle (meio de cultivo) e um veículo (0,3 % de DMSO).

Após o tratamento as células foram fixadas primeiramente com a solução A (1% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 2,5% de sacarose em tampão phem 0,1 M, pH 7,2); e depois com a solução B (2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 0,9 mL de cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2).

Após a fixação as células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e incubadas em solução contendo 1% tetróxido de ósmio e 1% de ferrocianeto de potássio por 1 hora a 8°C. Em seguida foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e água destilada, respectivamente, concluindo esse processo de contrastação com a incubação das amostras em solução de acetato de uranila (1%) e acetona (2,5%) por 1 hora a 8°C.

As amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (10 min à temperatura ambiente), depois lentamente impregnadas em resina Epon (2:1; 1:1 e 1:2 acetona/Epon - 12 horas cada etapa). A seguir colocadas em Epon puro por 6 horas e depois em suporte para polimerização a 60° C por 72 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrótomo (Leica EM UC6) e os cortes obtidos contrastados durante 20 min com acetato de uranila 5%, 5 min com citrato de chumbo e então observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906 E.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimento que necessitaram análise estatísticas, foi realizada a análise de variância um critério (*ANOVA*) seguiu pelo teste de Tukey, com o uso do programa estatístico *BioEstat* versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular das células C6 observada na curva de concentração da droga BAS-1 incubada por 24 h (Fig. 13), mostra que para as concentrações de 25 μM ($101 \pm 3 \%$) e 50 μM ($96 \pm 7 \%$) não houve diferença significativa em comparação ao controle ($100 \pm 5 \%$), no entanto para a concentração de 75 μM ($51 \pm 2 \%$) houve um comprometimento de 49 % na viabilidade celular, mostrando assim ser esta concentração aproximadamente igual a IC_{50} neste sistema, já com 100 μM ($22 \pm 2 \%$) este comprometimento foi de 78 % e para 150 μM ($7 \pm 2 \%$) uma diferença de 93 % comparado ao controle. Também podemos constatar que o tratamento com veículo contendo 0,3 % de DMSO, não alterou a viabilidade ($101 \pm 7 \%$) quando comparado ao controle ($100 \pm 5 \%$).

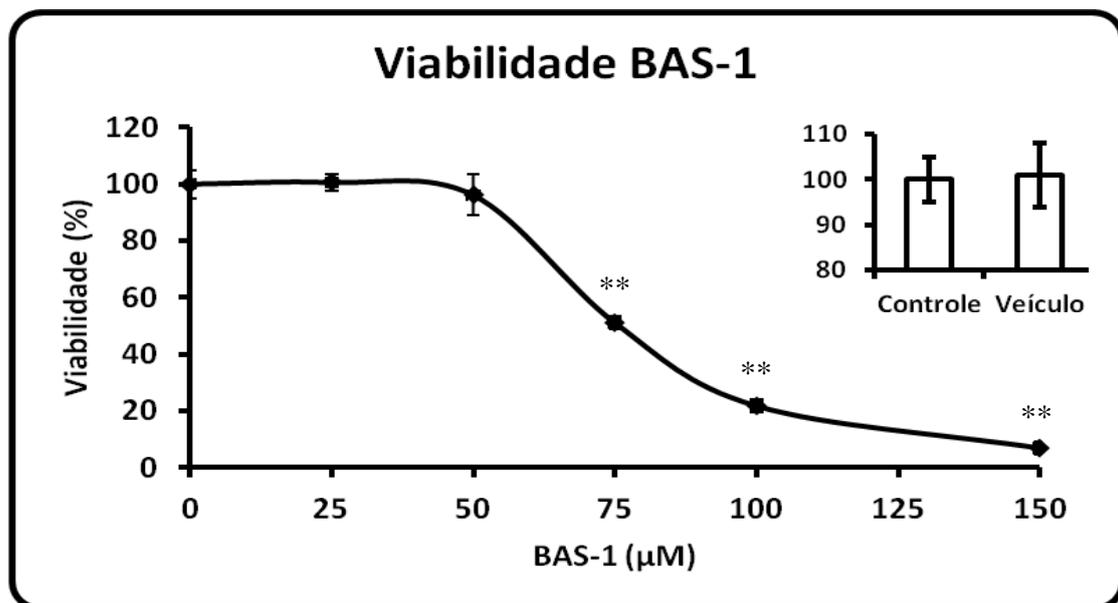


Figura 13: Viabilidade celular de glioblastoma C6 tratado por 24 h com a droga BAS-1 nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μM . O gráfico menor mostra a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) em relação ao grupo Controle (meio de cultivo). $n = 3-4$ e $**p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

A figura 14 mostra a curva temporal de viabilidade após o tratamento com 75 μM da droga BAS-1, onde podemos observar a inclinação ascendente na viabilidade do grupo controle, com um aumento de 17 % em 3 h (117 ± 2 %); de 48 % em 12 h (148 ± 1 %); 76 % em 24 h (176 ± 2 %) e 162 % em 48 h (262 ± 7 %). No tratamento com BAS-1 observamos um decréscimo na viabilidade com diferença significativa em comparação ao tempo 0 h (100 ± 7 %) a partir de 3 h (64 ± 5 %) mostrando uma redução equivalente a 36 %; em 12 h (31 ± 1 %) a redução foi de 69 % e em 24 h (27 ± 1 %) e 48 h (12 ± 0 %) uma redução de 73 % e 88 % respectivamente. A análise intergrupo para cada hora em estudo mostrou diferença significativa já a partir de 3 h de incubação.

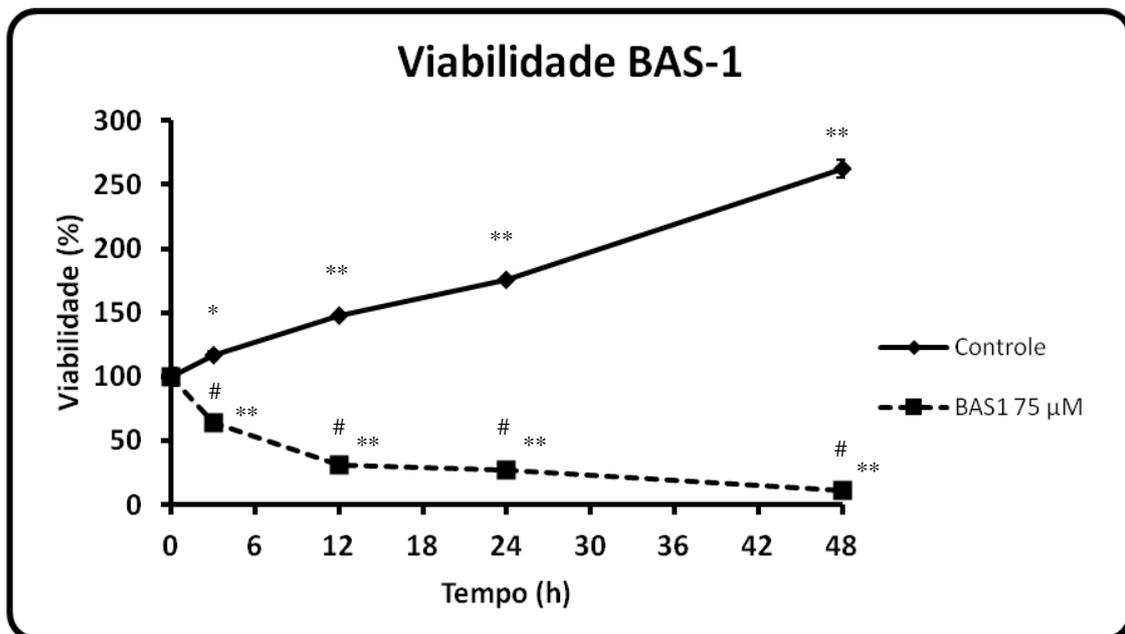


Figura 14: Curva temporal de viabilidade do glioblastoma C6. A linha cheia representa o grupo Controle e a linha tracejada o grupo tratado com 75 μM de BAS-1. A análise foi efetuada nos tempos 0; 3; 12; 24 e 48 h após o tratamento. $n = 3-4$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao tempo zero e # $p < 0,01$ em comparação ao mesmo tempo no grupo controle (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

A figura 15 mostra a curva de concentração para a viabilidade das células C6 tratadas com a droga BAS-4 por 24 h, nela podemos observar que o tratamento com 25 μM , com uma viabilidade de $93 \pm 2 \%$, demonstrou uma diminuição significativa de 7 % na viabilidade em relação ao controle; com 50 μM a viabilidade foi de $72 \pm 3 \%$, perfazendo uma redução de 28 %; com 75 μM a viabilidade foi de $47 \pm 2 \%$, uma redução de 53%, mostrando ser esta concentração próxima a IC_{50} . Para as concentrações de 100 μM e 150 μM a viabilidade se mostrou bastante reduzida com valores de $33 \pm 1 \%$ e $7 \pm 2 \%$, perfazendo assim uma diminuição de 87 % e 93 % respectivamente. Neste experimento a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) foi de $99 \pm 3 \%$ e do grupo Controle $100 \pm 3 \%$.

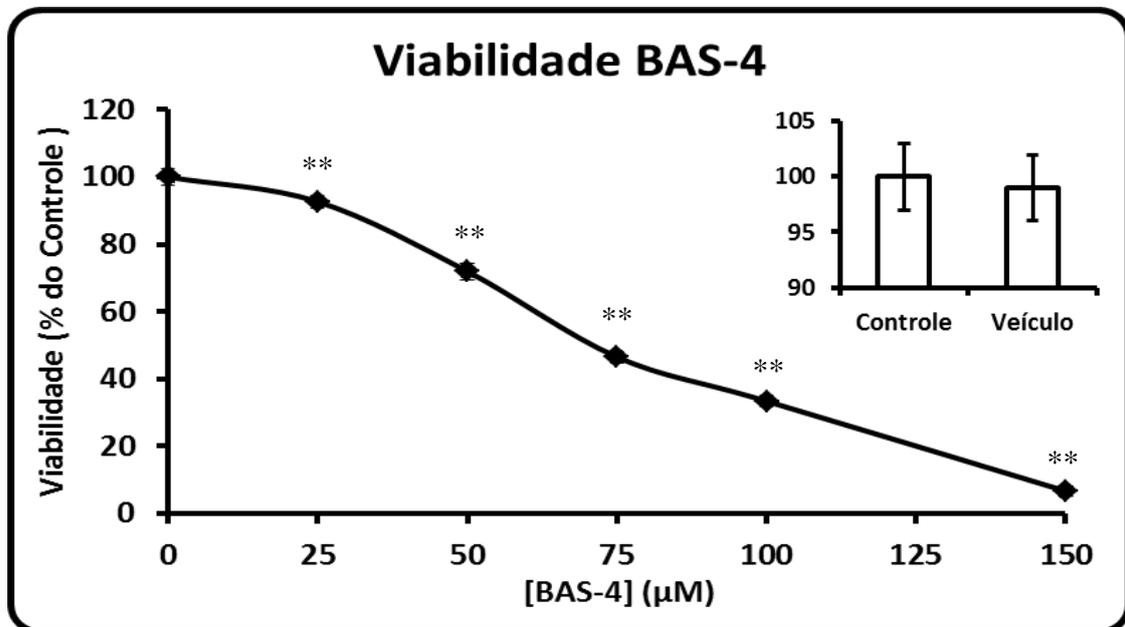


Figura 15: Viabilidade celular de glioblastoma C6 tratado por 24 h com a droga BAS-4 nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μM . O gráfico menor representa a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) em relação ao grupo Controle (meio de cultivo). $n = 3-4$ e $**p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

A figura 16 representa a curva temporal de viabilidade das células C6 após o tratamento com 100 μM da droga BAS-4. O comportamento da curva de viabilidade para o grupo controle é igual ao descrito anteriormente para a figura 14. Podemos observar na figura 16 que o tratamento com 100 μM de BAS-4, no tempo de 3 h de incubação não demonstrou diferença significativa em relação ao tempo zero, com valores de viabilidade de $98 \pm 1\%$ e $100 \pm 7\%$ respectivamente. No entanto com 12 h de incubação a viabilidade foi de $84 \pm 2\%$, apresentando diferença significativa com redução de 16% em relação ao tempo zero. Para os tempos maiores de 24 h e 48 h de incubação a viabilidade foi de $72 \pm 2\%$ e $51 \pm 0\%$ respectivamente, o que perfaz uma diminuição de 28% e 49% comparados ao tempo inicial. A análise intergrupo, para uma mesma hora de incubação, mostrou diferença significativa para todos os intervalos de tempo em estudo.

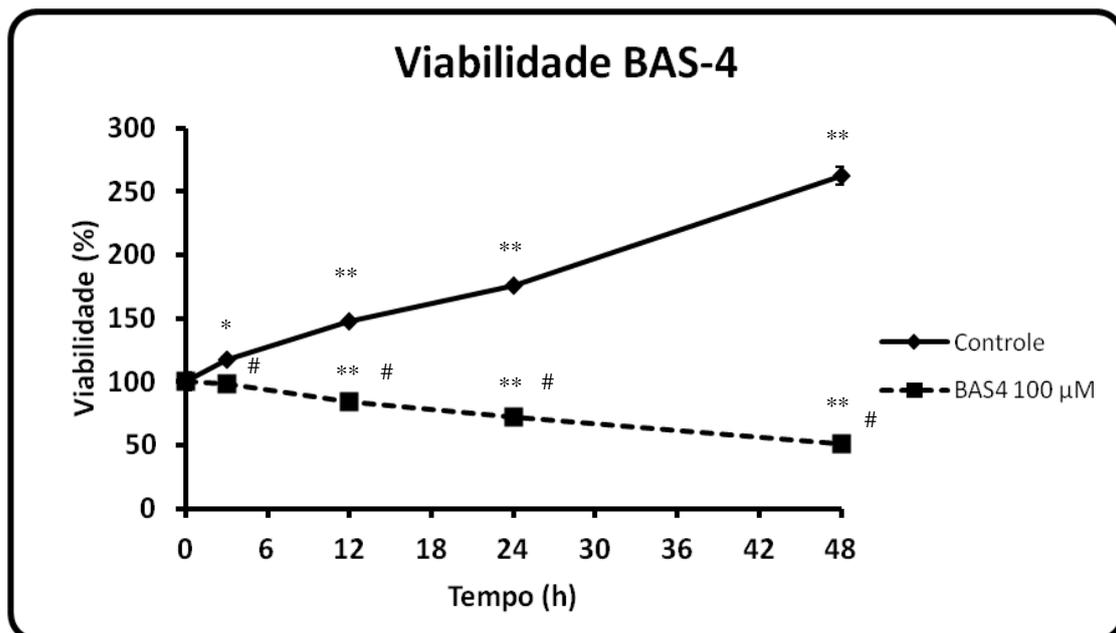


Figura 16: Curva temporal de viabilidade do glioblastoma C6. A linha cheia representa o grupo Controle e a linha tracejada o grupo tratado com 100 μM de BAS-4. A análise foi efetuada nos tempos 0; 3; 12; 24 e 48 h após o tratamento. $n = 3-4$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao tempo zero e # $p < 0,01$ em comparação ao mesmo tempo no grupo controle (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

A análise da viabilidade celular na curva de concentração da droga BAS-6, incubada por 24 h (Fig. 17), mostra que para todas as concentrações em teste não houve alteração significativa em relação ao grupo controle, com valores de 105 ± 4 % (25 μM); 108 ± 4 % (50 μM); 111 ± 3 % (100 μM) e 107 ± 2 % (150 μM). Com valores de viabilidade para o Controle e o Veículo de 100 ± 5 % e 105 ± 7 % respectivamente.

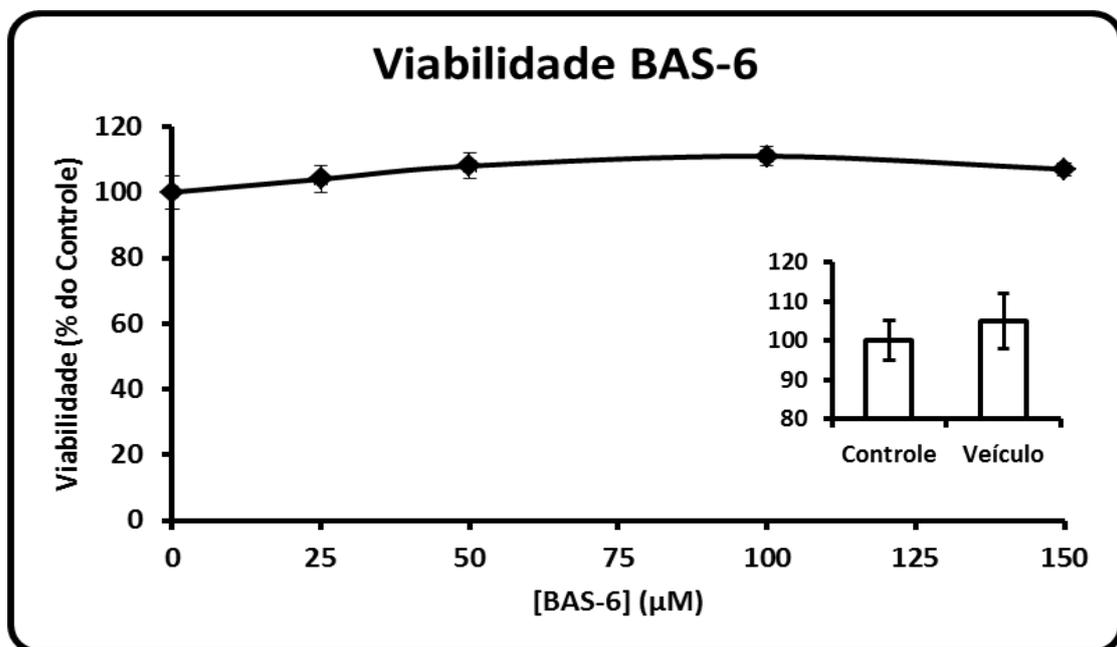


Figura 17: Viabilidade celular de glioblastoma C6 tratado por 24 h com a droga BAS-6 nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μM . O gráfico menor representa a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) em relação ao grupo Controle (meio de cultivo). $n = 3-4$ e $*p < 0,05$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

A figura 18 representa a viabilidade para a curva de concentração da droga BAS-7 após 24 h de incubação, nela podemos observar que não houve diferença significativa para as concentrações de 25 μM ($100 \pm 3 \%$) e 50 μM ($97 \pm 2 \%$), no entanto para a concentração de 75 μM ($66 \pm 2 \%$) houve uma redução de 44 % e com 100 μM ($46 \pm 1 \%$) uma redução de 54 %, mostrando assim ser a IC_{50} entre as concentrações de 75 μM e 100 μM . Para a concentração de 150 μM a viabilidade foi de $12 \pm 2 \%$, demonstrando uma diferença 88 % quando comparado ao Controle ($100 \pm 3 \%$). Neste experimento o grupo Veículo ($101 \pm 3 \%$) também não apresentou diferença em relação ao Controle.

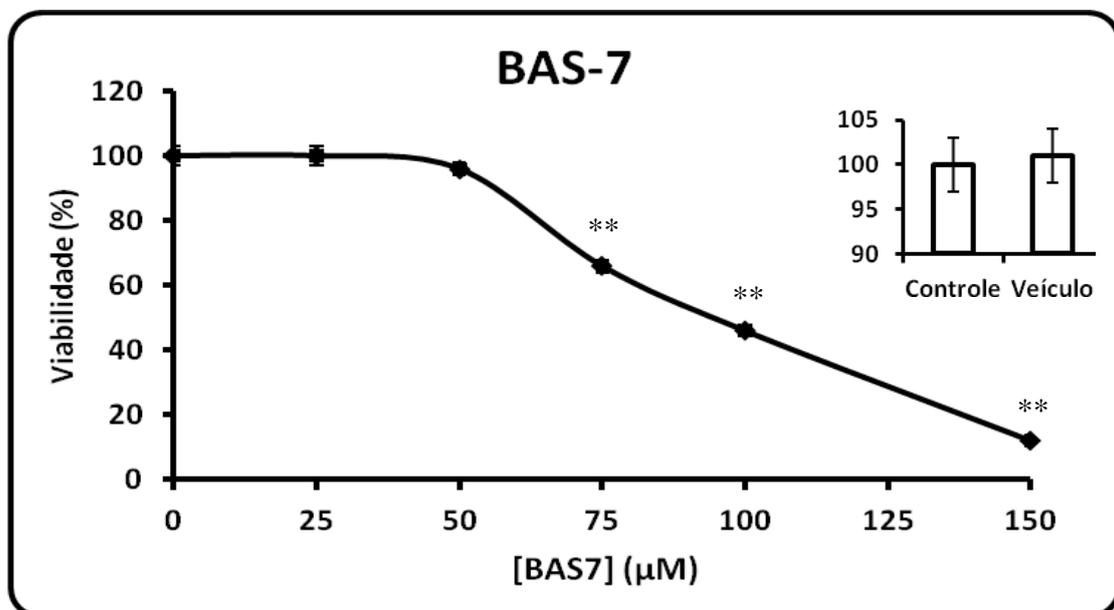


Figura 18: Viabilidade celular de glioblastoma C6 tratado por 24 h com a droga BAS-7 nas concentrações de 25; 50; 75; 100 e 150 μM . O gráfico menor representa a viabilidade do grupo Veículo (0,3 % de DMSO) em relação ao grupo Controle (meio de cultivo). $n = 3-4$ e $**p < 0,05$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

A figura 19 representa a curva temporal de viabilidade das células C6 após o tratamento com 100 μM da droga BAS-7. Nela podemos observar que após 3 h de incubação a viabilidade foi de $109 \pm 2 \%$, não apresentando diferença significativa em comparação ao tempo zero de incubação ($100 \pm 7 \%$), no entanto nos tempos de 12 h, 24 h e 48 h, já se observa um aumento significativo na viabilidade, com valores de $122 \pm 2 \%$, $134 \pm 3 \%$ e $150 \pm 3 \%$ respectivamente, porém com uma taxa de crescimento menor que a observada para o grupo controle, o qual apresentou valores de $117 \pm 2 \%$; $148 \pm 1 \%$; $176 \pm 2 \%$ e $262 \pm 7 \%$ para os tempos de 3 h; 12 h; 24 h e 48 h, respectivamente.

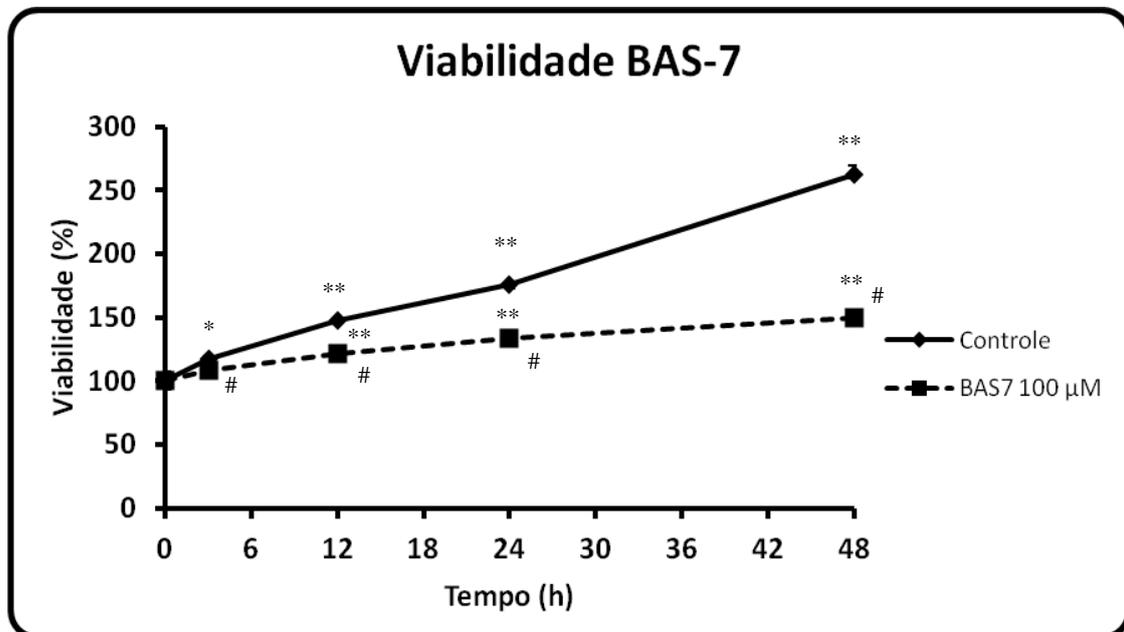


Figura 19: Curva temporal de viabilidade do glioblastoma C6. A linha cheia representa o grupo Controle e a linha tracejada o grupo tratado com 100 μM de BAS-7. A análise foi efetuada nos tempos 0; 3; 12; 24 e 48 h após o tratamento. $n = 3-4$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao tempo zero e # $p < 0,01$ em comparação ao mesmo tempo no grupo controle (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

4.2 VIABILIDADE DE CÉLULAS NÃO NEOPLÁSICA (GLIA)

O tratamento com os flavonoides da *Brosimum acutifolium* em cultura de glia (Fig. 20), mostrou que a droga BAS-1 na concentração de 100 μM não foi citotóxica ($108 \pm 5 \%$), porém muito citotóxica na concentração de 150 μM , com a viabilidade igual a zero. A droga BAS-4 não mostrou alteração significativa na concentração de 100 μM ($103 \pm 2 \%$), com apenas uma pequena redução de 24 % no tratamento com 150 μM ($76 \pm 4 \%$). O tratamento com a droga BAS-6 não mostrou efeito citotóxico com as duas concentrações testadas, com $98 \pm 2 \%$ com 100 μM e $98 \pm 4 \%$ com 150 μM . O tratamento com a droga BAS-7 mostrou diferença significativa em relação ao controle, porém tal diferença ocorreu por aumento na viabilidade e não por redução, apresentando um percentual de $120 \pm 2 \%$ para 100 μM e 118 ± 2 para 150 μM .

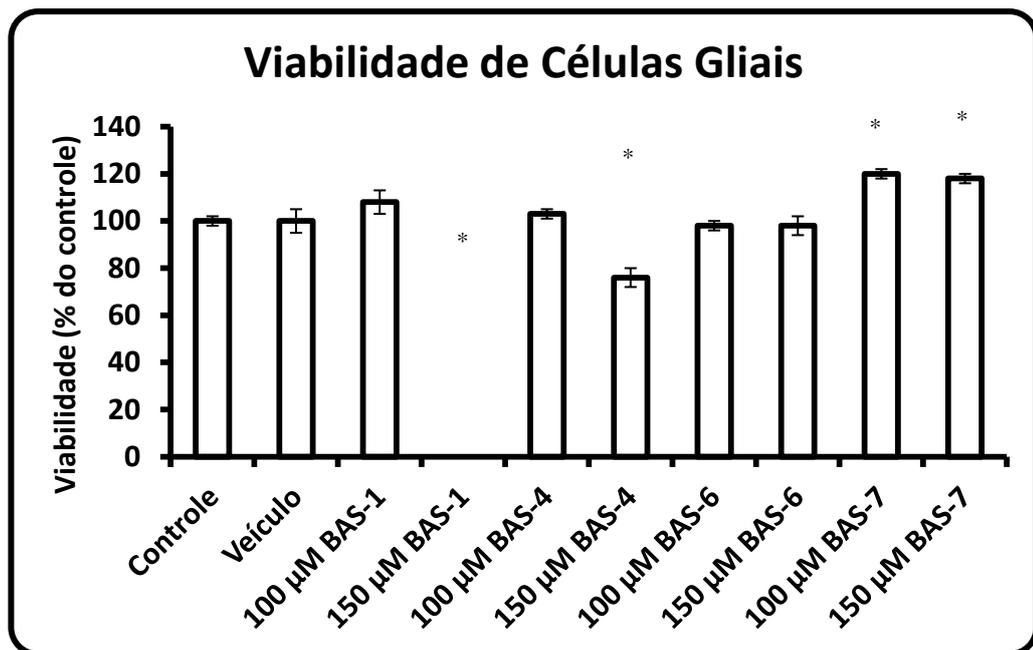


Figura 20: Viabilidade celular de cultura de glia tratada por 24 h com as drogas BAS (-1; -4; -6 e -7) nas concentrações 100 e 150 μM , mais o grupo controle e Veículo (DMSO 0,3 %). $n = 3-4$ e $*p < 0,05$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

4.3 ENSAIO DE HEMÓLISE

Para investigar se o tratamento com os flavonoides que demonstraram atividade citotóxica para as células C6 poderiam estar causando a morte por colapso da membrana plasmática, foi realizado o teste de hemólise (Fig. 21). Nele podemos constatar que 150 μM da droga BAS-1 gerou 41 ± 3 % de hemólise, enquanto a incubação com 100 μM causou 20 ± 2 %.

Para a BAS-4 os índices foram bem baixos com apenas 7 ± 1 % para 150 μM e 2 ± 0 % para 100 μM . O mesmo ocorrendo para a BAS-7, onde tanto para a concentração de 150 μM quanto de 100 μM , obteve-se 2 ± 0 %.

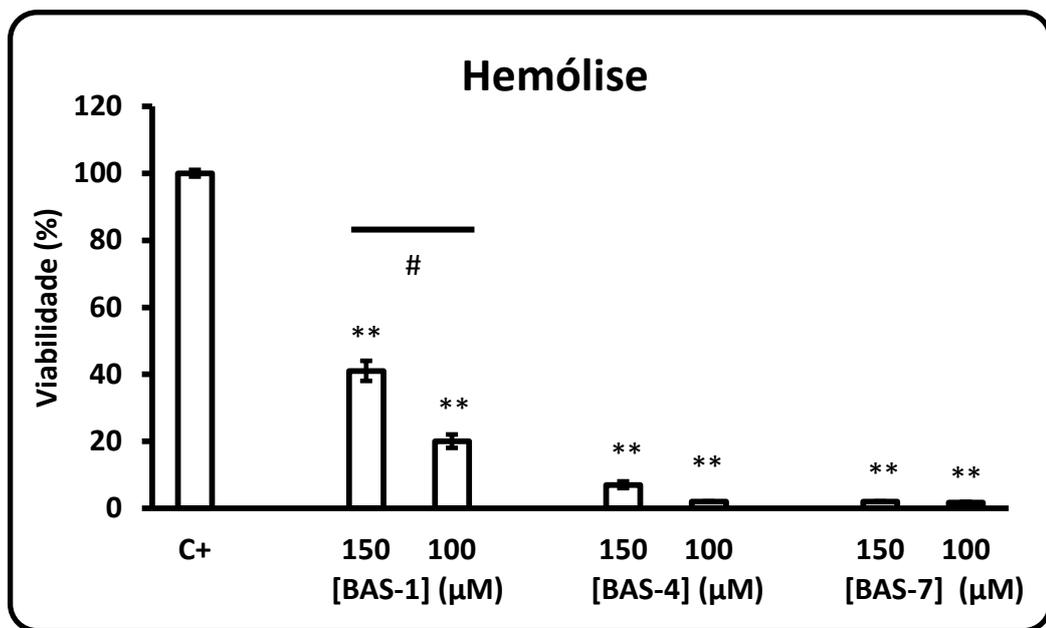


Figura 21: Ensaio de hemólise para a incubação com os flavonoides BAS-1, BAS-4 e BAS-7 nas concentrações de 150 e 100 μM . C+ Controle positivo. ** $p < 0,01$ em relação ao controle positivo e # $p < 0,01$ em relação intragrupo a concentração ao lado (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

4.4 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

As Figuras 22A e 22B mostram as alterações morfológicas por microscopia de contraste de fase do glioblastoma C6 tratado por 24 h com diferentes concentrações dos flavonoides da *B. acutifolium*. Nela podemos observar a morfologia normal do controle, com células tipicamente fusiformes e algumas poucas globosas (em divisão celular) (Fig. 22A). O mesmo aspecto foi observado no tratamento com o veículo contendo 0,3 % de DMSO (imagem não mostrada).

O tratamento com a droga BAS-1 na concentração de 25 μM não mostrou diferença estrutural em relação ao controle, porém na concentração de 25 μM já é possível observar vacuolizações no interior das células (seta verde), enquanto que na concentração de 75 μM as células perderam por completo sua morfologia fusiforme, apresentando-se picnóticas (seta branca).

Na figura 22B podemos observar que o tratamento com a droga BAS-4 não mostrou diferença em relação ao controle para a concentração de 25 μM , porém na concentração de 50 μM já é possível observar uma diminuição na densidade de células, com retração citoplasmática e algumas células picnóticas (seta branca). Com 75 μM o número de células em retração e picnóticas (seta branca) torna-se maior e com 100 μM todas as células já se apresentam picnóticas. Podemos observar que o tratamento com a droga BAS-6 a 150 μM não mostrou alterações estruturais quando comparada ao controle. O tratamento com a droga BAS-7, não mostrou alteração morfológica nas concentrações de 25 μM e 50 μM , porém em 75 μM o número de células tornou-se menor, além de apresentar vacuolizações (seta verde), com 100 μM o número de células vacuolizadas tornou-se maior (seta verde), além de aparecerem células picnóticas (seta branca). Com 150 μM todas as células apresentam-se picnóticas (seta branca).

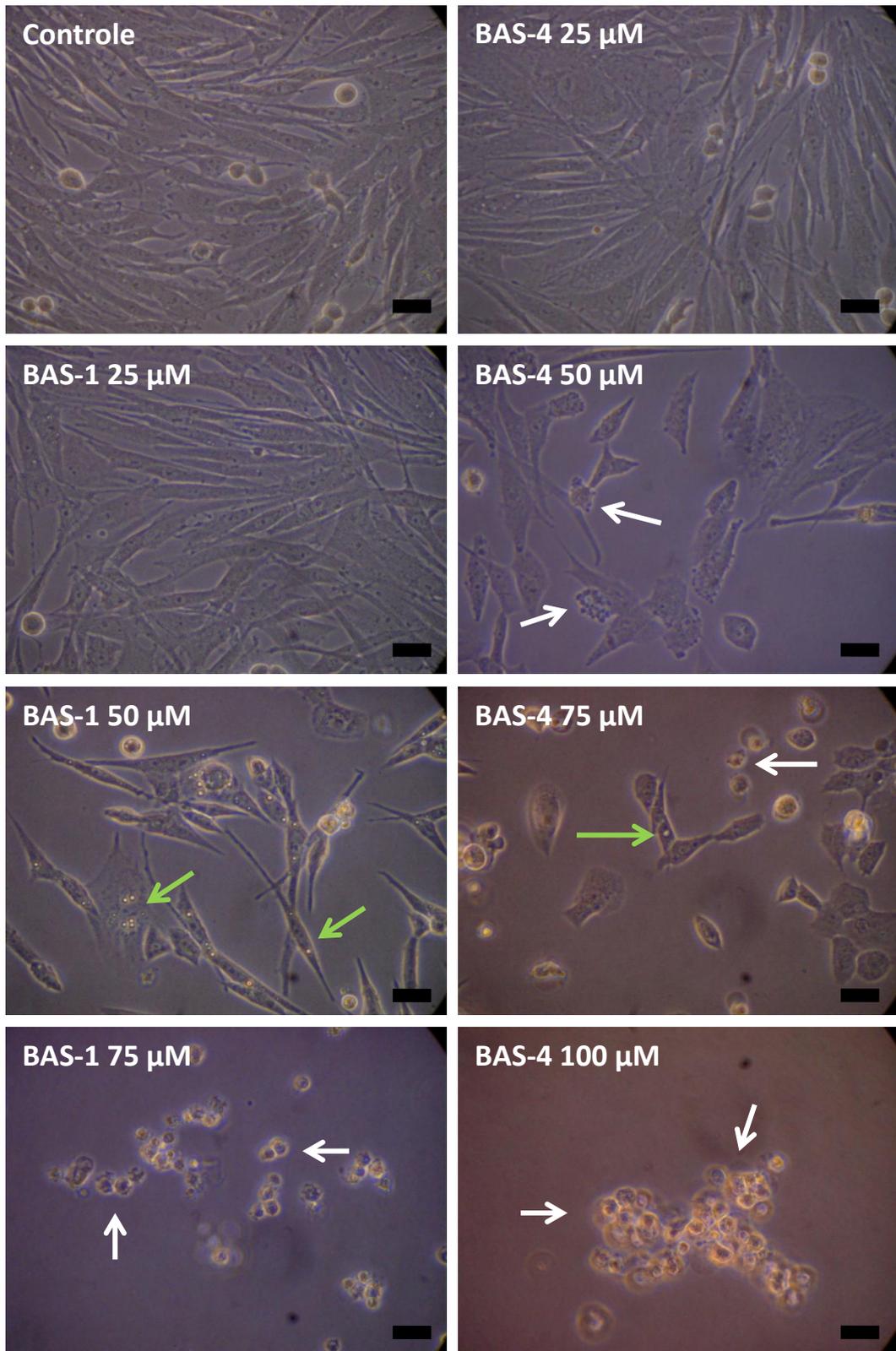


Figura 22A: Microscopia de contraste de fase após tratamento por 24 h com as drogas BAS-1 e BAS-4 em diferentes concentrações, mais o controle. As setas brancas indicam células picnóticas, as setas verdes células com vacuolização. Objetiva de 40x. Escala 10 μm.

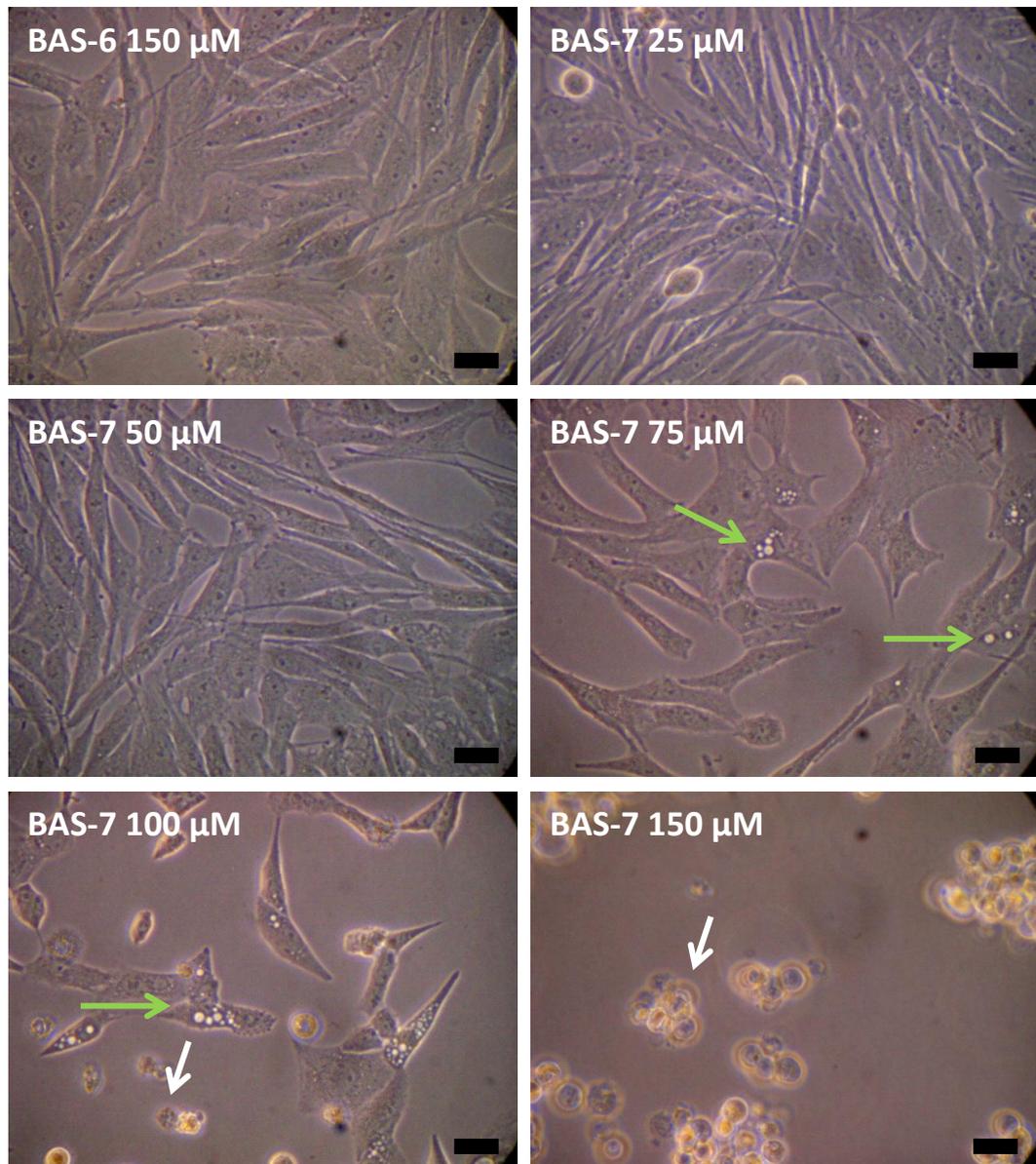


Figura 22B: Microscopia de contraste de fase após tratamento por 24 h com as drogas BAS-6 (150 μM) e BAS-7 em diferentes concentrações. As setas brancas indicam células picnóticas, as setas verdes células com vacuolização. Objetiva de 40x. Escala 10 μm .

4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

A capacidade migratória das células C6 perante o tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium* foi avaliada pelo ensaio de migração celular (Fig. 23), nele podemos constatar que o tratamento com o veículo (DMSO 0,3 %), demonstrou capacidade migratória similar ao controle, com pronunciada mobilização de células para a zona de lesão no intervalo de tempo de 24 h, permitindo o completo fechamento desta no intervalo de 48 h.

O tratamento com a droga BAS-1 na concentração de 25 μM mostra diminuição na taxa migratória celular, caracterizada por uma maior abertura da zona de lesão em comparação ao controle observado no intervalo de 24 h e a presença ainda de uma zona de lesão aberta após 48 h de incubação, o mesmo efeito foi observado para a concentração de 50 μM , com uma abertura da lesão em 48 h ainda mais evidente. Um padrão semelhante pode ser observado para o tratamento com as drogas BAS-4 e -7 nas concentrações de 25 e 50 μM .

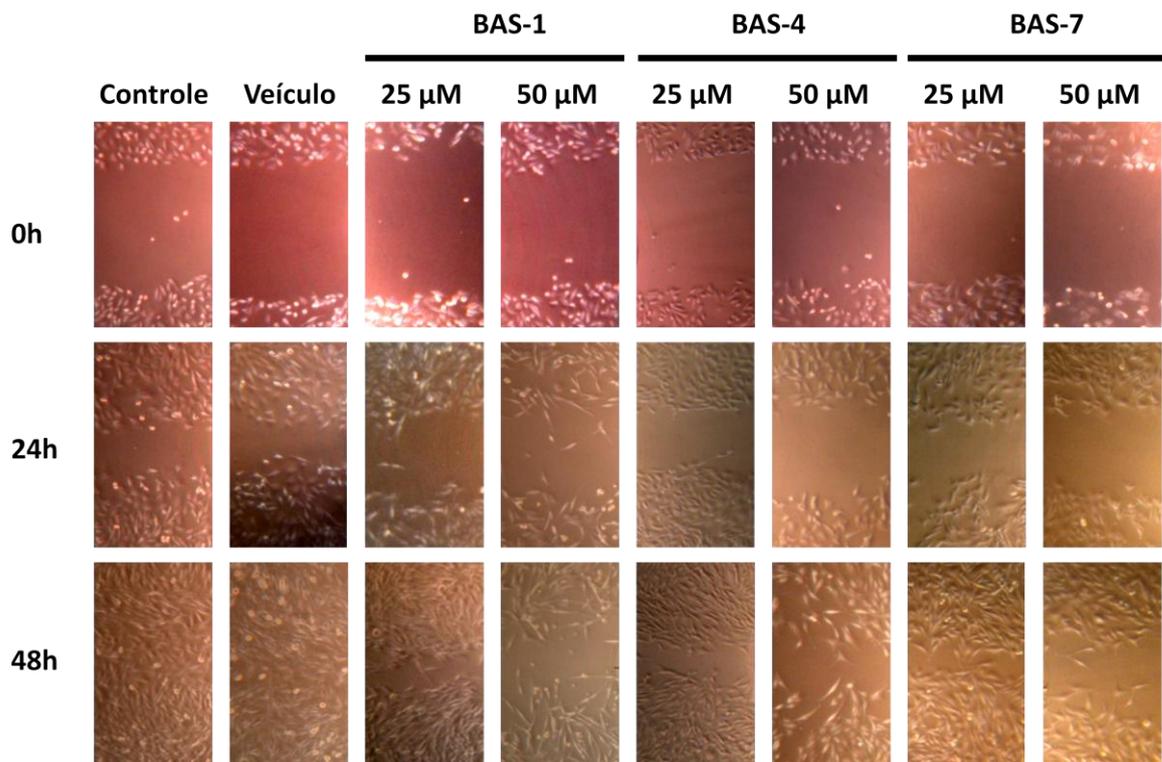


Figura 23: Ensaio de migração celular das células C6 tratadas com BAS-1; BAS-4 e BAS-7 nas concentrações de 25 μM e 50 μM . Também é mostrado o padrão de migração do controle e do tratamento com veículo (DMSO 0,3 %), nos tempos 0, 24 e 48 horas de incubação. Microscopia de contraste de fase. Aumento de 50x.

4.6 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

Para avaliar se uma exposição prévia aos flavonoides da *B. acutifolium* poderiam limitar a capacidade proliferativa das células C6, foi realizado o ensaio de formação de colônias (Fig. 24), nele podemos observar que a exposição prévia por 24 h com o veículo (DMSO 0,3 %) não modificou a capacidade proliferativa das células C6, apresentando densidade de colônias e tamanho similar ao do controle. No tratamento prévio com a droga BAS-1 por 24 h, podemos constatar a diminuição na capacidade de formação de colônias com o aumento da concentração da droga, com 50 μM já foi possível observar uma redução no número de colônias quando comparado ao controle, tornando-se mais evidente esta redução para a concentração de 75 μM , chegando a uma inibição quase completa com a concentração de 100 μM , apresentando apenas poucas colônias e de tamanho rudimentar.

Um padrão similar ao descrito anteriormente foi observado no tratamento prévio com a droga BAS-4, com 50 μM já houve uma redução no número de colônias, tornando-se bem mais evidente com a concentração de 75 μM , mostrando uma redução acentuada com colônias de pequena dimensão com a concentração de 100 μM .

No tratamento prévio com a droga BAS-7 também foi possível observar uma diminuição na capacidade de formação de colônia com o aumento da concentração da droga (50; 100 e 150 μM), o qual se mostrou bem evidente para as concentrações de 100 μM e 150 μM , porém contendo ainda algumas colônias com tamanho bem desenvolvido.

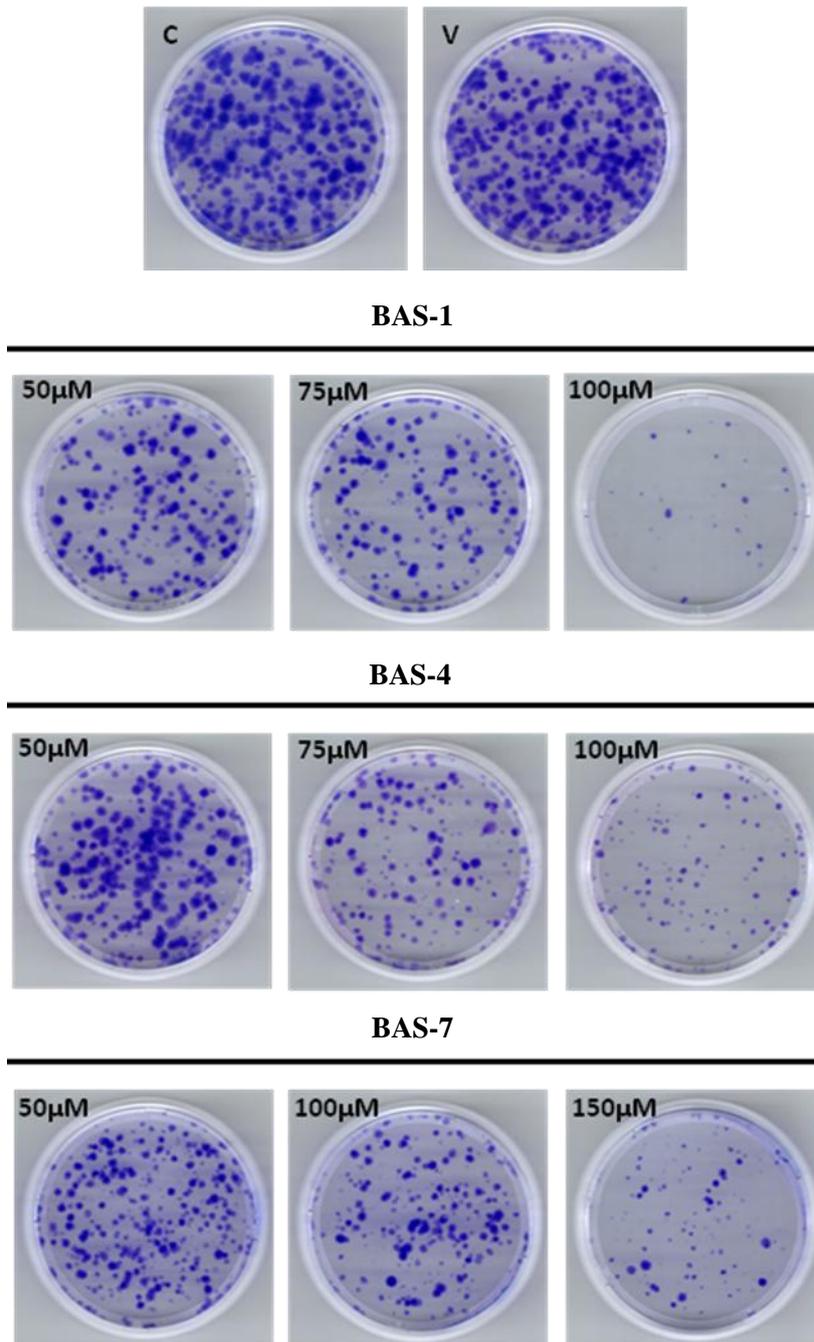


Figura 24: Capacidade de formação de colônias de células C6 após o tratamento prévio por 24h com as drogas BAS-1 (50; 75 e 100 μM); BAS-4 (50; 75 e 100 μM) e BAS-7 (50; 100 e 150 μM). C – controle e V – veículo (0,3 % DMSO). Foram semeadas 1000 células viáveis por placa e no 14º dia de cultivo as colônias foram coradas com cristal violeta.

4.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Com o intuito de avaliar a influência dos flavonoides da *B. acutifolium* sobre o ciclo celular das células C6, foi realizada a análise por citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídio. A figura 25 demonstra o padrão de ciclo celular após 24 h de exposição a diferentes concentrações da droga BAS-1, neste ensaio o controle apresentou valores de 65,8 % em G1/G0, 8,0 % em S, 25,5 % em G2/M e 0,4 % em SubG0.

O tratamento com veículo (DMSO 0,3 %) não apresentou grande mudança em relação ao controle, uma pequena diminuição em G1/G0 com valor de 62,8%, e em S com valor de 7,5 %, um pequeno aumento em G2/M mostrou um valor de 28,8 % e o SubG0 com 0,3 %.

O tratamento com 25 μM e 50 μM também não apresentaram grande diferença em comparação ao controle, com valores de 63,9 % e 63,3 % em G1/G0, 8,9 % e 8,1 % em S, 26,8 % e 28,2 % em G2/M e 0,2 % e 0,2 % em SubG0 respectivamente.

Para a concentração de 75 μM observamos 69 % em G1/G0, uma redução em S com 5,5 %, 24,4 % em G2/M e 1,1 % em Sub/G0. No tratamento com 100 μM observamos uma diminuição na percentagem de células no ciclo com 51,7 % em G1/G0, 6,4 % em S e 18,7 % em G2/M, com um aumento pronunciado na população SubG0 23,2 %.

A figura 26 apresenta a análise de citometria de fluxo para o ciclo celular no tratamento com a droga BAS-4, nela podemos constatar que o controle apresentou valores similar ao descrito anteriormente (G1/G0 62,3 %, S 8,1 %, G2/M 28,7 % e SubG0 0,5 %), no tratamento com 25 μM não houve grande mudança (G1/G0 63,1 %, uma pequena queda em S 5,5 %, G2/M 30,5 % e SubG0 0,5 %). Com 50 μM as alterações tornam-se mais pronunciadas (aumento em G1/G0 69,6 %, queda em S 4,1 %, G2/M 25,3 % e SubG0 0,7 %). De forma diferente na concentração de 75 μM observa-se diminuição em G1/G0 (58,7 %), queda mais acentuada em S (3,2 %), aumento em G2/M (35,1 %) e em SubG0 (2,7 %). O tratamento com 100 μM e 150 μM mostram um aumento no número de células fora do ciclo celular (SubG0) indicativo de morte por apoptose (11 % e 21,4 % respectivamente), com diminuição da população G1/G0 (56% e 42,1 %) e S (5,7 % e 5,1 %), com G2/M com pouca alteração em relação ao controle com uma pequena queda para 100 μM (26,6%) e um pequeno aumento para 150 μM (30,2%).

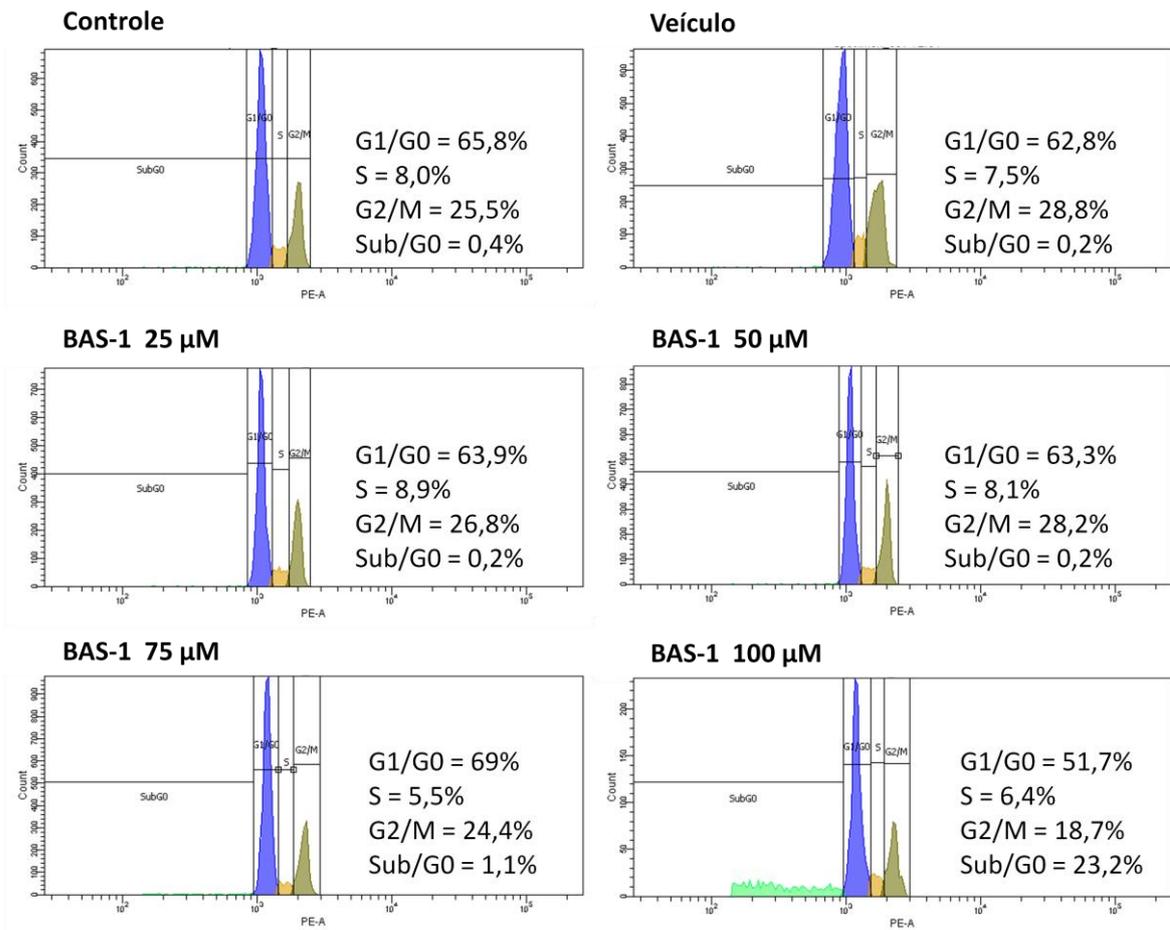


Figura 25: Análise do ciclo celular por citometria de fluxo com uso de iodeto de propídio, em células C6 após 24 h de tratamento com a droga BAS-1 nas concentrações de 25 µM, 50 µM, 75 µM e 100 µM, mostrando os parâmetros SubG0, G1/G0, S e G2/M. Também é mostrado o padrão de ciclo celular dos grupos controle e veículo (DMSO 0,3 %).

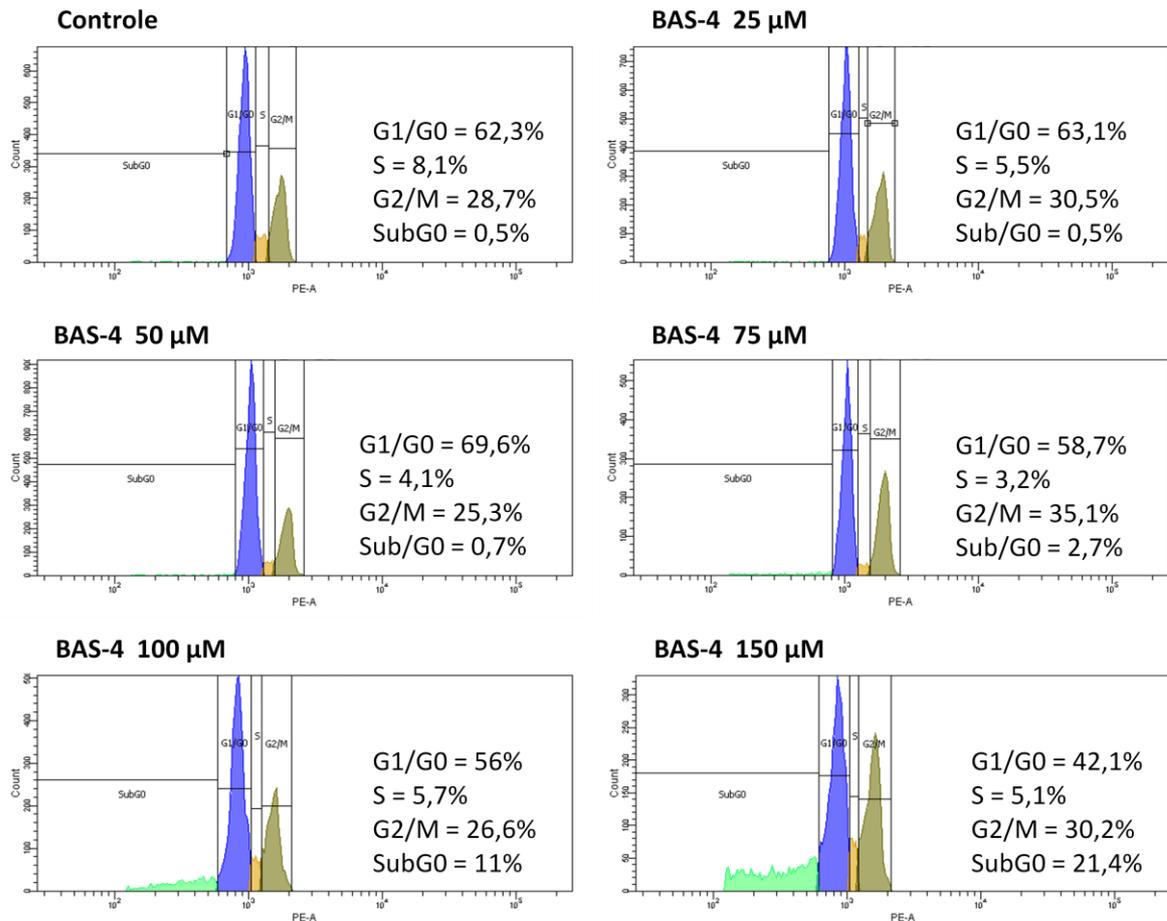


Figura 26: Análise do ciclo celular por citometria de fluxo com uso de iodeto de propídio, em células C6 após 24 h de tratamento com a droga BAS-4 nas concentrações de 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM e 150 µM e controle, mostrando os parâmetros SubG0, G1/G0, S e G2/M.

A figura 27 mostra a análise do ciclo celular no tratamento com a droga BAS-7, nela podemos constatar que em comparação ao controle (G1/G0 58,6 %, S 8,3 %, G2/M 31,8 % e SubG0 0,7 %), o tratamento com 25 µM não causou grandes modificações (G1/G0 61,3 %, S 7,1 %, G2/M 30,8 % e SubG0 0,2 %), já com 50 µM houve alteração (pequeno aumento em G1/G0 63,5 %, S 7,6 %, pequena redução em G2/M 28,4 % e SubG0 0,1 %), com 75 µM as alterações foram ainda mais evidentes, aumento em G1/G0 (68,5 %), diminuição em S (5,1 %), redução em G2/M (25,9 %) e SubG0 de 0,3 %. Com 100 µM foi possível observar aumento em G1/G0 (64,6 %) e redução bem pronunciada em S (3,7 %), porém G2/M e SubG0 mostraram valores praticamente sem alteração (31,1 % e 0,5 % respectivamente). Já com 150 µM, observou-se diminuição em G1/G0 e S (54,9 % e 2,5 % respectivamente), aumento em G2/M (42,2 %) caracterizando uma maior retenção das células nessa fase do ciclo e baixo valor de SubG0 (0,3 %).

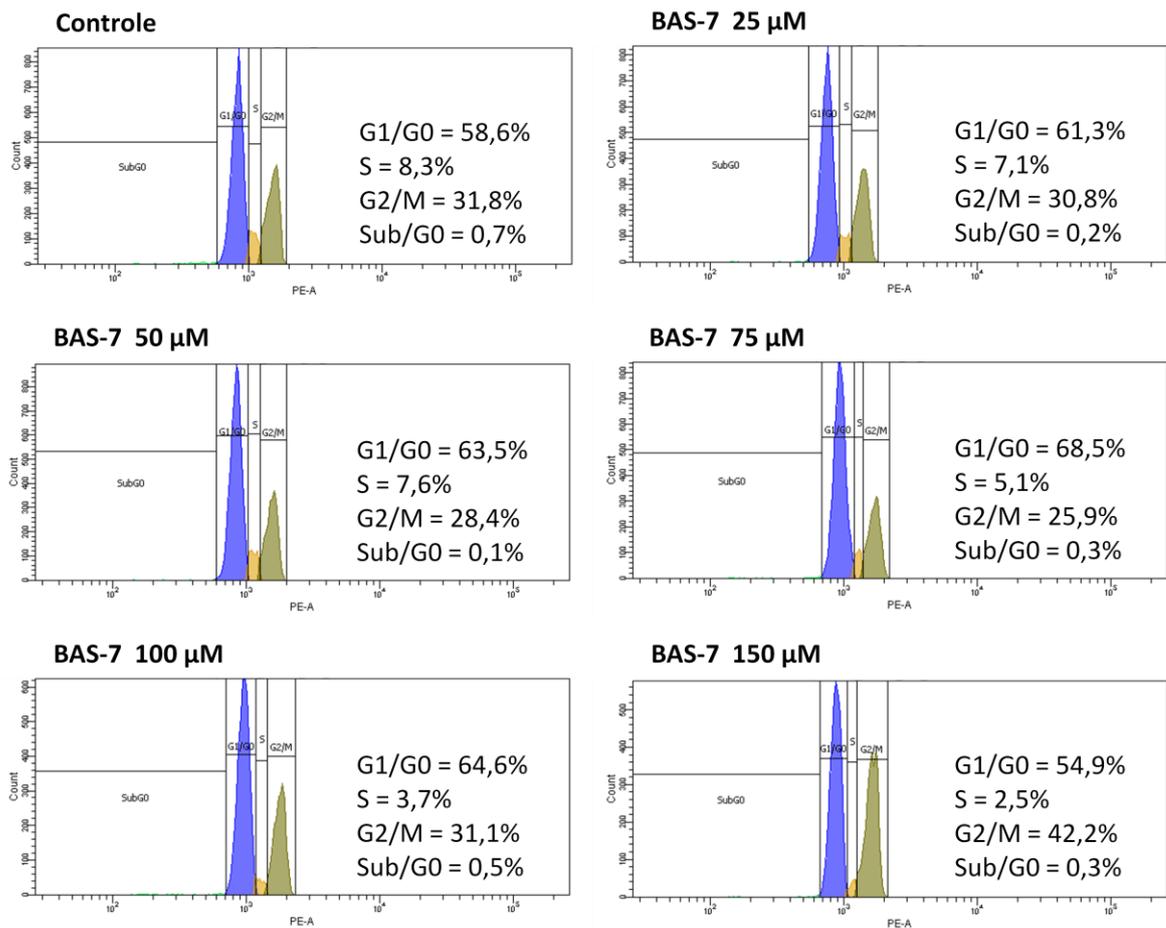


Figura 27: Análise do ciclo celular por citometria de fluxo com uso de iodeto de propídio, em células C6 após 24 h de tratamento com a droga BAS-7 nas concentrações de 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM e 150 µM e controle, mostrando os parâmetros SubG0, G1/G0, S e G2/M.

4.8 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$)

A figura 28 apresenta a análise da integridade do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), nela é mostrada a distribuição das células nos quadrantes conforme a intensidade de fluorescência vermelha e verde. Para o branco onde não foi utilizado JC-1 99,8 % das células mostram-se em Q3 e apenas 0,2 % em Q4. O controle positivo (células fixadas) foi realizado como parâmetro da funcionalidade do método, nele podemos observar que 96,1 % (Q2) das células apresentam perda da integridade mitocondrial e apenas 2,6 % apresentam ainda mitocôndrias com potencial de membrana íntegro (Q4). A análise para o controle mostrou 98,3 % das células com alta fluorescência para o vermelho indicando a viabilidade

mitocondrial das mesmas (98,3 % em Q4 sobre o eixo) e apenas 1 % das células (Q2) com alta fluorescência verde indicativo de perda do $\Delta\Psi_m$. O tratamento com veículo também apresentou a maioria das células com $\Delta\Psi_m$ íntegro (86,5 % em Q4) e apenas 2,8 % em Q2, no entanto 10,5 % das células (Q3) apresentaram baixa marcação (semelhante ao branco).

O tratamento com o flavonoide BAS-1 mostrou diminuição no número de células com $\Delta\Psi_m$ íntegro com o aumento da concentração de tratamento, com 25 μM a perda da integridade do $\Delta\Psi_m$ ocorre em 5 % das células (Q2), com 50 μM esse valor é de 7,4 % (Q2), com 75 μM sobe para 28,7 % (Q2) e com 100 μM 29,4 % (Q2).

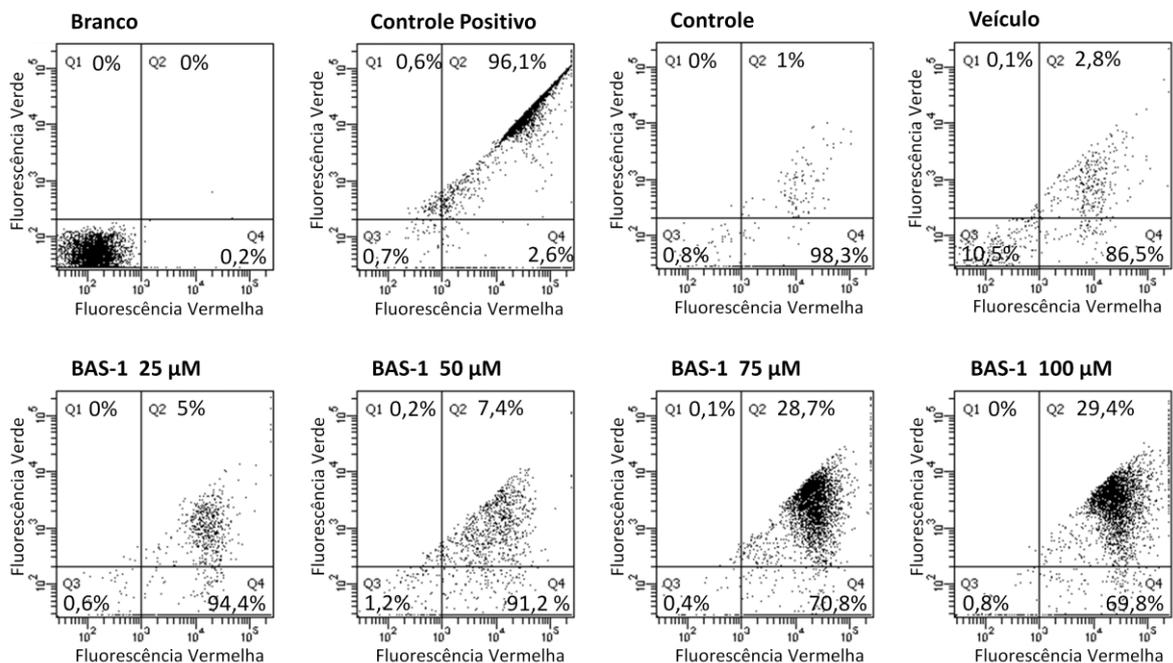


Figura 28: Análise da integridade do potencial mitocondrial por citometria de fluxo com JC-1. A fluorescência verde elevada representa células com perda do potencial mitocondrial, a fluorescência vermelha elevada com baixa fluorescência verde indica as células viáveis. É mostrado o padrão do branco (ausência de JC-1), controle positivo (células fixadas), controle e tratamento com BAS-1 nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM .

A figura 29 apresenta a análise da integridade do $\Delta\Psi_m$ com o tratamento com a droga BAS-4, nela podemos constatar que o tratamento com 25 μM , 50 μM e 75 μM , foram capazes de aumentar o percentual de células com perda do $\Delta\Psi_m$ de 1 % (controle) para 10,7 %, 9,2 % e 10 % (Q2), mostrando ainda 87,4 %, 89,2 % e 88,8 % das células viáveis respectivamente, mostrando não haver diferença muito grande na resposta de uma

concentração em relação à outra. No entanto com 100 μM a perda do $\Delta\Psi_m$ foi de 26 % (Q2) com 73,7 % (Q4) ainda mostrando integridade mitocondrial. Com 150 μM a perda da integridade do $\Delta\Psi_m$ foi ainda maior (78,2 % em Q2) e somente 21 % (Q4) com $\Delta\Psi_m$ integro.

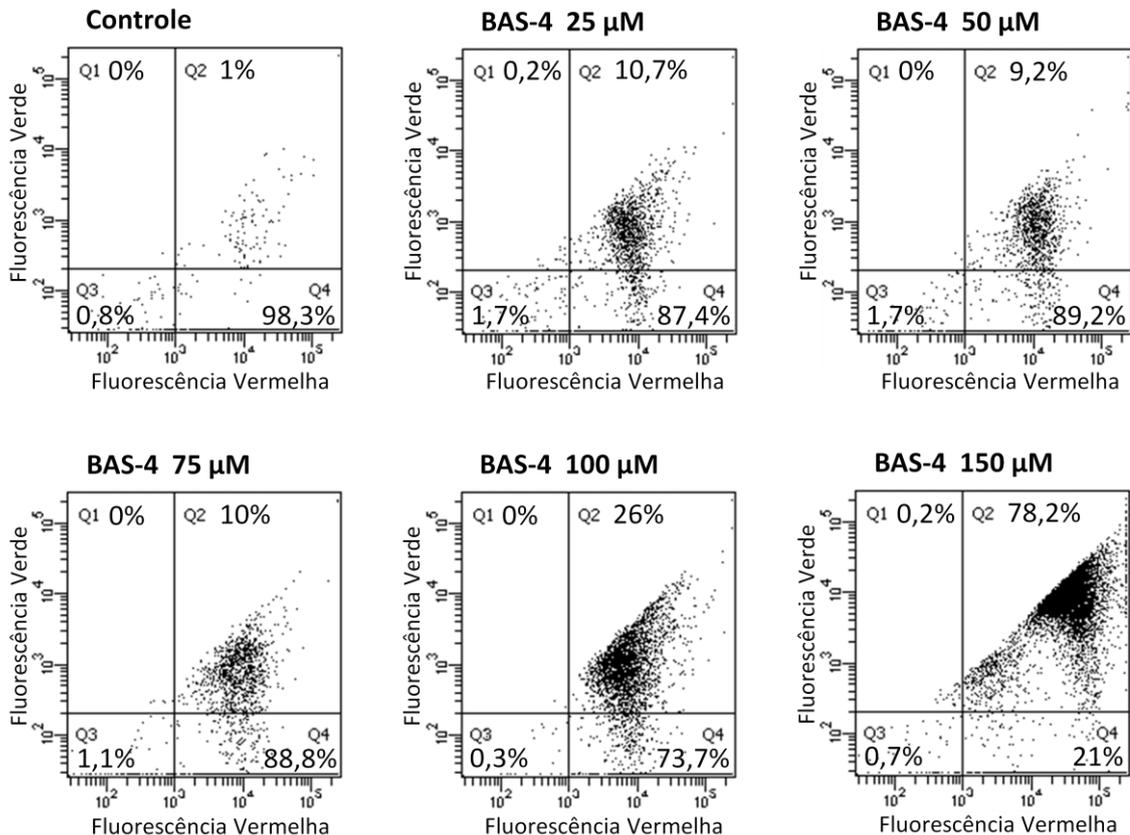


Figura 29: Análise da integridade do potencial mitocondrial por citometria de fluxo com JC-1. A fluorescência verde elevada representa células com perda do potencial mitocondrial, a fluorescência vermelha elevada com baixa fluorescência verde indica as células viáveis. É mostrado o padrão do controle e tratamento com BAS-4 nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 μM .

A figura 30 mostra o perfil do $\Delta\Psi_m$ no tratamento com diferentes concentrações da droga BAS-7, nela podemos constatar que as concentrações de 25 μM , 50 μM e 75 μM (98,5%, 94,9 % e 97,7 % de viáveis Q4 e 0,5 %, 1,1 % e 1,3 % de células lesionadas Q2 respectivamente) não demonstraram diferença grande na integridade do $\Delta\Psi_m$ quando comparados ao controle (98,3 % viáveis Q4 e apenas 1 % lesionadas Q2). Os tratamentos com 100 μM e 150 μM mostraram aumento na taxa de células com mitocôndrias lesionadas (7,7 % e 8,7 % em Q2 respectivamente), mantendo ainda 90,6 % e 89,3 % de células viáveis.

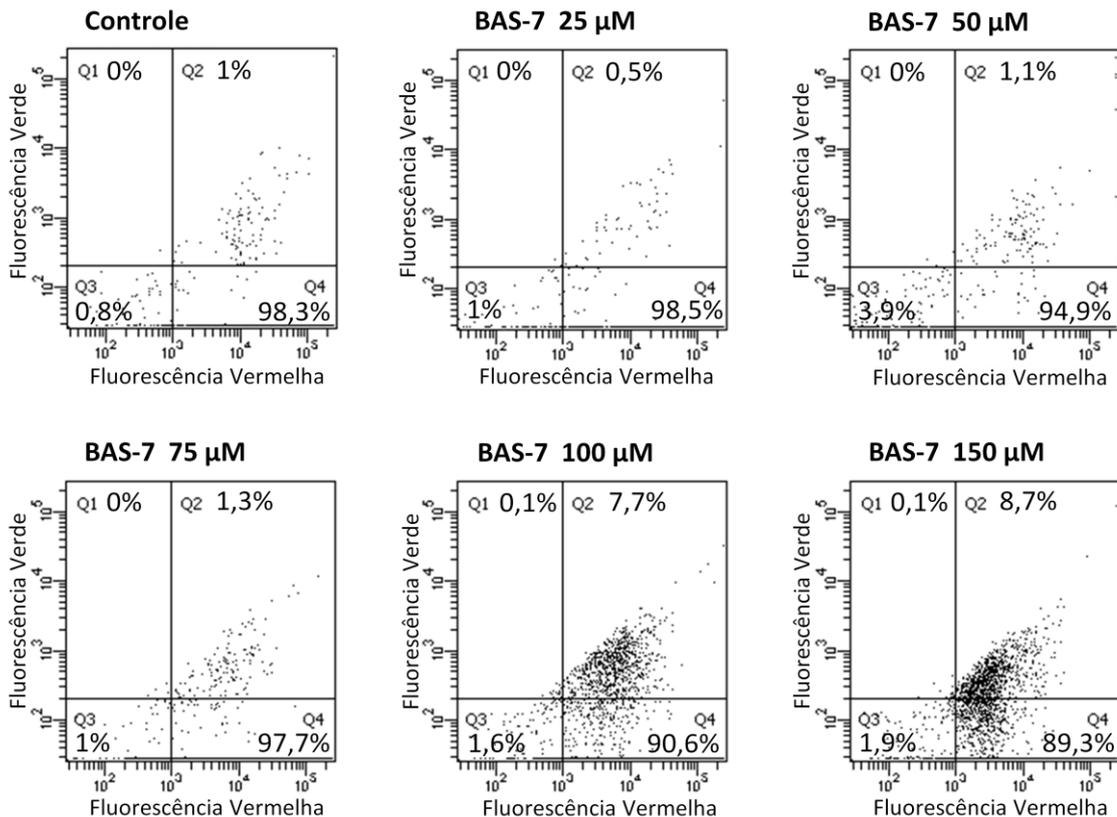


Figura 30: Análise da integridade do potencial mitocondrial por citometria de fluxo com JC-1. A fluorescência verde elevada representa células com perda do potencial mitocondrial, a fluorescência vermelha elevada com baixa fluorescência verde indica as células viáveis. É mostrado o padrão do controle e tratamento com BAS-7 nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 μM .

4.9 ANÁLISE DE APOPTOSE/NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para avaliar se o processo de morte promovido pelos flavonoides da *B. acutifolium* ocorre por apoptose, foi realizada a análise por citometria de fluxo para a marcação com Anexina V-FITC/PI. A figura 31 mostra a intensidade de fluorescência das células C6. Para ajuste dos quadrantes foi efetuado um branco na ausência dos marcadores, nele podemos constatar que 100 % das células apresentam-se no interior do quadrante representativo das células viáveis. No Controle podemos observar 96,2 % das células como células viáveis e somente 0,1 % de necrose, 3,4 % de apoptose e 0,3 % de apoptose tardia. O tratamento com o veículo (DMSO 0,3 %) mostrou padrão similar com 99,3 % de células viáveis e somente 0,3 % de necrose, 0,3 % de apoptose e 0,3 % de apoptose tardia.

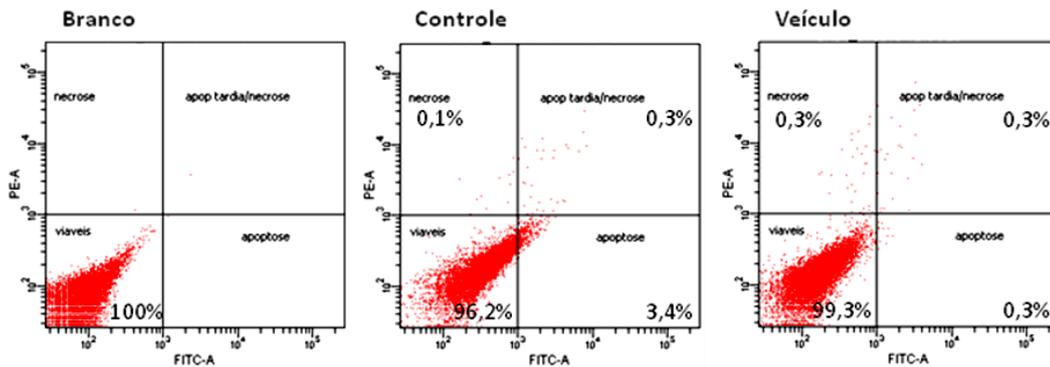


Figura 31: Análise por citometria de fluxo para apoptose/necrose usando como marcador anexina V-FITC e iodeto de propídio. É mostrado o padrão de distribuição das células nos quadrantes viáveis, apoptose, apoptose tardia e necrose para o branco (sem marcadores), o controle (incubado somente com meio de cultivo) e o veículo (incubado com 0,3 % de DMSO).

A figura 32 apresenta a taxa de apoptose/necrose para o tratamento por 24 h com a droga BAS-1, nela podemos constatar que o controle apresentou 97 % de células viáveis, 1,5 % de apoptose, 1,2 % de apoptose tardia e somente 0,3 % de necrose. Na concentração de 25 μM não houve diferença marcante em comparação ao controle, com valores de 96,3 % de células viáveis, 2,7 % de apoptose, 0,9 % de apoptose tardia e 0,1 % de necrose. Com o aumento da concentração (50, 75 e 100 μM) podemos constatar uma diminuição na taxa de células viáveis (90,3 %, 63,1 % e 4,1 %, respectivamente) e um aumento na taxa de apoptose (7,9 %, 21,1 % e 57,4 %) e de apoptose tardia (1,7 %, 14,6 % e 37 %), com baixos valores de necrose (0,2 %, 1,2 % e 1,6 %, respectivamente).

A figura 33 mostra o padrão de apoptose/necrose para o tratamento com diferentes concentrações da droga BAS-4, nela podemos constatar que o controle apresentou uma viabilidade de 96,2 % e apenas 3,4 % de apoptose, 0,3 % de apoptose tardia e 0,1 % de necrose. O tratamento com 25 μM mostrou uma pequena diminuição no número de células viáveis (93,5 %), com 4,8 % de apoptose, 1 % de apoptose tardia e 0,1 % de necrose. Com o aumento da concentração (50, 75, 100 e 150 μM) houve diminuição considerável no número de células viáveis (90,9 %, 81,2 %, 64,2 % e 30,4 %, respectivamente) e aumento na taxa de apoptose (7,9 %, 16,5 %, 33,7 % e 61,1 %), com pequeno aumento em apoptose tardia (0,7 %, 1,7 %, 1,9 % e 8,5 %), com baixa taxa de necrose (0,6 %, 0,6 %, 0,1 % e 0 %, respectivamente).

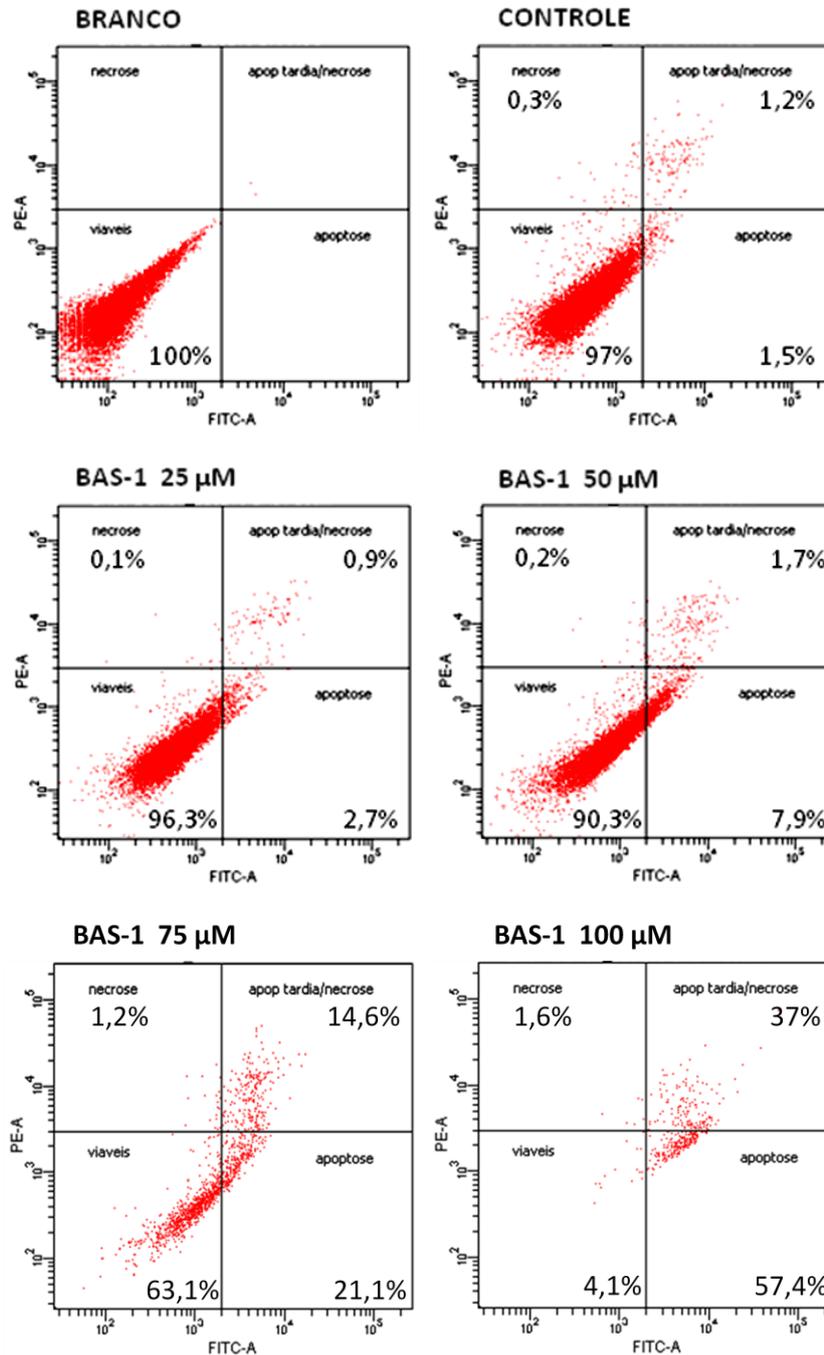


Figura 32: Análise por citometria de fluxo para apoptose/necrose, usando como marcador anexina V-FITC e iodeto de propídio, em células C6 tratadas por 24 h com BAS-1 nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µM. Também é mostrado o padrão de marcação para o branco (sem marcador) e controle (incubado somente com meio de cultivo). Os quadrantes representam a distribuição das células em viáveis, apoptose, apoptose tardia e necrose.

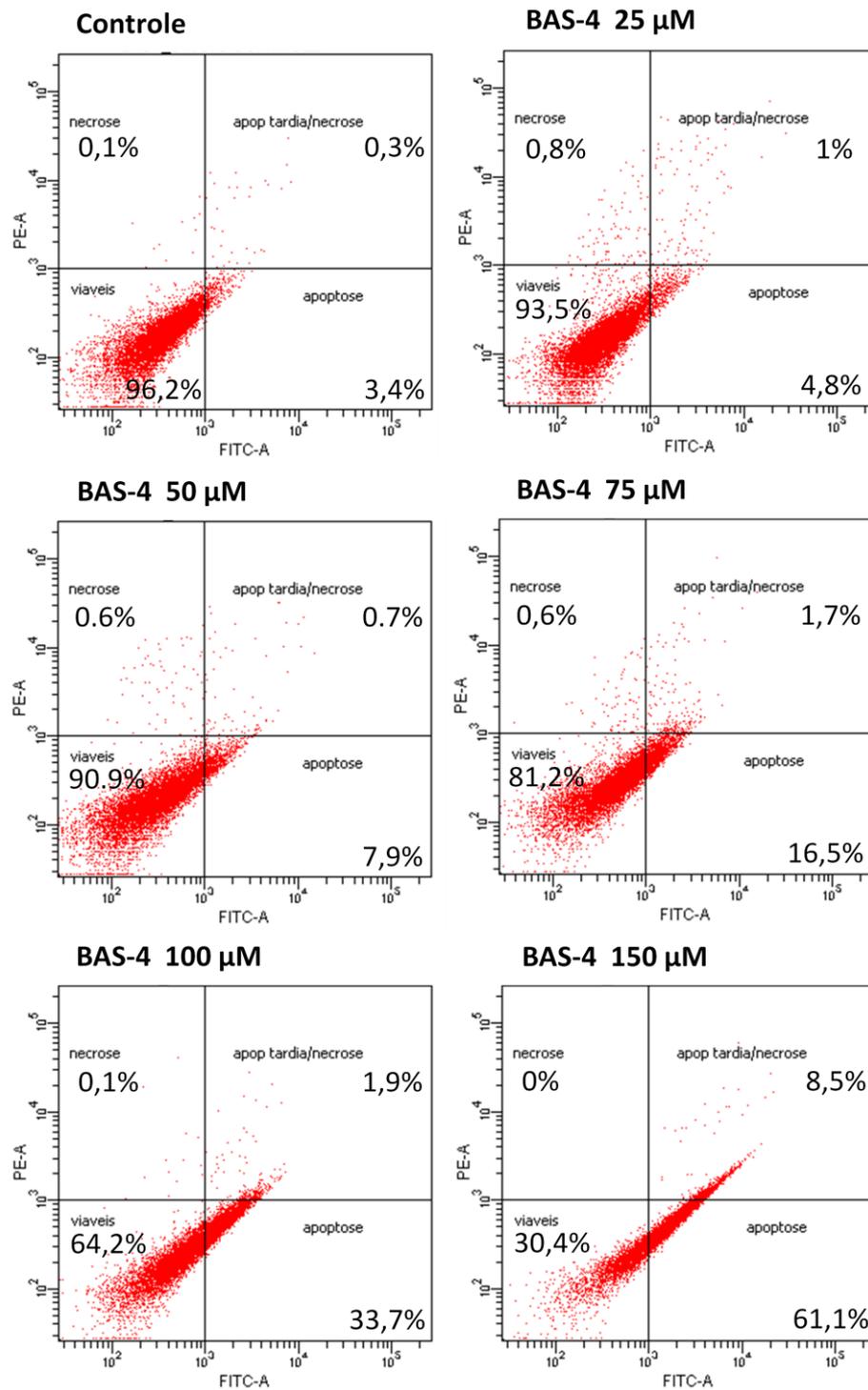


Figura 33: Análise por citometria de fluxo para apoptose/necrose, usando como marcador anexina V-FITC e iodeto de propídio, em células C6 tratadas por 24 h com BAS-4 nas concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150 μM , e controle. Os quadrantes representam a distribuição das células em viáveis, apoptose, apoptose tardia e necrose.

A figura 34 mostra o padrão de apoptose/necrose para o tratamento com diferentes concentrações da droga BAS-7, nela podemos constatar que comparado ao controle (97 % viável, 1,5 % de apoptose, 1,2 % de apoptose tardia e 0,3 % de necrose), o tratamento com concentrações crescentes da BAS-7 (25, 50, 75 e 100 μM) promoveu diminuição na viabilidade (87,1 %, 85,7 %, 83,4 % e 82,2 %, respectivamente) e aumento na taxa de apoptose (10,2 %, 11,3 %, 12,8 % e 13,9 %), porém com pouca diferença apresentada de uma concentração para outra, também houve um pequeno aumento na população de apoptose tardia (2,3 %, 2,7 %, 3,2 % e 3,5 %) e baixa taxa de necrose (0,5 %, 0,3 %, 0,6 % e 0,3 %).

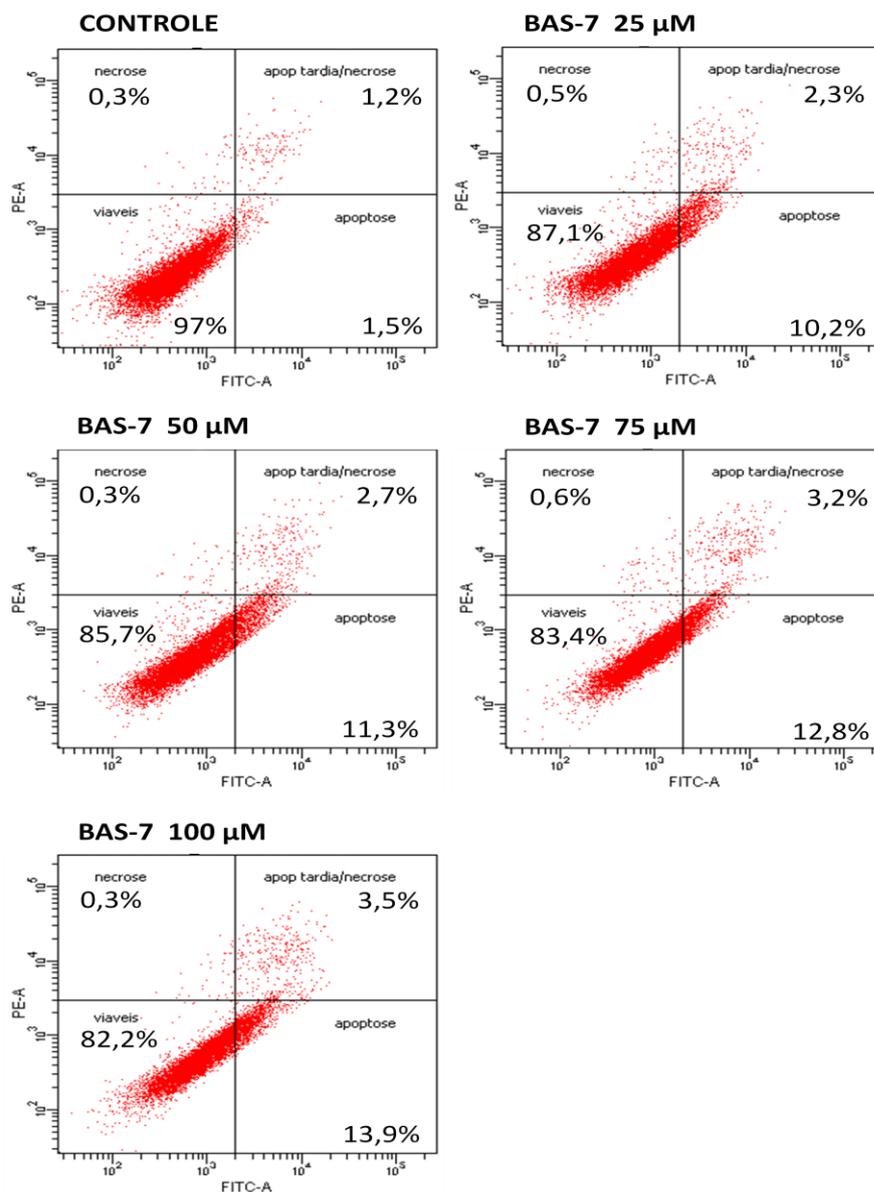


Figura 34: Análise por citometria de fluxo para apoptose/necrose, usando como marcador anexina V-FITC e iodeto de propídio, em células C6 tratadas por 24 h com BAS-7 nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM , e controle. Os quadrantes representam a distribuição das células em viáveis, apoptose, apoptose tardia e necrose.

4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Uma vez demonstrado o padrão de morte celular necrose/apoptose por citometria de fluxo com Anexina V e iodeto de propídio, resolvemos investigar as alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão nas amostras tratadas com os flavonoides da *B. acutifolium*, (Fig. 35a e 35b).

A figura 35a mostra em **A** (menor magnificação) e em **B** (campo ampliado) o padrão estrutural celular normal do glioblastoma C6 (controle), nela é possível distinguir a morfologia nuclear com cromatina dispersa e homogênea, além da presença de organelas citoplasmáticas com aspecto normal com complexo de Golgi e mitocôndrias.

Em **C** (menor magnificação) e **D** (ampliação) (Fig. 35a) é mostrado o padrão estrutural após o tratamento por 24 h com o veículo contendo 0,3 % de DMSO, nestas imagens podemos observar um padrão morfológico similar ao controle, com núcleo apresentando cromatina dispersa e de forma homogênea em seu interior, presença de organelas citoplasmáticas de aspecto normais tais como mitocôndrias.

Em **E** (menor magnificação) e **F** (ampliação) (Fig. 35a) é mostrado as alterações morfológicas decorrente do tratamento por 24 h com 75 μM da droga BAS-1, nelas podemos constatar a presença ainda da integridade da membrana plasmática, porém com uma acentuada mudança no aspecto intracelular, a presença de vacuolização do citoplasma e fenômeno indicativo de estresse em retículo endoplasmático, mostrando acúmulo de pequenas cisternas do mesmo no citosol e a presença de uma figura formada por várias cisternas agrupadas de lúmen expandido.

Na figura 35b, em **G** (menor magnificação) e **H** (ampliação) é mostrado o padrão estrutural das células C6 após o tratamento por 24 h com 75 μM da droga BAS-4, nelas podemos observar a integridade da membrana plasmática, uma maior presença de cromatina condensada na periferia do núcleo, além da intensa quantidade de vacúolos no citoplasma. Em **I** (menor magnificação) e **J** (ampliação) é mostrado o padrão morfológico células após a incubação com 100 μM da droga BAS-4, além de mostrar a intensa vacuolização no citosol, também é possível observar, em melhor destaque em **J**, a formação de figuras de mielina. Em **K** (menor magnificação) e **L** (ampliação) é mostrado o aspecto estrutural do glioblastoma C6 após o tratamento por 24 h com 150 μM da droga BAS-7, é possível observar a integridade da membrana plasmática (**K**) e como principais alterações a presença de vacuolização no citoplasma e também a presença de corpos eletrodensos.

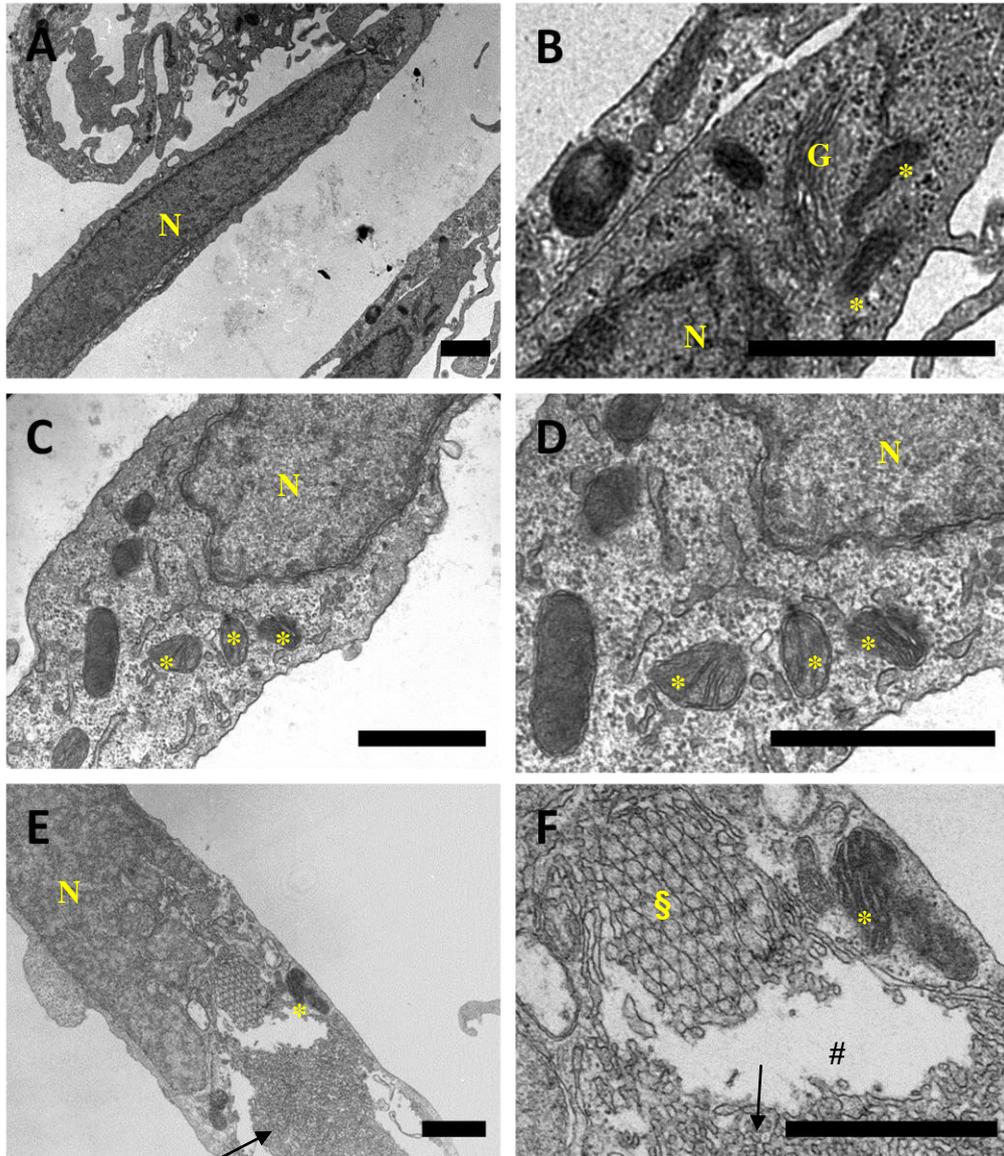


Figura 35a: MET de glioblastoma C6. É mostrada a morfologia normal das células do controle em **A** (menor magnificação) e em **B** (destaque ampliado) apresentando organelas e núcleo com aspecto normal. Em **C** (menor magnificação) e **D** (ampliação) é demonstrado o padrão morfológico do tratamento com veículo (0,3% de DMSO), revelando não haver mudança no aspecto das estruturas celulares. Em **E** (menor magnificação) e **F** (destaque ampliado) é mostrado o padrão morfológico após o tratamento por 24 h com 75 μM da droga BAS-1, onde é possível ver a ocorrência de processo de vacuolização (#), acúmulo de pequenas cisternas de membrana no interior da célula (seta) e uma figura com várias cisternas aglomeradas de lúmen expandido (§). N – núcleo; * - mitocôndrias; G – complexo de Golgi.

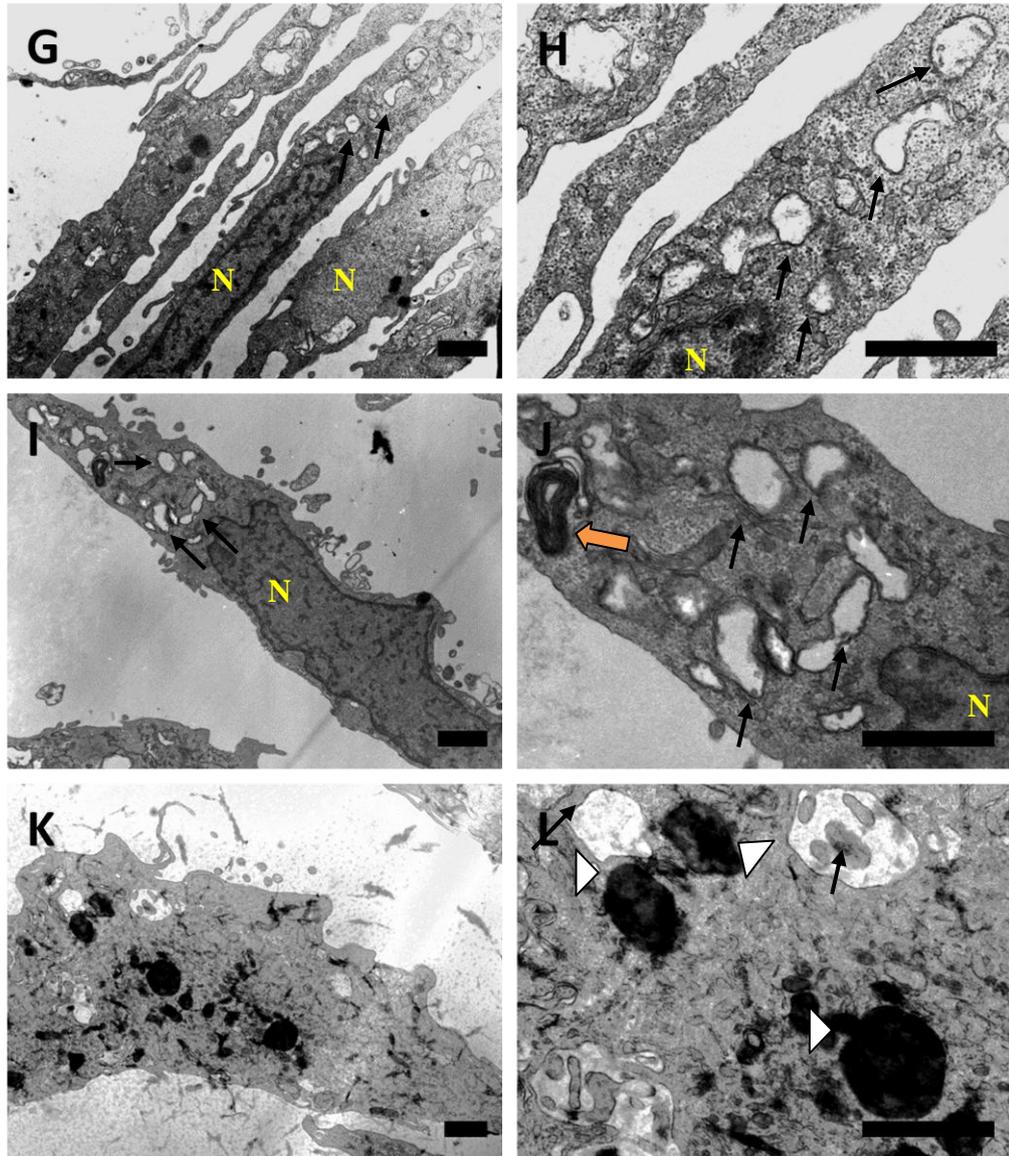


Figura 35b: Microscopia eletrônica de transmissão de glioblastoma C6. Em **G** (menor magnificação) e **H** (destaque ampliado) é mostrada as alterações ultraestruturais após a incubação por 24 h com 75 μM de BAS-4, onde é possível observar um número elevado de vacúolos no citosol (setas finas). Em **I** (menor magnificação) e **J** (ampliação) é mostrada as alterações ultraestruturais decorrente da incubação por 24 h com 100 μM de BAS-4, nele podemos constatar além do elevado número de vacúolos (setas finas), a presença também de figura de mielina (seta cheia). Em **K** (menor magnificação) e **L** (ampliação) é mostrada as alterações ultraestruturais decorrente da incubação por 24 h com 150 μM de BAS-7, onde é possível observar a presença de vacúolos (setas finas) e corpos eletrodensos no citosol (cabeça de seta). **N** – núcleo.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos a atividade antineoplásica de flavonoides isolados da casca da espécie vegetal *Brosimum acutifolium* em modelo de glioblastoma multiforme *in vitro*. Dos oito flavonoides isolados por Torres (1998), por motivo de indisponibilidade na quantidade de amostra, apenas 4 foram selecionados para teste, as flavanas (2S)-4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)-flavana (**BAS-1**) e (2S)-7,4'-dihidroxi-8,(3,3-dimetilalil)-flavana denominada por Torres *et al.* (2000) de Brosimina B (**BAS-4**), e as chalconas 4,2'-dihidroxi-3',4'--(2'',2''-dimetilpirano)-chalcona (**BAS-6**) também conhecida como hidroxilonchocarpina, e a 4,2',4'-trihidroxi-3'-(3,3-dimetilalil)-chalcona (**BAS-7**), também conhecida como 4-hidroxiisocordoina ou isobavachalcona.

É importante resaltar que dos flavonoides isolados da *B. acutifolium* por Torres (1998), a flavana BAS-1 se mostra como o componente majoritário, e que no processo de formação das mesmas, a primeira a surgir é a chalcona prenilada BAS-7, a qual age como precursora das demais, de modo que a análise estrutural destes flavonoides (Fig. 05, p. 9) mostra íntima relação entre a chalcona prenilada BAS-7 e a piranochalcona BAS-6, assim como entre a flavana prenilada BAS-4 e a piranoflavana BAS-1. Ainda segundo este autor vale resaltar que flavanas não substituídas no anel heterocíclico, como as apresentadas neste estudo, são raras na natureza.

Dos flavonoides aqui apresentados, a chalcona BAS-7 conhecida com isobavachalcona, já é bem descrita na literatura por suas propriedades biológicas, tais como: ação bactericida (KUETE *et al.*, 2010); ação agonista em receptor de estrógeno (ER), principalmente para o receptor ER β (XIN *et al.*, 2010); ação inibidora da produção de óxido nítrico em macrófago (MATSUDA *et al.*, 2009); supressora da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida por agonistas de receptores “Toll-like” (SHIN *et al.*, 2013); inibição da acil-CoA:colesterol aciltransferase (CHOI *et al.*, 2008); inibição da produção de melanina em células de melanoma (OHNO *et al.*, 2010); além da ação em vários tipos de câncer, como o de ovário, carcinoma de pulmão, câncer de mama (JING *et al.*, 2010), de próstata (SZLISZKA *et al.*, 2010) e em neuroblastoma (NISHIMURA *et al.*, 2007). Porém não há relato de teste dessa droga em modelo de glioblastoma.

Devido os flavonoides serem pouco solúveis em meio aquoso, tendo que ser solubilizadas previamente em DMSO para então serem diluídas em meio, adotamos como concentração máxima de teste na viabilidade 150 μ M, a qual está de acordo com muitos trabalhos da literatura científica que envolve a ação de flavonoides como agente

antineoplásico (KARMAKAR *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2012; NI *et al.*, 2012). Nesta concentração o conteúdo de DMSO na amostra foi de 0,3 %, quantidade que não demonstrou alterar a viabilidade das células C6 no grupo veículo (fig. 13, p. 34; fig. 15, p. 36; fig. 17 p. 38 e fig. 18, p. 39).

A análise de viabilidade celular do GBM C6 tratado com os flavonoides da *B. acutifolium*, mostrou que tanto a flavana BAS1 quanto a flavana BAS-4, apresentaram bons resultados em promover citotoxicidade, com IC₅₀ em 24 h de incubação próximo de 75 µM tanto para a BAS-1 (Fig. 13, p. 34) e de 72 µM para BAS-4 (Fig. 15, p. 36), no entanto podemos verificar que a viabilidade celular no tratamento com BAS-1, não sofre mudança significativa até a concentração de 50 µM, apresentando uma queda brusca na viabilidade na faixa de concentração entre 50 µM e 100 µM, já o tratamento com a flavana BAS-4, mostrou um declínio mais gradual na viabilidade com o aumento da concentração da droga, já apresentando diferença significativa em relação ao controle nas concentrações de 25 e 50 µM. No entanto deve-se levar em consideração que a diferença entre a concentração de 25 µM e o controle foi de apenas 7 % e que os desvios padrões destes grupos foram pequenos.

A droga BAS-7 (Fig. 18, p. 39) apresentou uma IC₅₀ aproximadamente de 95 µM, não apresentando diferença significativa para as concentrações de 25 µM e 50 µM, enquanto que a chalcona BAS-6 (Fig. 17, p. 38) não apresentou diferença significativa para nenhuma das concentrações testadas, mostrando assim não ser uma candidata a agente antineoplásico no modelo de GBM C6 *in vitro*, e por este motivo não testada nos demais ensaios neste trabalho.

A comparação do valor da IC₅₀ para uma droga com outra similar apresentada na literatura deve ser sempre tomada com cautela, pois o valor da mesma pode depender de muitos fatores, tais como o método de análise, tipo de célula na qual foi realizado o teste, densidade de célula testada, tempo de exposição à droga, entre outros, desse modo para os flavonoides é possível encontrar na literatura valores de IC₅₀ tão baixa quanto 15 µM, enquanto outras situações podem apresentar valores muito mais elevados (ZHAO *et al.*, 2012). Assim, Priyadarsini *et al.* (2010) mostram que a quercetina, um flavonoide amplamente conhecido por sua atividade antineoplásica, apresenta em modelo *in vitro* de câncer cervical humano HeLa, uma IC₅₀ igual a 80 µM, nesse aspecto nossos resultados para a BAS-1, BAS-4 e BAS-7, mostraram ser tão promissores quanto a quercetina, no entanto, deve-se ressaltar que estamos falando de modelos de cânceres bem distintos.

A atividade da BAS-7 (Isobavachalcona) já foi descrita na literatura em vários tipos de câncer. Ohno *et al.* (2010) mostram, em ensaio com MTT, que esta droga apresenta um valor de IC₅₀ para o melanoma B16 de 17,5 µg/ml o equivalente a 54 µM, porém vale ressaltar que

esta análise foi realizada após quatro dias de exposição a droga, já Jing *et al.* (2010) mostram com 72 h de incubação, valores de IC₅₀ de 7,92 µM para carcinoma de ovário humano OVCAR-8; 15,06 µM em carcinoma de próstata humano PC3; 32 µM em carcinoma de pulmão humano A549; 28,29 µM em carcinoma de mama humano, estes autores também demonstraram uma IC₅₀ de 31,61 µM em linhagem L-02 uma célula normal de fígado humano e 31,30 µM em linhagem HUVEC (célula endotelial de veia de cordão umbilical humano). No entanto Nishimura *et al.* (2007) mostram que para células neurais da camada granular do cerebelo o valor de IC₅₀ é superior a 100 µM, porém mostrou-se bastante ativa contra células de neuroblastoma, com uma IC₅₀ para incubação por 48 h de 5,61 µM em linhagem IMR-32 e 6,22 µM em NB-39.

Takashima *et al.* (2005) em trabalho realizado com células leucêmicas da linhagem P388, relatam a atividade citotóxica de vários compostos da *B. acutifolium*, dentre os quais o composto referente a BAS-1, o qual apresentou IC₅₀ na incubação por 72 h de 22 µg/ml, o equivalente a 71,43 µM, um valor bem parecido com o que observamos para o GBM em 24 h de tratamento. No entanto nenhum outro teste biológico adicional foi realizado por estes pesquisadores.

Uma vez constatado a boa atividade citotóxica para os flavonoides BAS-1, BAS-4 e BAS-7, resolvemos investigar se a incubação com estas drogas estaria gerando alteração na viabilidade com tempo curto de exposição, o que poderia ser um indicativo de processo necrótico, com possível colapso de membrana plasmática e extravasamento de conteúdo citosólico, ou se a manifestação na diminuição de viabilidade seria tardia, mais condizente com um fenômeno apoptótico, o qual pode levar horas até que aja perda de função da célula (BOUJRAD *et al.*, 2007).

Com base na resposta de viabilidade observada na curva de concentração, elegemos as concentrações de 75 µM para a BAS-1 (Fig. 14, p. 35) e 100 µM para as drogas BAS-4 (Fig. 16, p. 37) e BAS-7 (Fig. 19, p. 40) a serem testadas em uma curva de tempo de exposição. Nesse teste o controle apresentou um comportamento natural ascendente no índice de viabilidade no decorrer do tempo, mostrando diferença significativa em relação ao tempo inicial a partir de 3 h de incubação e alcançando mais de 2,5 vezes o valor da viabilidade inicial no prazo de 48 h de incubação.

Para o tratamento com 75 µM da BAS-1 (Fig. 14, p. 35) podemos constatar que houve redução considerável da viabilidade celular com tempo curto de exposição (36 % em 3 h e 69 % com 12 h), o que poderia sugerir uma maior extensão de processo necrótico no fenômeno de citotoxicidade gerado pela droga BAS-1. Já o tratamento com 100 µM da BAS-4 (Fig. 16,

p. 37), mostrou redução gradual na viabilidade com o passar do tempo, não apresentando diferença significativa para o tempo de 3 h em relação ao momento inicial, estando assim estes dados em conformidade ao esperado para a ocorrência de fenômeno de morte por processo apoptótico em tal tratamento. Assim a diferença no comportamento entre as flavanas BAS-1 (queda brusca na viabilidade para concentração acima de 50 μM (Fig. 13, p. 34) e diminuição da viabilidade com tempo precoce de incubação (Fig. 14, p. 35)) e BAS-4 (decréscimo mais gradual tanto na curva de concentração quanto na curva de tempo (Fig. 15 e 16, pp. 36 e 37)) nos é sugestivo de que tais flavonoides podem apresentar mecanismos distintos de agressão celular.

A análise da curva de tempo para o tratamento com 100 μM da BAS-7 (Fig. 19, p. 40) nos mostra que para esta concentração, não houve queda de viabilidade a valores inferiores ao do tempo inicial ao longo do tempo de tratamento, mostrando sim um crescimento da viabilidade, o qual se mostra significativo a partir de 12 h de incubação, porém com uma taxa de crescimento significativamente menor que a do grupo controle, o que nos é sugestivo de que para esta concentração, possa estar havendo um efeito mais pronunciado citostático, com uma possível diminuição na atividade do ciclo celular, concomitante ao efeito citotóxico causador de morte, porém menos pronunciado.

Uma vez demonstrada a atividade citotóxica das flavanas BAS-1 e BAS-4 e da chalcona BAS-7 nas células do glioblastoma C6, foi nosso interesse investigar se o tratamento com estes flavonoides poderia ocasionar a morte em células não neoplásicas, para isso elegemos como modelo comparativo a cultura de células gliais de rato, já que o glioblastoma C6 tem como origem este tipo celular (JACOBS *et al.*, 2011), e escolhemos como concentrações as duas maiores testadas no glioblastoma (100 μM e 150 μM).

A análise deste resultado (Fig. 20, p. 41) nos mostra que a droga BAS-1 na concentração de 150 μM , assim como no GBM, foi extremamente tóxica para este tipo de célula, porém a concentração de 100 μM a qual é também extremamente agressiva para o GBM, não mostrou alterar a viabilidade das células gliais, o que nos leva a concluir que uma terapia com concentrações inferiores a 100 μM pode ser viável, uma vez que em concentrações mais elevadas pode gerar toxicidade nas células não neoplásicas.

O tratamento da cultura de glia com a droga BAS-4 (Fig. 20, p. 41) na concentração de 100 μM não demonstrou alteração significativa em relação ao controle, enquanto para a concentração de 150 μM houve uma redução significativa de 24 % na viabilidade, no entanto comparado ao efeito desta concentração no glioblastoma, onde houve uma redução de 93 %

(Fig. 15, p. 36), podemos considerar que esta droga apresenta um bom grau de segurança para célula não neoplásica.

O tratamento das células gliais com a chalcona BAS-6 (Fig. 20, p. 41) de modo similar ao observado no tratamento do glioblastoma com esta droga (Fig. 17, p. 38) não demonstrou diferença significativa para nenhuma das duas concentrações testadas. Enquanto o tratamento das células gliais com a chalcona BAS-7 (Fig. 20, p. 41), mostrou tanto para a concentração de 100 μM quanto para 150 μM , um pequeno aumento na viabilidade, enquanto que o tratamento com as mesmas concentrações na célula C6 promoveu uma redução de 54 % e 88 % respectivamente (Fig. 18, p. 39).

Em um trabalho realizado com células não neoplásica de fibroblasto embrionário de pulmão humano (Fig-1) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVE), Matsuo *et al.* (2005) demonstraram a IC_{50} para vários flavonoides nestes dois tipos de células respectivamente (apigenina 110 μM e 110 μM ; eriodictiol 410 μM e 112 μM ; 3-hidroxi-flavona 40,4 μM e 64 μM ; kaempferol 221 μM e 167 μM ; luteolina 107 μM e 57 μM ; naringenina >300 μM e 108 μM ; quercetina 303 μM e 61 μM ; taxifolina >300 μM e >200 μM). Comparado a esses resultados podemos considerar que os flavonoides testados nesta tese apresentaram baixo efeito citotóxico para a célula não neoplásica, visto que somente a concentração de 150 μM da BAS-1 apresentou valor de viabilidade inferior ao da IC_{50} para esse tipo celular (Fig. 18, p. 39).

Uma vez demonstrado que os flavonoides avaliados neste trabalho apresentam menor atividade citotóxica para células não neoplásicas, foi nosso intuito investigar também o grau de segurança, no tratamento com estas drogas, para a integridade de membrana plasmática de eritrócitos (Fig. 21, p. 42). Nesse ensaio a droga BAS-7 mostrou ser a mais segura com índice de hemólise inferior a 3 % para as duas concentrações avaliadas (150 μM e 100 μM). A droga BAS-4 também mostrou ser bastante segura, com índice de hemólise inferior a 10 % para a maior concentração testada de 150 μM (7 ± 1 %). Nesse aspecto a droga BAS-1 mostrou ser a menos segura, apresentando índice de hemólise de 41 ± 3 % em 150 μM e 20 ± 2 % no tratamento com 100 μM , o que ainda representa valores inferiores a EC_{50} para hemólise com essas concentrações.

O fato de a droga BAS-1 ter mostrado um grau maior de hemólise em comparação as demais, não significa uma inviabilidade terapêutica para esta droga, pois muitos fármacos, dentro de um limite tolerável, podem desencadear processo hemolítico, dentre eles o tamoxifeno, muito utilizado na terapia de câncer de mama (CRUZ SILVA *et al.*, 2000). Esta diferença de comportamento da droga BAS-1 em relação às demais, reforça a ideia da

participação de mecanismos diferentes no processo de lesão celular do glioblastoma, porém somente com esta análise não pode ser conclusivo que um processo necrótico esteja sendo mais efetivo no tratamento com a BAS-1.

Também investigamos o aspecto morfológico do glioblastoma C6 no tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium*, por microscopia de contraste de fase (Fig. 22A e 22B, pp. 44 e 45). Nesse resultado podemos constatar uma morfologia normal das células, para o tratamento com 25 μM , tanto para a BAS-1, BAS-4 e BAS-7, apresentando a maioria das células o seu aspecto típico fusiforme em cultura, além da presença de algumas células globosas, característica de célula em divisão celular.

O tratamento com a concentração de 50 μM , de modo similar ao observado no ensaio de viabilidade, não demonstrou alteração detectável para a incubação com a chalcona BAS-7, porém apresentou mudanças morfológicas e no número de células para a incubação com as flavanas BAS-1 e BAS-4, com a presença de vacuolização para a BAS-1 e algumas células com aspecto típico apoptótico, com perda do aspecto fusiforme acompanhado de presença de corpos apoptóticos, para a BAS-4.

O tratamento com 75 μM mostrou uma intensificação nas alterações estruturais, mostrando um efeito bem acentuado com praticamente todas as células apresentando aspecto picnótico para o tratamento com BAS-1 e uma taxa maior de células também picnóticas para a BAS-4, já para a BAS-7, com esta concentração foi possível observar uma menor densidade de células, mantendo ainda o aspecto fusiforme, porém com a presença de vacuolização no citoplasma.

O tratamento com 100 μM tanto para a BAS-1 (imagem não mostrada) quanto para a BAS-4, mostrou a completa perda da morfologia natural das células, mostrando apenas células com aspecto picnótico, enquanto para a BAS-7 nessa concentração ainda é possível distinguir uma população de células em processo de perda da morfologia fusiforme, apresentando em seu interior processo de vacuolização, e outra população com aspecto picnótico indicativo de um processo já mais avançado na morte celular programada, o que está de acordo com o observado no ensaio de viabilidade no qual as drogas BAS-1 e BAS-4 mostraram ser mais potentes que a BAS-7. Tais alterações morfológicas apresentadas para as drogas BAS-1, BAS-4 e BAS-7, estão de acordo com o descrito na literatura, para a ação de muitas drogas indutoras de morte programada observada em células de gliomas (BILIR *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2011; OVERMEYER *et al.*, 2011).

Também avaliamos o tratamento com 150 μM da droga BAS-6, a qual em conformidade ao resultado de viabilidade, não apresentou diferença no padrão morfológico em relação ao controle.

Uma das problemáticas na terapia do GBM é o fato deste apresentar fenômeno de migração, invadindo o tecido nervoso normal ao seu redor, sem formar um limite nítido entre o neoplasma e o tecido normal, o que limita a capacidade de tratamento por ressecção cirúrgica, permitindo comumente a recidiva do câncer (VAN MEIR *et al.*, 2010). Neste aspecto uma droga que promova redução da capacidade migratória do GBM, pode apresentar um papel útil como terapia auxiliar no seu tratamento.

A literatura mostra que flavonoides como a quercetina, apresentam atividade antiproliferativa e inibidora de migração celular em câncer, inclusive em glioblastoma (BISHAYEE *et al.*, 2013; MICHAUD-LEVESQUE *et al.*, 2012), com base nisso, foi de nosso interesse investigar se o tratamento com baixas concentrações dos flavonoides BAS-1, BAS-4 e BAS-7 poderiam estar influenciando na capacidade migratória das células C6 (Figura 23, p. 46). Para isso elegemos as concentrações de teste de 25 μM e 50 μM , por terem apresentado menor alteração de viabilidade e morfologia celular. Neste tratamento tanto a concentração de 25 μM quanto 50 μM da BAS-1, BAS-4 e BAS-7 foram efetivas em diminuir a migração das células para zona de lesão na placa, também foi demonstrado que o conteúdo de DMSO presente como diluente das drogas não estava interferindo na capacidade migratória das células, visto que a capacidade migratória no grupo veículo foi igual ao do controle.

Segundo Michaud-Levesque *et al.* (2012), a ação do flavonoide quercetina em promover a diminuição na migração celular deve-se a esta molécula poder interferir bloqueando a sinalização estimulada por interleucina 2 (IL-2) na via da JAK/STAT-3, a qual em glioblastoma o STAT-3 age como oncogene hiperexpresso. Assim este flavonoide promoveria uma redução da transcrição de genes ativados por STAT-3, dentre os quais os responsáveis por fenômenos de migração celular e do controle do ciclo celular como a ciclina D1. Assim uma possível ação dos flavonoides da *B. acutifolium* em promover diminuição na migração celular pode ser por este mecanismo descrito, no entanto, não foi possível neste trabalho analisarmos o padrão de expressão e atividade da via JAK/STAT-3 em nosso modelo de estudo.

Sabe-se que uma das problemáticas na quimioterapia do câncer, inclusive no GBM, é o fato de que este apresenta células tronco no interior da massa tumoral, as quais podem assumir uma característica quiescente, entrando no ciclo celular somente quando em respostas a estímulos externos, tais como fatores de crescimento, no entanto, na forma quiescente,

difícilmente podem ser alvo do tratamento clássico, o qual preferencialmente tem como alvo células em intensa proliferação, representando assim, uma forma de resistência ao tratamento quimioterápico e contribuindo para a recidiva do tumor no término do tratamento caso não sejam totalmente eliminadas (KANU *et al.*, 2009)

Com base no pressuposto, foi nossa intenção investigar se a pré-exposição das células C6 por 24 h com os flavonoides BAS-1, BAS-4 e BAS-7, poderia limitar a capacidade proliferativa destas após o tratamento, prejudicando assim, a formação de novas colônias (Fig. 24, p. 48). Em nosso resultado, podemos constatar que o pré-tratamento com 50 μM , para as três drogas testadas, foi capaz de promover uma pequena redução na capacidade formadora de colônias, a qual se torna bem evidente no pré-tratamento com 100 μM , onde é possível ver o pouco número de colônias formadas e com tamanho rudimentar, com melhor efeito visto para a droga BAS-1, seguido da BAS-4 e menor na BAS-7. Não foi possível a realização do ensaio com as concentrações de 150 μM para as drogas BAS-1 e BAS-4, pois não apresentaram número suficiente de células viáveis após o pré-tratamento, porém foi possível realizar para a droga BAS-7, a qual mostrou redução bastante intensa no número de colônias formadas, porém com algumas colônias ainda apresentando tamanho bem desenvolvido em meio as demais de pequena dimensão.

A diminuição na capacidade migratória, aliada a redução na capacidade de formação de novas colônias confirma, então, a boa atividade dos flavonoides BAS-1, BAS-4 e BAS-7 em retardar a progressão do GBM *in vitro*, agregando assim valor terapêutico a estas drogas.

Uma vez demonstrado a atividade em reduzir a capacidade migratória celular e a diminuição do potencial proliferativo do GBM através do ensaio de formação de colônia, foi nosso intuito caracterizar como o tratamento com tais flavonoides influenciaria a taxa populacional de células no ciclo celular. Nossos resultados mostram que, comparado ao controle, o tratamento com o veículo contendo 0,3 % de DMSO, como o esperado, não gera grande interferência no padrão de distribuição das células no ciclo celular (Fig. 25, p. 50), mostrando apenas uma pequena redução em G1/G0, com pequeno aumento em G2/M. O mesmo ocorrendo para o tratamento com 25 μM e 50 μM da droga BAS-1, no entanto com a concentração de 75 μM desta droga observamos um aumento em G1/G0, acompanhado de redução em S, com pouca alteração em G2/M, sugestivo de que esta concentração está impedindo o progresso no ciclo celular de G1/G0 para S, diminuindo a proliferação celular. Já o tratamento com 100 μM da droga BAS-1 mostrou diminuição bastante considerável nos parâmetros do ciclo celular, principalmente para G1/G0 e G2/M, com aumento substancial da população SubG0, caracterizando assim a saída das células do processo de ciclo celular. Esse

aumento substancial da população SubG0 é bem descrito na literatura como indício do aumento na taxa de morte celular por processo apoptótico, onde um dos sinais seria a condensação da cromatina e fragmentação do material genético (JING *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2011).

A análise do ciclo celular para o tratamento com a droga BAS-4 comparada ao controle (Fig. 26, p. 51), mostra que para a concentração de 25 μM , houve de forma mais marcante uma diminuição na fase S, o mesmo sendo observado com a concentração de 50 μM , porém com esta concentração houve substancialmente aumento em G1/G0, o que é indício de retenção das células nessa fase e por consequência, diminuição da taxa proliferativa celular. A não elevação na taxa de SubG0, nos sugere que a taxa de apoptose para esta concentração é baixa, estando assim este resultado de acordo com o observado no ensaio de viabilidade celular. Já no tratamento com 75 μM com esta droga, a redução na fase S mostrou-se ainda mais acentuada, com uma pequena diminuição em G1/G0 e aumento em G2/M, indicando retenção no ciclo nessa fase. Também é possível constatar a saída de células do ciclo celular através do aumento de SubG0, possivelmente por um aumento na taxa de apoptose, o qual torna-se mais evidente com 100 μM e 150 μM da BAS-4 visto pela diminuição na população G1/G0 acompanhado do aumento na população SubG0.

O tratamento com a droga BAS-7 comparado ao controle (Fig. 27, p. 52), mostrou que para as concentrações de 25 μM e 50 μM não houve grande mudança no padrão de distribuição de células no ciclo celular, apresentando apenas um pequeno aumento em G1/G0 e uma pequena diminuição em S e G2/M, estando assim de acordo com o observado no ensaio de viabilidade celular. Já para a concentração de 75 μM observamos uma retenção das células na fase G1/G0, um padrão semelhante ao observado com a concentração de 50 μM da BAS-4 (Fig. 26, p. 51). Com 100 μM , mostrou-se bem marcante a redução na população da fase S, com retenção em G1/G0, porém menor que o observado para a concentração de 75 μM , enquanto o tratamento com 150 μM mostrou redução da população G1/G0 e de S, com aumento pronunciado na população em G2/M. Estes resultados nos faz concluir que para a droga BAS-7, até a concentração de 75 μM , há uma tendência de retenção no ciclo celular na fase G1/G0, enquanto que para concentrações mais elevadas a tendência é de retenção na fase G2/M.

Uma vez demonstrado a ação dos flavonoides da *B. acutifolium* no ciclo celular do GBM C6, foi nosso interesse investigar se tal tratamento poderia estar comprometendo a viabilidade mitocondrial, para isto analisamos o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) com o marcador fluorescente JC-1.

A perda da integridade do $\Delta\Psi_m$ está associada a vários fenômenos, dentre os quais a indução de apoptose, onde o desequilíbrio entre os membros da família Bcl-2, com a redução dos membros anti-apoptóticos tais como o Bcl-2 e o aumento dos membros pró-apoptóticos como o BAX, permitirá a formação de poros na membrana mitocondrial permitindo a liberação de citocromo c para o citosol, permitindo a ativação da caspase-9 e assim dando prosseguimento ao processo apoptótico (ALMAWI *et al.*, 2004; ARYA *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostram que tanto para o controle quanto para o tratamento com veículo por 24 h (Fig. 28, p. 53), a taxa de perda na integridade do $\Delta\Psi_m$, representada pelo aumento na fluorescência verde, foi baixa com valores de 1 % e 2,8 % respectivamente, mostrando assim que a carga de DMSO presente nas amostras não está interferindo na viabilidade mitocondrial. O fato da população representativa de mitocôndrias com $\Delta\Psi_m$ viável (Q4) no grupo veículo não ter mostrado valor similar ao controle e sim um pouco inferior a este, deve-se a ocorrência de uma população de células (Q3 = 10,5 %) que não incorporaram o corante JC-1, por tanto não podendo ser classificadas nem como viáveis ou lesionadas.

O tratamento com a droga BAS-1 mostrou perda na integridade do $\Delta\Psi_m$ com o aumento da concentração testada (Fig. 28, p. 53), mostrando já ocorrer lesão mitocondrial com a menor concentração testada (25 μM = 5 %), com 50 μM aumenta para 7,4 %, atingindo praticamente o máximo com 75 μM (28,7 %), de modo que desta para a concentração de 100 μM houve apenas um discreto aumento (29,4 %).

O tratamento com a droga BAS-4 também mostrou a perda da integridade do $\Delta\Psi_m$ (Fig. 29, p. 54). Com 25 μM já podemos observar lesão em 10,7 % da população, porém não houve grande diferença entre o efeito nesta concentração e as de 50 μM e 75 μM , as quais apresentaram percentual de lesão mitocondrial de 9,2 % e 10 % respectivamente. De modo similar ao observado no tratamento com 75 μM e 100 μM da BAS-1, a concentração de 100 μM da BAS-4 apresentou uma taxa de lesão de 26 % e com 150 μM este valor atingiu 78,2 %.

O tratamento com a droga BAS-7 (Fig. 30, p. 55) não mostrou perda da integridade do $\Delta\Psi_m$ para as concentrações de teste de 25 μM , 50 μM e 75 μM , mostrando uma taxa de lesão de 0,5 %, 1,1 % e 1,3 % respectivamente. Apenas com as concentrações de 100 μM e 150 μM houve alteração, mostrando valores de 7,7 % e 8,7 %, taxa similar ao observado no tratamento com 50 μM da BAS-1.

Com o intuito de caracterizar de forma mais precisa o processo de morte ocasionado pelo tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium*, realizamos o ensaio de apoptose/necrose com o uso dos marcadores anexina V-FITC e PI. Neste aspecto, podemos constatar que o tratamento com veículo contendo 0,3 % de DMSO não alterou o padrão de

viabilidade celular (99,3 %) em comparação ao controle (96,2 %) (Fig. 31, p. 56) e em ambas as condições as populações de células em apoptose recente, apoptose tardia e necrose foram baixas (< 4 %).

Em conformidade com o ensaio do MTT, o tratamento com diferentes concentrações da droga BAS-1 (Fig. 32, p. 57), no ensaio com anexina V-FITC/PI, mostrou redução na população de células viáveis de forma bastante similar (25 μM = 96,3 %; 50 μM = 90,3 %; 75 μM = 63,1 % e 100 μM = 4,1 %). Neste ensaio observamos que com o aumento na concentração de incubação, ocorreu substancial aumento na população indicativa de apoptose recente (25 μM = 2,7 %; 100 μM = 57,4 %), o mesmo ocorrendo para apoptose tardia (25 μM = 0,9 %; 100 μM = 37 %), acompanhado de baixa taxa de necrose (25 μM = 0,1 %; 100 μM = 1,6 %), portanto sugestivo de que a morte causada por este tratamento é por processo apoptótico e não necrose, como se levava a suspeitar pelos ensaios da curva de tempo de viabilidade e no ensaio de hemólise para este flavonoide.

De igual modo, o tratamento com a droga BAS-4 (Fig. 33, p. 58) também mostrou aumento na taxa de apoptose com o aumento da concentração da droga testada (apoptose recente: 25 μM = 4,8 %; 100 μM = 33,7 % e 150 μM = 61,1 %). Diferente do tratamento com a BAS-1, a BAS-4 não apresentou grande variação na taxa de apoptose tardia, apenas um pequeno aumento na maior concentração testada (apoptose tardia: 25 μM = 1 %; 100 μM = 1,9 % e 150 μM = 8,5 %). Neste experimento para todas as concentrações testadas a taxa de necrose foi inferior a 1 %.

O tratamento com a droga BAS-7 (Fig. 34, p. 59) a pesar de mostrar aumento na taxa de apoptose com 25 μM (apoptose recente: 10,2 % e apoptose tardia: 2,3 %), não demonstrou grande alteração com o aumento da concentração de tratamento (apoptose recente: 100 μM = 13,9 %; apoptose tardia: 100 μM = 3,5 %). Neste ensaio a taxa de necrose também se mostrou inferior a 1 % para todas as concentrações, o que em conformidade ao ensaio com JC-1, nos leva acreditar que o processo de morte causado pelo aumento da concentração de tratamento desta droga é por via apoptótica, no entanto ocorrendo em uma proporção bem menor que para as BAS-1 e BAS-4. Infelizmente, por problemas técnicos, não foi possível a análise para a concentração de 150 μM da BAS-7, o que poderia confirmar se a população anexina V-FITC positiva sofreria um grande aumento, como observado no tratamento com 150 μM da BAS-4, ou se tal aumento seria apenas discreto como previsto pelo ensaio de JC-1 para esta concentração em relação a 100 μM da mesma.

A literatura relata que em trabalho feito por Jing *et al.* (2010) com células de carcinoma ovariano OVCAR-8 e câncer de próstata PC3, que a isobavachalcona (BAS-7) na

concentração de 18 μM é capaz de induzir apoptose numa ordem de 67,37 % e 36,02 % respectivamente, após incubação por 72 h, uma taxa de apoptose bem mais elevada que a observada em nosso trabalho, porém vale resaltar que em nosso trabalho o tempo de incubação foi de apenas 24 h enquanto o destes autores foi de 72 h, podendo ser este fator um dos motivos para tal diferença tão marcante.

Estes mesmos autores mostram que a partir de 1 h de incubação das células OVCAR-8 com isobavachalcona (BAS-7), já foi possível observar aumento na produção de EROs. É sabido que muitos flavonoides podem apresentar efeito antioxidante, os quais resultam de uma combinação de suas propriedades quelantes de metais de transição e sequestrador de radicais livres, assim como inibição da ação de oxidases, ou também podem apresentar efeito pró-oxidante, os quais podem se manifestar pela redução temporal de Cu (II) a Cu (I), geração de EROs, assim como alteração dos componentes do sistema de defesa antioxidante: glutathiona e glutathiona-S transferase (TRUEBA, 2003). Em nosso trabalho não foi possível verificar se o tratamento com os flavonoides da *B. acutifolium* está aumentando a produção de EROs, no entanto com base nas evidências apresentadas por Jing *et al.* (2010), podemos pressupor que tal evento possa também contribuir para o processo de agregação celular observado em nosso modelo de estudo.

Jing *et al.* (2010) também mostraram que o tratamento das células OVCAR-8, com a isobavachalcona (BAS-7), promove ativação do processo de apoptose, visto pela redução na razão Bcl-2/Bax, aumento na ativação de caspase-3, caspase-9 e clivagem do PARP (Poli-(ADP-Ribose) polimerase). Em nosso trabalho não foi possível aferir a atividade destas proteínas, o que caso confirmado caracterizaria o processo de morte celular programada como do tipo I.

O mecanismo de ação proposto por Jing *et al.* (2010) para a atividade da isobavachalcona (BAS-7) no câncer, ocorre por inibição da atividade da serina/treonina cinase Akt, por interagir com o sítio de ligação para o ATP nesta enzima e atenuar a fosforilação na Ser-473. Sabe-se que a sinalização da via PI3-cinase/Akt tem papel pró-sobrevivência em muitos tipos de câncer e que esta pode ser negativamente regulada pelo gene supressor de tumor PTEN, o qual normalmente apresenta mutação ou perda em GBM (BRENNAN, 2011; IACOB *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2011), inclusive em células da linhagem C6, nas quais JACOBS *et al.* (2011) relatam baixa expressão desta molécula, o que como consequência promove uma maior atividade da via Akt.

Assim um mecanismo possível para a ação dos flavonoides da *B. acutifolium* em promover a indução de apoptose no GBM pode ser pela inativação da via da Akt, uma vez

que Jing *et al.* (2010) relatam como consequência da inibição da Akt por ação da isobavachalcona, diminuição na ativação de mTOR, 4E-BP1 e p70S6K. Sabe-se que a fosforilação dependente de mTOR, da p70 e 4E-BP1 é crítica para a formação de algumas proteínas do ciclo celular (YAN *et al.* 2006), como exemplo, a inibição de mTOR em hepatócitos induz retenção em G1 por inibir a expressão da ciclina D1, impedindo a formação do complexo D1/cdk4-6 e por consequência a fosforilação do Rb, assim impedindo o prosseguimento no ciclo celular (NELSEN *et al.*, 2003), o que poderia explicar o comportamento observado para o tratamento com 75 μ M da BAS-1, 50 μ M da BAS-4 e 75 μ M e 100 μ M da BAS-7 na análise de ciclo celular (Fig. 25, p. 50; fig.26, p. 51 e fig. 27, p. 52, respectivamente). No entanto neste mesmo ensaio observamos que concentrações mais elevadas, porém que não apresentaram grande valores de SubG0, como 75 μ M da BAS-4 e 150 μ M da BAS-7, tiveram como efeito aumento na população G2/M, com redução em S, esse efeito de aumento da população G2/M com uma concentração inferior a capaz de induzir grande elevação em SubG0 também é descrito por Hussain *et al.* (2010) em linhagens BC1, BC3, BCBL1 e HBL-6 (linfomas de células B não Hodgkin), tratados com o flavonoide apigenina. Segundo esses autores este flavonoide também foi capaz de promover com concentração mais elevada inibição da Akt, diminuindo a expressão da ciclina D1, aumentando a expressão de p27/Kip1 e diminuição da fosforilação do Rb, o que contribuiria para retenção em G1 e desta para a apoptose.

Vários trabalhos na literatura também reportam a ação de diferentes flavonoides tais como genisteína (KHAW *et al.*, 2012), jaceosidina (KHAN *et al.*, 2011; 2012) e oligômero pró-cianidina (ZHANG *et al.*, 2009), em promover retenção em G2/M em glioblastoma quando tratados com concentrações que promovem baixa atividade apoptótica, semelhante ao que observamos em nosso resultado.

Segundo Khan *et al.* (2011) o efeito do flavonoide jaceosidina em promover retenção em G2/M em glioblastoma U87, uma linhagem que apresenta p53 sem mutação, o que também é relatado para o GBM C6 (JACOBS *et al.*, 2011), é acompanhado de aumento na expressão desta proteína e da p21 (waf-1/cip-1), uma inibidora de CDK regulada por p53, a qual tem amplo espectro de especificidade no ciclo celular, podendo promover retenção no ponto de checagem G2/M por inibir o complexo ciclina B1-CDK1, sendo também observado por estes autores uma redução na expressão das proteínas deste complexo de forma tempo dependente. Estas evidências nos levam a supor que tal condição possa também estar acontecendo em nosso trabalho.

Uma vez demonstrado que as flavanas BAS-1, BAS-4 e em menor proporção a chalcona BAS-7 estavam promovendo processo de morte celular programada, foi nosso interesse investigar por microscopia eletrônica de transmissão as alterações ultraestruturais promovidas em tal tratamento (Fig. 35a e 35b, pp. 61 e 62). Nesse aspecto nenhuma grande alteração foi observada no tratamento com veículo contendo 0,3 % de DMSO (Fig. 35a, C-D, p. 61), mostrando aspecto celular fusiforme, núcleo e organelas, similar ao controle.

O tratamento com 75 μ M da BAS-1 por 24 h (Fig. 35a, E-F, p. 61) mostrou acentuada alteração na morfologia subcelular, apresentando desestruturação citoplasmática, com vacuolização, presença de uma figura formada por várias cisternas agrupadas apresentando lúmen expandido e inúmeras cisternas de retículo endoplasmático ocupando a maior porção do citoplasma, o que nos leva a acreditar que tal tratamento esteja promovendo estresse de retículo endoplasmático.

O tratamento com a droga BAS-4 tanto com 75 μ M quanto com 100 μ M (Fig. 35b, G-J, p. 62), mostrou grande quantidade de vacúolos de membrana dupla no citoplasma, os quais são descritos na literatura como típicos de vacúolos autofágicos (UEDA *et al.*, 2012). No tratamento com a BAS-1, também foi possível verificar a presença de vacúolos de membrana dupla, porém em número muito menor. Também foi possível verificar no tratamento com a BAS-4, a presença de figura de mielina no citoplasma, além de apresentar núcleo com superfície mais irregular com foco de cromatina mais condensada na superfície deste.

A análise do tratamento com a droga BAS-7 por microscopia eletrônica (Fig. 35b, K-L), mostrou a presença de vacúolos no citoplasma, porém estes não apresentavam presença de membrana dupla, apesar de possuir material celular em seu interior, além da presença de corpos elétricos densos no citoplasma.

Cheng *et al.* (2012) relatam que o processo autofágico pode em alguns casos estar relacionado com fenômenos pró-sobrevivência, enquanto em outros pode estar participando no fenômeno de morte, ainda segundo estes autores, em gliomas pode ocorrer concomitantemente tanto o fenômeno de apoptose quanto o processo de autofagia, e que a inibição de Akt, acompanhado na diminuição dos níveis de p-mTOR e p-S6K, os quais são regulados por esta cinase, promove indução da autofagia. Assim, nossos resultados sugerem que o processo de morte programada desencadeado pela flavana BAS-4 no GBM C6, envolve tanto apoptose (como mostrado pela análise de marcação com anexina V-FITC), quanto o fenômeno de autofagia (como observado na análise de microscopia eletrônica) e que o fato do mesmo fenômeno não ter sido observado na mesma intensidade para a BAS-1 e BAS-7, não exclui a possibilidade de que possa estar também ocorrendo para estas drogas.

6 CONCLUSÃO

Dos quatro flavonoides oriundos da *Brosimum acutifolium* testados neste trabalho, três apresentaram boa atividade contra o glioblastoma C6 *in vitro*, as flavanas (2S)-4'-hidroxi-7,8-(2'',2''-dimetilpirano)-flavana (BAS-1) e (2S)-7,4'-dihidroxi-8,(3,3-dimetilalil)-flavana (BAS-4), e a chalcona 4,2',4'-trihidroxi-3'-(3,3-dimetilalil)-chalcona (BAS-7). Apesar da similaridade estrutural entre as chalconas BAS-7 e BAS-6, esta última, uma 4,2'-dihidroxi-3',4'-(2'',2''-dimetilpirano)-chalcona, não demonstrou atividade citotóxica neste modelo experimental. As flavanas BAS-1 e BAS-4 mostraram ser mais potentes que a chalcona BAS-7. As drogas BAS-4 e BAS-7 mostraram grau de segurança, para células não neoplásicas, maior que a BAS-1, visto que esta na maior concentração testada foi capaz de apresentar citotoxicidade para a célula glial e um grau de hemólise relativamente acentuado. Estes três flavonoides foram efetivos em promover diminuição na capacidade migratória das células em cultura e diminuição na capacidade de formação de novas colônias após uma exposição prévia aos mesmos, além de promover parada no ciclo celular de forma dependente da concentração e indução de morte por apoptose no glioblastoma C6. A análise por microscopia eletrônica de transmissão mostrou marcantes alterações estruturais no tratamento do GBM com estes três flavonoides, sendo bem evidente no tratamento com a droga BAS-4, a presença de vacúolos autofágicos, indicativo de que o mecanismo de morte promovido por este flavonoide possa estar envolvendo tanto apoptose quanto autofagia. A partir do exposto podemos concluir que dos quatro flavonoides analisados neste trabalho, tanto a BAS-1, BAS-4 e BAS-7 apresentam potencial antineoplásico contra o GBM e que a flavana BAS-4 foi o que apresentou melhor resposta como alternativa de tratamento.

REFERÊNCIAS

- AALINKEEL, R.; BINDUKUMAR, B.; REYNOLDS, J. L.; SYKES, D. E.; MAHAJAN, S. D.; CHADHA, K. C.; SCHWARTZ, S. A. The Dietary Bioflavonoid, Quercetin, Selectively Induces Apoptosis of Prostate Cancer Cells by Down-Regulating the Expression of Heat Shock Protein 90. **Pubmed**. 68(16): 1773–1789, 2008.
- AGARWAL, S.; SANE R.; OBEROI, R.; OHLFEST, J. R.; ELMQUIST, W. F. Delivery of molecularly targeted therapy to malignant, a disease of the whole brain. **Expert reviews in molecular medicine**. 13(17): 2-17, 2011.
- ALBERT, A.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERT, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALFIERI, R.; BARBERIS, M.; CHIARADONNA, F.; GAGLIO, D.; MILANES, L.; VANONI, M.; KLIPP, E.; ALBERGHINA, L. Towards a systems biology approach to mammalian cell cycle: modeling the entrance into S phase of quiescent fibroblasts after serum stimulation. **BMC Bioinformatics**. 10(12): S16, 2009.
- ALMAWI, W. Y.; MELEMEDJIAN, O. K.; JAOUDE, M. M. A. On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**. 76: 7-14, 2004.
- ARYA, R.; MALLIK, M.; LAKHOTIA, S. C. Heat shock genes – integrating cell survival and death. **J. Biosci**. 32(3): 595-610, 2007.
- BLAGOSKLONNY, M. V.; PARDEE, A. B. The Restriction Point of the Cell Cycle. **Cell Cycle**. 1(2): 103-110, 2002.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**. 21(1): 167-223, 2001.
- BILIR, A.; ERGUVEN, M.; OKTEM, G.; OZDEMIR, A.; USLU, A.; AKTAS, E.; BONAVIDA, B. Potentiation of cytotoxicity by combination of imatinib and chlorimipramine in glioma. **International Journal Of Oncology**. 32: 829-839, 2008.
- BISHAYE, K.; GHOSH, S.; MUKHERJEE, A.; SADHUKHAN, R.; MONDAL, J.; KHUDA-BUKHSH A. R. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. **Cell Prolif**. 46: 153–163, 2013.
- BOUJRAD, H.; GUBIKINA, O.; ROBERT, N.; KRANTIC, S.; SUSIN, S. AIF-Mediated Programmed Necrosis, A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**. 6: 2612-2619, 2007.

- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. **Biochemistry (Moscow)**. 70(2): 284-293, 2005.
- BRENNAN, C. Genomic Profiles of Glioma. **Curr Neurol Neurosci Rep**. 11: 291-297, 2011.
- Brosimum acutifolium* – MERCÚRIO VEGETAL. Disponível em:< <http://www.plantamed.com.br/index.html>>. Acesso em: 20 julho de 2012.
- CAVALIERE, R.; WEN, P. Y.; SCHIFF, D. Novel Therapies for Malignant Gliomas. **Neurol Clin**. 25: 1141-1171, 2007.
- CHENG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; REN, X.; HUBER-KEENER, K. J.; LIU, X.; ZHOU, L.; LIAO, J.; KEIHACK, H.; YAN, L.; RUBIN, E.; YANG, J.-M. MK-2206, a novel allosteric inhibitor of Akt, synergizes with gefitinib against malignant glioma via modulating both autophagy and apoptosis. **Mol Cancer Ther**. 11(1): 154-164, 2012.
- CHOI, J. H.; RHO, M.-C.; LEE, S. W.; CHOI, J. N.; KIM, K.; SONG, G. Y.; KIM, Y. K. Bavachin and Isobavachalcone, Acyl-coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase Inhibitors from *Psoralea corylifolia*. **Arch Pharm Res**. 31(11): 1419-1423, 2008.
- CRUZ SILVA, M. M.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M.; CUSTÓDIO, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1464: 49-61, 2000.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3^a Ed. Wiley. p. 117, 2009.
- FERRO, D. Fitoterapia: conceitos clínicos. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- FOIJER, F.; RIELE, H. te. Check, Double Check. The G2 Barrier to Cancer. **Cell Cycle**. 5(8): 831-836, 2006.
- GROBBEN, B.; DEYN, P. P.D.; SLEGGERS, H. Rat glioma C6 as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell and Tissue Research**. 310: 257-270, 2002.
- HUSSAIN, A. R.; KHAN, A. S.; AHMED, S. O.; AHMED, M.; PLATANIAS, L. C.; AL-KURAYA, K. S.; UDDIN, S. Apigenin induces apoptosis via downregulation of S-phase kinase-associated protein 2-mediated induction of p27Kip1 in primary effusion lymphoma cells. **Cell Prolif**. 43: 170-183, 2010.
- HWANG, D. W.; KO, H. Y.; LEE, J. H.; KANG, H.; RYU, S. H.; SONG, I. C.; LEE, D. S.; KIM, S. A Nucleolin-Targeted Multimodal Nanoparticle Imaging Probe for Tracking Cancer Cells Using an Aptamer. **The Journal of Nuclear Medicine**. 51(1): 98-105, 2010.

- IACOB, G.; DINCA, E. B.; DAVILA, C. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. **Journal of Medicine and Life**. 2(4): 386-393, 2009.
- INCA. **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
- JACOBS, V. L.; VALDES, P. A.; HICKEY, W. F.; DE LEO, J. A. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. **ASN NEURO**. 3(3): 171-181, 2011.
- JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii Trécul* (Moraceae). **Acta botânica brasileira**. 21(3): 575-597, 2007.
- JING, H.; ZHOU, X.; DONG, X.; CAO, J.; ZHU, H.; LOU, J.; HU, Y.; HE, Q.; YANG, B. Abrogation of Akt signaling by Isobavachalcone contributes to its anti-proliferative effects towards human cancer cells. **Cancer Letters**. 294: 167–177, 2010.
- JOHNSON, J.; MAHER, P.; HANNEKEN, A. The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects on Nrf2 activation and phase II gene expression. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 50(5): 2398–2406, 2009.
- JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução a Taxonomia Vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1976.
- KALDIS, P.; ALEEM, E. Cell Cycle Sibling Rivalry. Cdc2 versus Cdk2. **Cell Cycle**. 4 (11): 1491-1494, 2005.
- KANDIL, E.; TSUMAGARI, K.; MA, J.; ELMAGEED, Z. Y. A.; LI, X.; SLAKEY, D.; MONDAL, D.; ABDEL-MAGEED, A. B. Synergistic inhibition of thyroid cancer by suppressing MAPK/PI3K/AKT pathways. **Journal of Surgical Research**. XXX: 1 – 9, 2013.
- KANG, H. -K.; ECKLUND, D.; LIU, M.; DATTA, S. K. Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoid, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. **Arthritis Research & Therapy**. 11(2), 2009.
- KANU, O. O.; HUGHES, B.; DI, C.; LIN, N.; FU J.; BIGNER, D. D.; YAN, H.; ADAMSON C. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. **Clinical Medicine: Oncology**. 3: 39–52, 2009.
- KARMAKAR, S; DAVIS, K. A.; CHOUDHURY, S. R.; DEECONDA, A.; BANIK, N. L.; RAY, S. K. Bcl-2 inhibitor and apigenin worked synergistically in human malignant neuroblastoma cell lines and increased apoptosis with activation of extrinsic and intrinsic pathways. **Biochem Biophys Res Commun**. 388(4): 705–710, 2009.

- KESARI, S. Understanding Glioblastoma Tumor Biology: The Potential to Improve Current Diagnosis and Treatments. **Seminars in Oncology**. 38(6): suppl 4, pp. S2-S10, 2011.
- KHAN, M.; RASUL, A.; YI, F.; ZHONG, L.; MA, T. Jaceosidin Induces p53-dependent G2/M Phase Arrest in U87 Glioblastoma Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 12: 3235-3238, 2011.
- KHAN, M.; YU, B.; RASUL, A.; AL SHAWI, A.; YI, F.; YANG, H.; MA, T. Jaceosidin Induces Apoptosis in U87 Glioblastoma Cells through G2/M Phase Arrest. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012: 1-12, 2012.
- KHARAZIHA, P.; RODRIGUEZ, P.; LI, Q.; RUNDQVIST, H.; BJÖRKLUND, A.-C.; AUGSTEN, M.; ULLÉN, A.; EGEVAD, L.; WIKLUND, P.; NILSSON, S.; KROEMER, G.; GRANDER, D.; PANARETAKIS, T. Targeting of distinct signaling cascades and cancer-associated fibroblasts define the efficacy of Sorafenib against prostate cancer cells. **Cell Death and Disease**. 3, e262: 1-10, 2013.
- KHAW, A. K.; YONG, J. W. Y.; KALTHUR, G.; HANDE, M. P. Genistein Induces Growth Arrest and Suppresses Telomerase Activity in Brain Tumor Cells. **GENES, CHROMOSOMES & CANCER**. 51: 961–974, 2012.
- KIM, B. W.; LEE, E. R.; MIN, H. M.; JEONG, H. S.; AHN, J. Y.; KIM, J. H.; CHOI, H. Y. Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition. **Cancer Biology & Therapy**. 7(7): 1080-1089, 2008.
- KUETE, V.; NGAMENI, B.; TANGMOUO, J. G.; BOLLA, J.-M.; ALIBERT-FRANCO, S.; NGADJUI, B. T.; PAGÈS, J.-M. Efflux Pumps Are Involved in the Defense of Gram-Negative Bacteria against the Natural Products Isobavachalcone and Diospyrone. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. 54(5): 1749–1752, 2010.
- LEE, D.-H.; PARK, K.-I.; PARK, H.-S.; KANG, S.-R.; NAGAPPAN, A.; KIM, J.; KIM E.-H.; LEE, W.-S.; HAH, Y.-S.; CHUNG, H.-J.; AN, S.-J.; KIM, G.-S. Flavonoids Isolated from Korea *Citrus aurantium* L. Induce G2/M Phase Arrest and Apoptosis in Human Gastric Cancer AGS Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012: 1-11, 2012.
- LEE, S. K.; KIM, E. Y.; JEON, K.; CHO, S. G.; HAN, Y. J.; YANG, B. C.; LEE, S. S.; KO, M. S.; RIU, K. J.; LEE, H. T.; PARK, S. P. 3,4-Dihydroxyflavone Acts as an Antioxidant and Antiapoptotic Agent to Support Bovine Embryo Development *In Vitro*. **Journal of Reproduction and Development**. 57(1): 2011.
- LEITE, J. P. V. **Fitoterapia**: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009.

- LEÓN H., W. J. Estudio anatómico de la madera de cinco especies del género *Brosimum* Sw. (Moraceae) que crecen em Venezuela. **Revista Florestal Venezuelana**. 49(2): 163-173, 2005.
- LIM, S. K.; LLAGUNO, S. R. A.; McKAY, R. M.; PARADA, L. F. Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. **BMB reports**. 44(3): 158-164, 2011.
- LIU, W.-T.; LIN, C.-H.; HSIAO, M.; GEAN P.-W. Minocycline inhibits the growth of glioma by inducing autophagy. **Autophagy**. 7:2: 166-175, 2011.
- MATSUDA, H.; KIYOHARA, S.; SUGIMOTO, S.; ANDO, S.; NAKAMURA, S.; YOSHIKAWA, M. Bioactive Constituents from Chinese Natural Medicines. XXXIII. Inhibitors from the Seeds of *Psoralea corylifolia* on Production of Nitric Oxide in Lipopolysaccharide-Activated Macrophages. **Biol. Pharm. Bull.** 32(1): 147-149, 2009.
- MATSUO, M.; SASAKI, N.; SAGA, K.; KANEKO T. Cytotoxicity of Flavonoids toward Cultured Normal Human Cells. **Biol. Pharm. Bull.** 28(2): 253-259, 2005.
- MCCARTHY, B. J; SCHELLINGER, K. A.; PROPP, J. M.; KRUCHKO, C.; MALMER, B. A Case for the Worldwide Collection of Primary Benign Brain Tumors. **Neuroepidemiology**. 33: 268–275, 2009.
- MICHAUD-LEVESQUE, J.; BOUSQUET-GAGNON, N.; BÉLIVEAU R. Quercetin abrogates IL-6/STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. **EXPERIMENTAL CELL RESEARCH**. 318: 925 – 935, 2012
- MORETTI, C.; GAILLARD, Y.; GRENAND, P.; BÉVALOT, F.; PRÉVOSTO, J.-M. Identification of 5-hydroxy-tryptamine (bufotenine) in *takini* (*Brosimum acutifolium* Huber subsp. *acutifolium* C.C. Berg, Moraceae), a shamanic potion used in the Guiana Plateau. **Journal of Ethnopharmacology**. 106: 198-202, 2006.
- NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer. Disponível em:< <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>. Acesso em: 20 julho de 2012.
- NELSEN, C. J.; RICKHEIM, D. G.; TUCKER, M. M.; HANSEN, L. K.; ALBRECHT, J. H. Evidence That Cyclin D1 Mediates Both Growth and Proliferation Downstream of TOR in Hepatocytes. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. 278(6): 3656–3663, 2003.
- NI, F.; GONG, Y.; LI, L.; ABDOLMALEKY, H. M.; ZHOU, J.-R. Flavonoid Ampelopsin Inhibits the Growth and Metastasis of Prostate Cancer In Vitro and In Mice. **PLoS ONE**. 7(6): 1-9, 2012.

- NIETO-SAMPEDRO, M.; VALLE-ARGOS, B.; GÓMEZ-NICOLA, D.; ALFONSO FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A.; NIETO-DÍAZ, M. Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System. **Clinical Medicine Insights: Oncology**. 5: 265–314, 2011.
- NISHIMURA, R.; TABATA, K.; ARAKAWA, M.; ITO, Y.; KIMURA, Y.; AKIHISA, T.; NAGAI, H.; SAKUMA, A.; KOHNO, H.; SUZUKI, T. Isobavachalcone, a Chalcone Constituent of *Angelica keiskei*, Induces Apoptosis in Neuroblastoma. **Biol. Pharm. Bull.** 30(10): 1878-1883, 2007.
- OHNO, O.; WATABE, T.; NAKAMURA, K.; KAWAGOSHI, M.; UOTSU, N.; CHIBA, T.; YAMADA, M.; YAMAGUCHI, K.; YAMADA, K.; MIYAMOTO, K.; UEMURA, D. Inhibitory Effects of Bakuchiol, Bavachin, and Isobavachalcone Isolated from *Piper longum* on Melanin Production in B16 Mouse Melanoma Cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 74 (7): 1504–1506, 2010.
- OVERMEYER, J. H.; M YOUNG, A. M.; BHANOT, H.; MALTESE, W. A. A chalcone-related small molecule that induces methuosis, a novel form of non-apoptotic cell death, in glioblastoma cells. **Molecular Cancer**. 10(69): 1-17, 2011.
- PREUSSER, M.; DE RIBAUPIERRE, S.; WÖHRER, A.; ERRIDGE, S. C.; HEGI, M.; WELLER, M.; STUPP, R. Current Concepts and Management of Glioblastoma. **ANN NEUROL.** 70: 9–21, 2011.
- PRIYADARSINI R. V.; MURUGAN R. S.; MAITREYI S.; RAMALINGAM K; KARUNAGARAN D.; NAGINI S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated 3 apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and 4 NF- κ B inhibition. **Molecular and Cellular Pharmacology**. 2010.
- RADOMSKI, M. I. Plantas Mediciniais – Tradição e Ciência. In: I SEMANA DO ESTUDANTE UNIVERSITÁRIO. **FLORESTA E MEIO AMBIENTE**, Embrapa, Colombo, 2003.
- RICH, J. N.; EYLER, C. E. Cancer stem cells in brain tumor biology. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. 73: 411–420, 2008.
- SCHNEIDER, T.; MAWRIN, C.; SCHERLACH, C.; SKALEJ, M.; FIRSCHING, R. Gliomas in Adults. **Deutsches Ärzteblatt International**. 107(45): 799–808, 2010.
- SCHUTTERS, K.; REUTELINGSPERGER, C. Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases. **Apoptosis**. 15: 1072–1082, 2010.

- SHIN, H.-J.; SHON, D.-H.; YOUN, H.-S. Isobavachalcone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase induced by Toll-like receptor agonists. **International Immunopharmacology**. 15: 38–41, 2013.
- SILVA, M.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 55(1), 2011.
- SZLISZKA, E.; CZUBA, Z. P.; MAZUR, B.; SEDEK, L.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Chalcones Enhance TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. **Int. J. Mol. Sci**. 11: 1-13, 2010.
- TAKASHIMA, J.; ASANO, S.; OHSAKI, A. Mururins A-C, three New Lignoids from *Brosimum acutifolium* and their Protein Kinase Inhibitory Activity. **Planta Med**. 68: 621-625, 2002.
- TAKASHIMA, J.; KOMLYAMA, K.; ISHLYAMA, H.; KOBAYASHI, J.; OHSAKI, A. Brosimacutins J – M, Four New Flavonoids from *Brosimum acutifolium* and their Cytotoxic Activity. **Planta Med**. 71: 654-658, 2005.
- TAMAMURI - *Brosimum acutifolium*. Disponível em: < <http://rainforest-database.com/plants/tamamuri.htm>>. Acesso em: 20 julho de 2012.
- TANABE, K.; KOZAWA, O.; IIDA, H. Midazolam suppresses interleukin-1b-induced interleukin-6 release from rat glial cells. **Journal of Neuroinflammation**. 8(68): 2-8, 2011.
- THOMAS, C. M.; WOOD, R. C. III; WYATT, J. E.; PENDLETON, M. H.; TORRENEGRA, R. D.; RODRIGUEZ, O. E.; HARIRFOROOSH, S.; BALLESTER, M.; LIGHTNER, J.; KRISHNAN, K.; RAMSAUER, P. V. Anti-Neoplastic Activity of Two Flavone Isomers Derived from *Gnaphalium elegans* and *Achyrocline bogotensis*. **PLoS ONE**. 7(6), 2012.
- TIM MOSMANN. Methods. **Journal of Immunological Methods**. 65: 55-63, 1983.
- TORRES, S. L. **Flavonóides de *Brosimum acutifolium* (Moraceae)**. 1998. 128f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, Belém. 1998.
- TORRES, S. L.; ARRUDA, M. S. P.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; SILVA, S. C. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**. 53: 1047-1050, 2000.
- TORRES, S. L.; MONTEIRO, J. C. M.; ARRUDA, M. S. P.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Two Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**. 44(2): 347-349, 1997.

- TRUEBA, G. P. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. **Rev. Cubana Invest. Biomed.** 22 (1): 48-57, 2003.
- UEDA, Y.; WEI, F.-Y.; HIDE, T.-i.; MICHIEUE, H.; TAKAYAMA, K.; KAITSUKA, T.; NAKAMURA, H.; MAKINO, K.; KURATSU, J.-i.; FUTAKI, S.; TOMIZAWA, K. Induction of autophagic cell death of glioma-initiating cells by cell-penetrating D-isomer peptides consisting of Pas and the p53 C-terminus. **Biomaterials.** 33: 9061-9069, 2012.
- VAN MEIR, E. G.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D.; SHU, H. K.; WEN, P. Y.; OLSON, J. J. Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to Cure for Malignant Glioma. **CA Cancer J Clin.** 60(3): 166-193, 2010.
- VESCOVI, A. L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B. A. Brain Tumour stem cells. **Nature Reviews Cancer.** 6: 425-436, 2006.
- WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer.** 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- XIN, D.; WANG, H.; YANG, J.; SU, Y.-F.; FAN, G.-W.; WANG, Y.-F.; ZHU, Y.; GAO X.-M. Phytoestrogens from *Psoralea corylifolia* reveal estrogen receptor-subtype selectivity. **Phytomedicine.** 17: 126–131, 2010.
- YAN, H.; FROST, P.; SHI, Y.; HOANG, B.; SHARMA, S.; FISHER, M.; GERA, J.; LICHTENSTEIN, A. Mechanism by Which Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors Sensitize Multiple Myeloma Cells to Dexamethasone-Induced Apoptosis. **Cancer Res.** 66(4), 2006.
- YANAE, M.; TSUBAKI, M.; SATOU, T.; ITOH, T.; IMANO, M.; YAMAZOE, Y.; NISHIDA S. Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.** 30(74), 2011.
- ZHANG, F.-J.; YANG, J.-Y.; MOU, Y.-H.; SUN, B.-S.; PING, Y.-F.; WANG, J.-M.; BIAN, X.-W.; WU, C.-F. Inhibition of U-87 human glioblastoma cell proliferation and formyl peptide receptor function by oligomer procyanidins (F2) isolated from grape seeds. **Chemico-Biological Interactions.** 179: 419–429, 2009.
- ZHAO, J.; DING, H.-X., ZHAO, D.-G.; WANG C.-M.; GAO K. Isolation, modification and cytotoxic evaluation of flavonoids from *Rhododendron hainanense*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** 64: 1785–1792, 2012.
- ZHAO, M.; MA, J.; ZHU, H.-Y.; ZHANG, X.-H.; DU, Z.-Y.; XU, Y.-J.; YU, X.-D. Apigenin inhibits proliferation and induces apoptosis in human multiple myeloma cells through targeting the trinity of CK2, Cdc37 and Hsp90. **Molecular Cancer.** 10(104), 2011.