

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

YOLLANDA E. MOREIRA FRANCO

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO
FLAVONOIDE LUTEOLINA EXTRAÍDO DA ESPÉCIE VEGETAL
Arrabidaea brachypoda (DC.) Bureau (SINONÍMIA BOTÂNICA:
Fridericia platyphylla)**

Bragança Paulista
2018

YOLLANDA E. MOREIRA FRANCO– RA. 001201503941

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO
FLAVONOIDE LUTEOLINA EXTRAÍDO DA ESPÉCIE VEGETAL
Arrabidaea brachypoda (DC.) Bureau (SINONÍMIA BOTÂNICA:
Fridericia platyphylla)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Biologia Molecular e Celular

Orientadora: Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato

Co- orientadora: Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho

Bragança Paulista

2018

QU 220 Franco, Yollanda E. Moreira.
F897e Estudo *in vitro* da atividade antiproliferativa do flavonoide luteolina extraído da espécie vegetal *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (Sinonímia botânica: *Fridericia platyphylla*) I Yollanda E. Moreira Franco. – Bragança Paulista, 2018. 78 p.

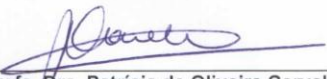
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Giovanna Barbarini Longato.

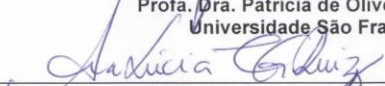
Co-Orientação: Patrícia de Oliveira Carvalho

1.Neoplasias. 2. Flavonoides. 3. In vitro. 4. MTT.
5. Atividade antiproliferativa. 6. Ensaio da migração celular.
6. Ensaio de formação de colônias em Soft Agar. Longato, Giovanna Barbarini. II. Carvalho, Patrícia de Oliveira.
III.Título.

FRANCO, Yollanda. E. M. "Estudo *in vitro* da atividade antiproliferativa do flavonoide luteolina extraído da espécie vegetal *Arrabidaea brachypoda* (DC.) bureau (sinonímia botânica: *Fridericia platyphylla*)". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 02 de Fevereiro de 2018 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Prof. Dra. Ana Lúcia Pasca Gois Ruiz
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dra. Denise Gonçalves Priolli
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho às minhas duas
queridas e amadas avós Eduvirges
Maria Moreira e Ivone de Souza
Franco.

AGRADECIMENTOS

Deus, que me concedeu o dom da vida, que me acompanha, ilumina meus dias e me dá forças para tentar ser uma pessoa melhor.

Meus pais Jose Reinaldo e Irenilda, meus irmãos Arthur, Sarah e Isabella e ao meu querido e amado sobrinho Victor! Mesmo com a distância me fazem sentir amada e feliz por fazer parte desta família, vocês são para mim, a razão da palavra amor!

Meus amigos “bragantinos” que fizeram do meu dia-a-dia nesta cidade muito mais feliz, em especial Dita, Sarah, Gui e Gri! Obrigada por tudo! E não, não vou embora ainda, vocês terão que me aguentar por mais tempo!

Meus amigos de infância que até hoje estão comigo me apoiando e torcendo por mim, obrigada pela amizade e companheirismo Let, Mai, Jaque, Daya, Ana’s James e João Ricardo.

Meu namorado Thomas! Obrigada pelo amor, carinho, compreensão e incentivo.

Profa. Dra. Patrícia, que foi minha orientadora desde o primeiro ano de iniciação científica e primeiro semestre da faculdade e hoje é minha co-orientadora! Tenho certeza que não foi fácil me aguentar tantos anos, obrigada por me ajudar tanto, confiar e não desistir de mim.

Não poderia deixar de falar da minha querida orientadora, Profa. Dra. Giovanna, ou Gil! Tudo que acontece nas nossas vidas tem sempre um porquê e eu tenho certeza que não nos conhecemos por acaso! Tenho orgulho de ser sua primeira aluna de mestrado, espero ter sido uma boa aluna para você como você foi minha orientadora. Agradeço acima de tudo a amizade e o companheirismo adquiridos durante esse período. A você fica minha eterna gratidão, carinho e respeito.

Profa. Dra. Denise, a “mãezona” do laboratório!! Obrigada por estar comigo todos estes anos, principalmente no mestrado, me ajudando, penteando meu cabelo (sempre atrapalhado, né?!), dando aquele abraço nos momentos de tensão! Você é uma pessoa iluminada que veio ao mundo para fazer a diferença e tenha certeza que na minha vida e na de muitas outras pessoas, você faz! Obrigada.

Aos queridos amigos do laboratório Laís, Gian, Dona Alice, Maria Elisa e principalmente Marcinha e Thais Cavenatti! Obrigada pelo companheirismo e pelas boas gargalhadas no laboratório, vocês deixam minha vida mais alegre!

As meninas da “turma da Gi”, Carol, Ângela, Evillin, Mayra e Luani, pelas risadas, pela companhia e principalmente por aturarem meus TOC’s.

Gostaria de agradecer também, o Dr. Rui Reis pela oportunidade de ter realizado parte do meu projeto de mestrado no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos, onde tive a oportunidade de trabalhar com pessoas incríveis, especialmente Vivi, Marcela, Carla, Aninha, Gabriel, Karina, Paulinha, Fer e Muzi!! Vocês são muito queridos, aprendi muito com vocês e tenho saudade dos momentos que passamos juntos, levo vocês em meu coração. Muito obrigada!

Sem mais, agradeço ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco e a FAPESP (2016/0234-3) pela bolsa concedida.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”*

Ricardo Reis
Heterônimo: Fernando Pessoa

RESUMO

O câncer continua sendo um problema de saúde pública mundial, representando a segunda causa de morte da população tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de células instáveis que tendem a não responder aos estímulos internos e externos que controlam a proliferação, diferenciação e morte celular. A elevada morbidade desta doença tem requerido a descoberta cada vez mais urgente de novas drogas anticâncer, as quais possam atuar mais seletivamente sobre os mecanismos de morte celular. Desde os tempos remotos, as plantas aparecem como potenciais fármacos na quimioterapia e, neste âmbito, os flavonoides constituem uma ampla classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico, envolvidos tanto na prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegeneração como no tratamento de tumores. Considerando tais aspectos, o presente trabalho avaliou primeiramente a atividade antiproliferativa de 21 produtos naturais (extratos brutos, frações e compostos) isolados de espécies vegetais frente ao painel de linhagens tumorais humanas representativas de diversos órgãos (cérebro, mama, ovário, pulmão, rim, próstata, colon) e linhagem não tumoral (queratinócito humano) com avaliação final pelo método de MTT. A amostra que apresentou melhor atividade antiproliferativa, isto é, menor valor de GI_{50} (concentração mínima de amostra que inibe 50% do crescimento celular), foi escolhida para dar prosseguimento no estudo *in vitro* de atividade anticâncer. Esta amostra foi o flavonoide luteolina, que foi avaliado no ensaio de Migração celular (*Scratch wound healing assay*) para investigar a capacidade do composto em inibir a migração celular e no ensaio de formação de colônias em *Soft Agar* (Clonogenic assay) que avaliou a capacidade do composto em inibir a replicação celular. Além disso, foram avaliados parâmetros de indução de morte celular e de ciclo celular através de citometria de fluxo e de *Western Blotting*. A luteolina apresentou atividade antiproliferativa eficaz para todas as linhagens tumorais avaliadas, com valores baixos de GI_{50} , sendo a U251 (glioblastoma) uma das linhagens mais sensíveis ao tratamento ($GI_{50} = 2,60\mu\text{g/mL} / 10\mu\text{M}$). Este composto foi capaz de inibir a migração de células U251, sendo que ao final de 48h apenas 27% da largura da ranhura havia sido fechada (versus 95% do controle). Além disso, a luteolina reduziu em 82% o número de colônias formadas em comparação ao controle. Por meio destes resultados foi possível inferir que a luteolina atuou sobre os mecanismos de migração e replicação celular em U251, confirmando assim a atividade antiproliferativa observada previamente pelo método MTT. Os parâmetros avaliados sugerem que, na concentração utilizada, o composto foi capaz de induzir dano ao DNA através da fosforilação de histona H2AX, clivagem de PARP, aumento da fosforilação de ERK e despolarização da membrana mitocondrial, culminando em morte celular por apoptose, mas não foi capaz de induzir uma parada do ciclo celular. Por meio deste estudo foi possível confirmar a atividade antiproliferativa da luteolina sobre a linhagem de glioblastoma U251. Os resultados aqui apresentados estimulam a continuação dos estudos de atividade anticâncer deste composto.

Palavras-chave: *câncer, flavonoides, atividade antiproliferativa, in vitro, MTT, ensaio de migração celular, ensaio de formação de colônias em Soft Agar.*

ABSTRACT

Cancer remains a worldwide public health problem, accounting for the second leading cause of death in both developed and developing countries. It is characterized by the development of unstable cells that tend not to respond to internal and external stimuli that control proliferation, differentiation, and cell death. The high morbidity has required the increasingly urgent discovery of new anticancer drugs, which can act more selectively on the mechanisms of cell death. From the earliest times, plants appear as potential drugs in chemotherapy and, in this context, flavonoids constitute a broad class of natural compounds of considerable scientific and therapeutic interest, involved both in the prevention of cardiovascular diseases and neurodegeneration as well as in the treatment of tumors. Considering these aspects, the present work evaluated the antiproliferative activity of 21 natural products (crude extracts, fractions and compounds) isolated from plant species on the panel of human tumor cell lines representative of several organs (brain, breast, ovary, lung, kidney, prostate, colon) and non-tumoral cell line (human keratinocyte) with final evaluation by the MTT method. Samples that presented better antiproliferative activity and lower GI₅₀ (minimum concentration that inhibits 50% of cell growth) were chosen to continue the *in vitro* study of anticancer activity. This sample was the flavonoid luteolin, which was evaluated through the Scratch wound healing assay to investigate the compound ability of inhibit migration, and through the Clonogenic assay, that evaluated the compound ability of inhibit cell replication. In addition, cell death and cell cycle induction parameters were assessed by flow cytometry and Western blotting. Luteolin was effective for all the evaluated strains, presenting low values of GI₅₀, being U251 (glioblastoma) one of the most sensitive strains to treatment (GI₅₀ = 2.60 µg/mL / 10 µM). This compound was able to inhibit the migration of U251 cells, and at the end of 48h only 27% of the slot width had been closed (versus 95% of the control). In addition, luteolin reduced the number of colonies formed by 82% in comparison to control. By means of these results it was possible to infer that luteolin acted on the mechanisms of cell migration and replication in U251, thus confirming the antiproliferative activity previously observed by the MTT method. The evaluated parameters suggest that in the concentration used, the compound was able to induce DNA damage through histone H2AX phosphorylation, PARP cleavage, increased ERK phosphorylation and mitochondrial membrane depolarization, culminating in apoptosis cell death, but it was not capable of inducing a cell cycle arrest. Through the study it was possible to confirm the antiproliferative activity of luteolin on U251 (glioblastoma) cell line. The results presented here stimulate the continuation of anticancer activity studies of this compound.

Key words: *cancer, flavonoids, antiproliferative activity, in vitro, MTT, scratch wound healing assay, clonogenic assay.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-amino-actinomicina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	Albumina do Soro Bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECL	Eletroquimioluminescência
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGRF	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCA	Ensaio de Formação de Colônias
GBM	Glioblastoma Multiforme
GI ₅₀	Concentração mínima necessária para inibir o crescimento em 50% (<i>minimum concentration that inhibits 50% of cell growth</i>)
H2AX	Histona 2AX
IDH	Isocitrato Desidrogenase
INCA	Instituto Nacional de Câncer “José Alencar Gomes da Silva”
IS	Índice de Seletividade
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MGMT	O6-Metilguanina-DNA Metiltransferase
MMP	Potencial de Membrana Mitocondrial
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Tetrazólio

Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sódio (ativado)
NaCl	Cloreto de Sódio
NCI	Instituto Nacional do Câncer (<i>National Cancer Institute</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PS	Fosfatidilserina
P/S	Penicilina/Estreptomicina
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PI	Iodeto de Propídio
PSMF	<i>Protein-Sparing Modified Fast</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TBST	Salina tris-tamponada com Tween
TMZ	Temozolamida

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Classificação dos gliomas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).	19
TABELA 2:	Descrição da atividade anticâncer da luteolina em linhagens tumorais de glioblastoma humano.	27
TABELA 3:	Amostras avaliadas em ensaio antiproliferativo.	30
TABELA 4:	Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i> .	32
TABELA 5:	Relação de anticorpos primários utilizados nos ensaios de <i>Western Blotting</i> .	42
TABELA 6:	Valores de GI ₅₀ das amostras, após 48 horas de incubação, expressos em µg/ mL.	44
TABELA 7:	Valores de GI ₅₀ do flavonoide luteolina, após 48 horas de incubação, expressos em µM.	45
TABELA 8:	Valores de GI ₅₀ para luteolina e TMZ na linhagem U251 após 24, 48 e 72 horas de exposição. Valores expressos em µM.	52
TABELA 9:	Índice de seletividade (IS) para luteolina e quimioterápico TMZ	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Alterações fisiológicas que caracterizam o câncer	18
FIGURA 2:	Diferenciação de células normais do SNC e início da formação tumoral.	20
FIGURA 3:	Flor da <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bureau (sinonímia botânica: <i>Fridericia platyphylla</i>).	25
FIGURA 4:	Fórmula estrutural da luteolina.	28
FIGURA 5:	Esquema representativo das marcações realizadas nas placas (1), das ranhuras (2) e dos campos fotografados (3) no experimento.	37
FIGURA 6:	Atividade antiproliferativa da luteolina.	46
FIGURA 7:	Fechamento de ranhura (%) em linhagem U251 ao longo do tempo de tratamento (24 e 48 horas).	47
FIGURA 8:	Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com controle DMSO (A) e 10 μ M de luteolina (B) no processo de migração de células U251 após 48 horas.	47
FIGURA 9:	Número de colônias U251 formadas.	48
FIGURA 10:	Fotografias dos poços celulares contendo linhagem U251.	49
FIGURA 11:	Morfologia da linhagem U251 tratada em diferentes concentrações (10, 20 e 40 μ M de) luteolina após 24 (A) e 48 (B) horas de tratamento comparadas com o controle DMSO.	50
FIGURA 12:	Crescimento celular (%) da linhagem U251, comparando o tratamento com a luteolina e o quimioterápico TMZ nos tempos 24, 48 e 72 horas.	51
FIGURA 13:	Crescimento celular (%) da linhagem NHA (não tumoral) e U251 (tumoral) comparando o tratamento com a luteolina e o quimioterápico TMZ em 48 horas de tratamento.	52
FIGURA 14:	Número de células U251 (%) em diferentes fases do ciclo celular: SubG0, G0/G1, S e G2/M.	54
FIGURA 15:	Número de células U251 (%) em diferentes estágios do ciclo celular: SubG0, G0/G1, S e G2/M.	55
FIGURA 16:	Porcentagem de células U251 em diferentes estágios de morte celular.	56
FIGURA 17:	Número de células U251 (%) em diferentes estágios de morte celular.	57

FIGURA 18:	Número de células U251 (%) despolarizadas e polarizadas.	58
FIGURA 19:	Número de células U251 (%) despolarizadas e polarizadas após tratamento com luteolina comparadas ao controle DMSO.	58
FIGURA 20:	Efeito da luteolina e do quimioterápico TMZ na modulação da expressão das proteínas cleaved-PARP, ERK, p-ERK, p-H2AX e cleaved-Caspase 9 analisadas por <i>Western blotting</i> na linhagem U251.	59
FIGURA 21:	Níveis de expressão da atividade das proteínas cleaved-PARP, ERK, p-ERK, p-H2AX e cleaved-Caspase 9.	60
FIGURA 22:	Diagrama proposto para o mecanismo de ação da luteolina na linhagem U251 (glioblastoma).	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Gliomas	18
1.1.1	Glioblastomas	20
1.2	Processos de morte celular	22
1.3	Compostos naturais e câncer	24
1.3.1	<i>Arrabidaea brachypoda</i> (sinonímia botânica: <i>Fridericia platyphylla</i>)	25
1.3.2	Flavonoides e atividade anticâncer	26
1.3.2.1	Luteolina	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAIS E METODOS	30
3.1	Obtenção das amostras	30
3.2	Cultivo celular	31
3.2.1	Linhagens celulares	31
3.2.2	Descongelamento e congelamento celular	33
3.3	Ensaio de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	33
3.4	Avaliação da atividade antiproliferativa do flavonoide luteolina em linhagem tumoral de glioblastoma (U251)	35
3.4.1	Determinação do índice de seletividade	36
3.4.2	Ensaio de migração celular (<i>Scratch wound healing assay</i>)	36
3.4.3	Ensaio de formação de colônias em <i>Soft Agar (Clonogenic assay)</i>	38
3.5	Análise por citometria de fluxo	38
3.5.1	Análise do ciclo celular	39
3.5.2	Quantificação de células com exposição de resíduos de fosfatidilserina	40
3.5.3	Avaliação da perda do potencial de membrana mitocondrial (MMP)	40
3.6	<i>Western Blotting</i>	41
3.7	Análise estatística	43
4	RESULTADOS	44
5	DISCUSSÃO	61

6	CONCLUSÃO	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

Câncer é a denominação dada a um grupo de mais de 200 patologias que apresentam crescimento celular descontrolado e que podem invadir órgãos e tecidos, migrando para outras partes do corpo (INCA, 2017). É considerada uma doença multifatorial, heterogênea e está entre os grandes motivos de mortalidade mundial (SIEGEL et al., 2013). O INCA estima para o Brasil, no biênio 2016-2017, a incidência de cerca de 600 mil novos casos de câncer, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. Segundo a OMS, acredita-se que até 2030 surgirão mais de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de óbitos por câncer no mundo, em virtude do envelhecimento e do crescimento populacional (INCA, 2017).

As mais importantes causas da carcinogênese, processo de desenvolvimento do câncer, são os danos ou lesões causadas às proteínas e ao DNA, que podem ocorrer através de complexos e múltiplos passos. Como resultados surgem alterações nas estruturas celulares levando a um descontrole dos processos de divisão e morte celular (SUTANDYO, 2010). As causas do câncer são variadas, podendo ser hereditárias ou ambientais, estando geralmente inter-relacionadas. As causas ambientais envolvem a exposição do organismo a agentes carcinogênicos os quais são indutores e/ou promotores do processo de carcinogênese. Esses agentes podem ser classificados em químicos, físicos e biológicos. As causas hereditárias ou internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de reparar as agressões externas (WEINBERG, 2008; FREIRE; ALVES, 2015).

As alterações fisiológicas (FIGURA 1) que caracterizam o câncer são autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Além disso, alterações podem levar a instabilidades genômicas, que geram a diversidade genética e aceleram o processo de transformação celular; além de inflamação, reprogramação do metabolismo energético e evasão do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Outro ponto muito importante é a complexidade do microambiente tumoral, que não deve ser ignorada, pois garante a manutenção do meio adequado para a implantação, manutenção e desenvolvimento das células tumorais (JUNTTILLA; SAUVAGE, 2013). Portanto, o conhecimento aprofundado sobre as características tumorais ajuda no desenvolvimento de novos fármacos e em novos métodos de tratamento para esta doença (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

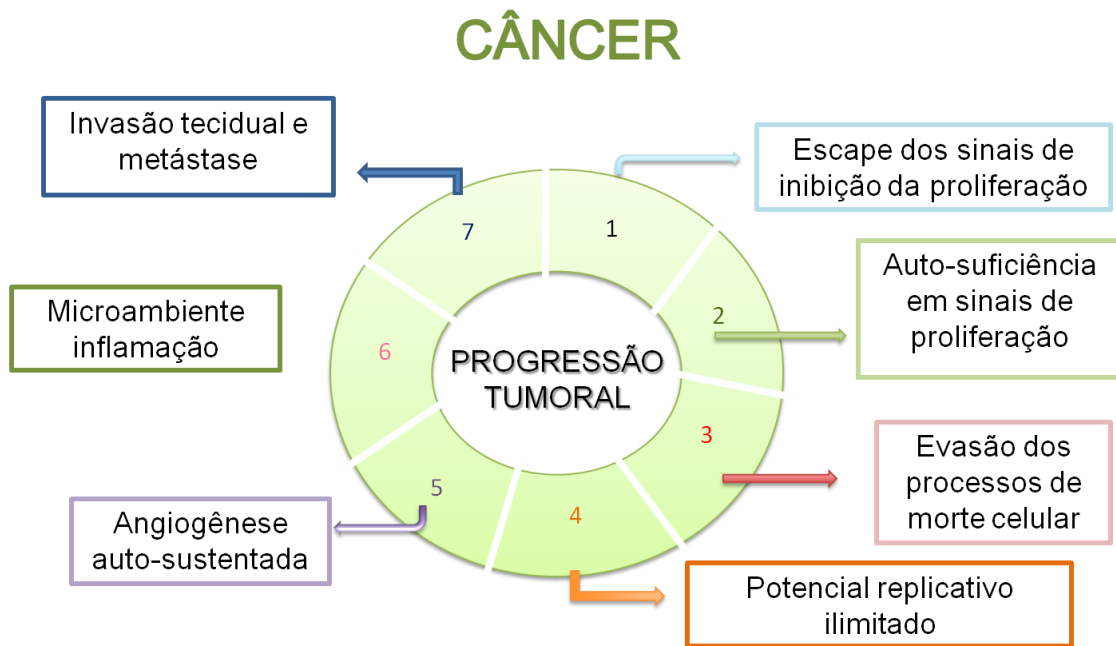


FIGURA 1: Alterações fisiológicas que caracterizam o câncer. (Fonte: Adaptado de: HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.1 Gliomas

Os tumores cerebrais representam cerca de 3% de todos os tipos de neoplasias malignas, sendo um dos menos prevalentes, porém considerados como um dos mais preocupantes. (DOLECEK et al., 2012; MIRANDA-FILHO et al., 2017). Dentre eles, os gliomas apresentam a maior frequência (acima de 80%) e estão entre os tipos de cânceres mais fatais. São qualificados como lesões originadas a partir de células gliais, que têm papel de suporte, proteção e nutrição dos neurônios no sistema nervoso central (SNC) (JONES, et al., 2012).

Os sintomas apresentados pelos pacientes acometidos por gliomas podem variar dependendo do local e da agilidade do desenvolvimento tumoral. Em um primeiro momento, os pacientes apresentam crises convulsivas e estas podem ser seguidas de distúrbios psicomotores como náuseas, dores de cabeça, confusão mental e vômitos. A classificação dos gliomas pode ser baseada em tipo celular, malignidade e localização tumoral. Uma das mais utilizadas é a da OMS que agrupa os gliomas de acordo com seu comportamento clínico, no

que se refere ao grau de malignidade e características biológicas das células tumorais (índice mitótico, atipia nuclear, proliferação vascular e necrose), como descrito na TABELA 1 (ZHU, et al., 2002; WEN; KESARI, 2008; KESARI, 2011; CRUCERU et al., 2013; LOUIS et al., 2016).

TABELA 1: Classificação dos gliomas segundo a OMS. Fonte: (Adaptada de Louis et al., 2016).

Tipo de Glioma	Grau	Nomenclatura
Astrocitoma	I	Astrocitoma Pilocítico
	II	Xantastrocitoma pleomórfico
	II	Astrocitoma difuso
	III	Astrocitoma anaplásico
	IV	Glioblastoma
	IV	Glioblastoma de células gigantes
Oligodendroglioma	II	Oligodendroglioma
	III	Oligodendroglioma anaplásico
Glioma misto	II	Oligoastrocitoma
	III	Oligoastrocitoma anaplásico
Ependimoma	I	Subependimoma
	I	Mixopapilar
	II	Ependimoma
	III	Ependimoma anaplásico

O desenvolvimento dos gliomas, assim como ocorre em outros tipos tumorais, é decorrente do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que podem afetar a regulação da sobrevivência, ciclo celular, invasão tecidual e angiogênese, porém, o surgimento dos tumores cerebrais ainda não está totalmente compreendido. Alguns estudos apontam a origem dos gliomas, como lesões originadas a partir de células da glia diferenciadas e também a partir de “*Cancer Stem Cells*” ou células-tronco tumorais (CSC’s), estas que podem diferenciar-se em células semelhante às progenitoras ou ainda em células gliais diferenciadas, o que levaria à formação de tumores cerebrais, além disso, os gliomas apresentam em seu

microambiente tumoral células do estroma, que são consideradas essenciais para a manutenção, progressão e recorrência do tumor (FIGURA 2) (HADJIPANAYIS; VAN MEIR, 2009a; BARONCHELLI et al, 2013).

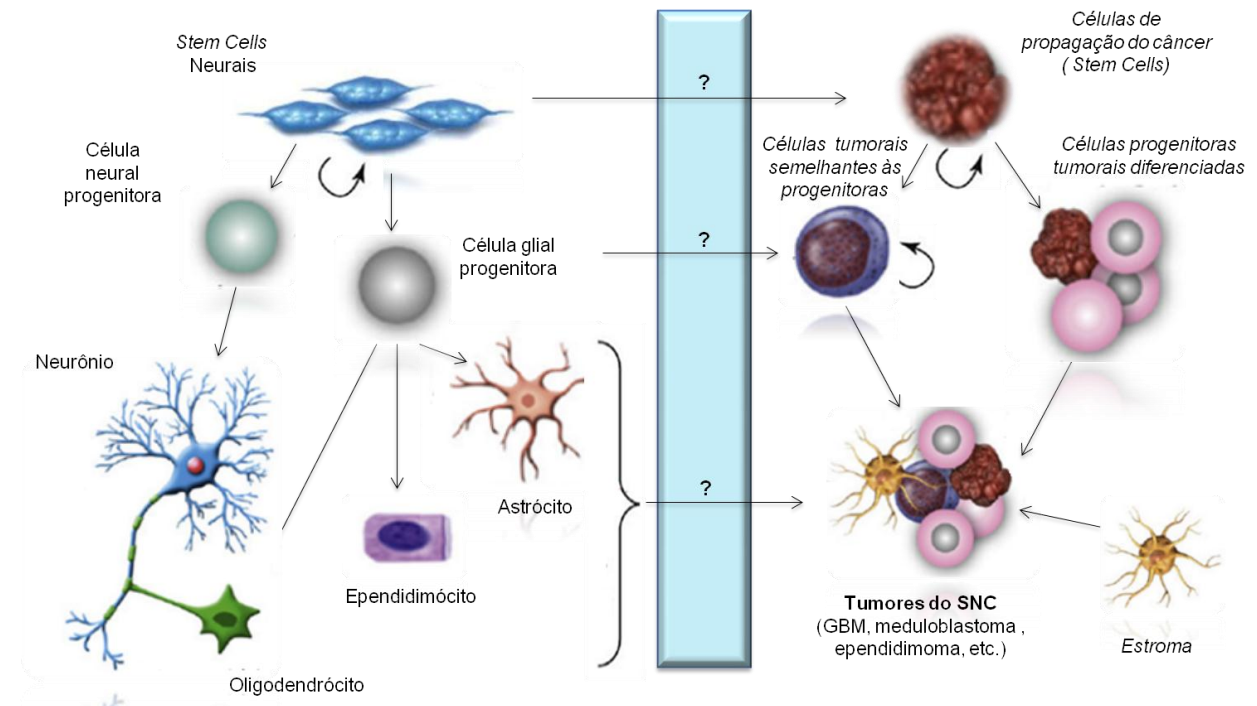


FIGURA 2: Diferenciação de células normais do SNC e início da formação tumoral. (FONTE: Adaptado de HADJIPANAYIS; VAN MEIR, 2009b).

1.1.1 Glioblastoma

O glioblastoma multiforme (GBM), considerado grau IV pela OMS, é o tipo mais agressivo de glioma maligno. É altamente invasivo, com alta recorrência, mesmo após ressecção completa. Assim a sobrevida média do paciente é de apenas 14,6 meses, mesmo após terapia agressiva com cirurgia, radiação e quimioterapia. Podem ser subdivididos em dois grupos com base nas características clínicas; GBM primários e GBM secundários. Os GBM primários surgem como um processo novo sem nenhuma evidência clínica de lesão maligna precursora e possuem evolução acelerada (<3 meses), acometem pessoas idosas, em torno

dos 60 anos de idade (ZHU et al., 2002; LAI, et al., 2011). Os GBM secundários acometem adultos jovens de aproximadamente 45 anos, surgem a partir da progressão de lesões como o astrocitoma de grau II ou III e evoluem de forma mais lenta em um período de aproximadamente 5 a 10 anos (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; HOLLAND, 2001; STUPP et al., 2005).

Os GBM apresentam uma elevada malignidade que pode ser explicada através da grande heterogeneidade intratumoral. Consideram-se as seguintes características celulares/histológicas como as principais causas desta malignidade: pleomorfismo e hiperplasticidade das células, alto índice mitótico e atipia nuclear. Outro ponto importante é a presença de células-tronco tumorais (CSCs) nos GBM que possuem grande atividade proliferativa e caráter não diferenciado, apresentam alta resistência a quimioterápicos e são consideradas potencialmente oncogênicas. Os GBM apresentam rápida proliferação celular e que geram diversos sintomas bruscos nos pacientes devido ao seu crescimento multifocal, em que não há formação de uma única massa sólida, ao invés disso, formam-se vários tumores espalhados pelo tecido sadio (FURNARI, et al., 2007; HADJIPANAYIS; VAN MEIR, 2009a; VAN MEIR, et al., 2010).

Diversos estudos têm surgido na tentativa de se encontrar marcadores moleculares e terapias alvo-direcionadas que auxiliem no tratamento dessas doenças. Para o diagnóstico e classificação dos GBM, vários testes moleculares e genéticos vêm sendo utilizados, sendo necessários para fornecerem informações úteis para o prognóstico e escolha da melhor terapêutica (GUPTA et al., 2005; APPIN et al., 2014).

O tratamento dos GBM depende de uma série de fatores, tais como localização, tamanho do tumor e idade do paciente. Na tentativa de cura ou de pelo menos aumentar a sobrevida dos pacientes, e/ou ainda diminuir os sintomas causados pelo GBM, a grande maioria dos pacientes é rotineiramente submetida à terapia agressiva. Esta consiste em ressecção cirúrgica, a mais ampla possível, seguida de um regime combinado de radioterapia e quimioterapia adjuvante com agentes alquilantes (WEN et al., 2008; LITTLE et al., 2012; ABHINAV et al., 2013). Ainda são poucos os fármacos aprovados para o tratamento de GBM. Na clínica são utilizados carmustina, a lomustina, Bevacizumab e temozolamida (TMZ), sendo este último o fármaco de primeira escolha por ser um agente alquilante de fácil penetração pela barreira hematoencefálica (BHE) (ALRWAS et al., 2014; MITTAL et al., 2015).

Além da alta resistência à quimioterapia e à radioterapia, outros fatores são responsáveis pelo insucesso do tratamento dessa patologia, tais como o caráter infiltrativo do tumor e massa tumoral composta por células com características diversas que expressam uma

variedade de marcadores. Ademais, a BHE limita significativamente a penetração da maioria dos agentes quimioterapêuticos para o SNC; assim, há necessidade premente de descobrir terapias mais eficazes para melhorar os resultados (MULDOON et al., 2007; STURM et al., 2012; SZERLIP et al., 2012).

1.2 Processos de morte celular

Os processos de morte celular são considerados essenciais para a manutenção e homeostase do organismo dos seres vivos. Esses processos permitem que as células defeituosas ou supérfluas sejam eliminadas pelo organismo, podendo regular processos importantes como o desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual, função imunológica e a supressão tumoral (MILLIMOUNO, et al., 2014). No câncer, como já descrito anteriormente, as células perdem a habilidade de captar os sinais externos e internos que regulam a proliferação e desenvolvimento celular, evitam os processos de diferenciação e morte celular, são geralmente instáveis, deficientes no reparo de danos no DNA e na correção de erros de replicação, tendendo a acumular mutações (ALBERTS et. al., 2008).

A morte celular pode ser classificada de acordo com suas características morfológicas, como por exemplo, apoptótica, necrótica, autofágica ou associada à mitose; por critérios enzimológicos (com o envolvimento ou não de nucleases ou de proteases, como caspases, calpains, catepsinas e transglutaminases); por aspectos funcionais (programados ou acidentais, fisiológicos ou patológicos) ou ainda de acordo com suas características imunológicas (imunogênicas ou não imunogênicas). São vários os tipos de morte celular descritos na literatura, porém, mais bem estudados e compreendidos são apoptose, autofagia e a necrose (KROEMER, et al., 2009; GALLUZZI et al., 2012a).

A palavra apoptose tem origem grega e remete à queda das pétalas das flores ou das folhas das árvores, em função da relativa semelhança com a fragmentação da membrana plasmática celular que se observa durante o processo apoptótico. Esse mecanismo de morte celular programada é essencial para a manutenção homeostática e sobrevivência dos seres vivos. A apoptose fisiológica controla a quantidade de células, remove células danificadas ou mutadas, regulando o desenvolvimento embrionário, a homeostase tecidual, a função imunológica e a supressão tumoral (GALLUZZI et. al., 2012).

A apoptose é um tipo de morte celular programada caracterizada pela exposição de resíduos internos de fosfatidilserina na membrana plasmática, redução do volume celular, condensação de cromatina, fragmentação do DNA, formação de vesículas (corpos apoptóticos), e ao final do processo, os fragmentos das células são fagocitados sem que haja perturbação das células adjacentes (MILLIMOUNO, et al., 2014).

A autofagia é um mecanismo envolvido na manutenção da função celular, por meio do qual, estruturas desgastadas ou malformadas são destruídas. É morfologicamente definida como um tipo de morte celular que ocorre na ausência da condensação de cromatina e é acompanhada de uma enorme vacuolização autofágica do citoplasma, no qual os lisossomos degradam estruturas celulares como organelas e membranas. Ao contrário da apoptose, as células que morrem em consequência da autofagia têm pouca ou nenhuma associação com fagócitos (KROEMER, et al., 2009). Pode ser desencadeada por inúmeros tipos de estresse metabólico ou terapêutico. Alguns estudos demonstram efeitos protetores contra o desenvolvimento tumoral, outros apontam que a autofagia pode funcionar como mecanismo de resistência a terapias contra o câncer (DING, et al, 2008; DALBY, et al, 2010).

Outro tipo de mecanismo de morte celular é a necrose, morfologicamente caracterizada por um ganho no volume celular, tumefação, ruptura da membrana plasmática e subsequente perda de conteúdo intracelular culminando na degradação total das células (KROEMER, et al., 2009). Está relacionada com agressões às células associadas à inflamação, processo que leva à diminuição da produção de ATP e/ou lesão da membrana celular. Por muitos anos a necrose foi considerada um tipo de morte celular descontrolada, mas estudos atuais sugerem que este tipo de morte celular seja executado por mecanismos mais regulados e complexos (BERGHE et al., 2010). Desde 2005, o termo "necroptose" vem sendo utilizado para indicar necrose programada que é dependente da atividade da quinase serina/treonina (RIP-1). Além de estar relacionada a essa enzima, a necroptose está associada a uma rápida disfunção mitocondrial que leva à excessiva produção de ROS (KROEMER, et al., 2009; VANDENABEELE et al., 2010).

Os estudos que investigam as características biológicas das células tumorais e mecanismos de morte celular têm grande relevância para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer, além de permitirem estratégias que visem combater a resistência das células tumorais aos quimioterápicos utilizados na clínica.

1.3 Compostos naturais e câncer

A crescente evolução das técnicas e desenvolvimento da biologia celular e tumoral tem levado à descoberta de novos alvos moleculares específicos para o desenvolvimento de quimioterápicos, que podem ser obtidos a partir de produtos naturais ou ainda sintetizados, e que apresentem menor toxicidade e maior eficácia para a terapia de tumores. Considerando que fontes vegetais são amplamente distribuídas na natureza, cresce o interesse pela busca de compostos oriundos de produtos vegetais e naturais que contenham efeitos anticâncer satisfatórios.

O tratamento do câncer pode variar de acordo com o tipo e a gravidade da doença. A terapêutica baseia-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores, no tratamento radioterápico e na quimioterapia (COSTA-LOTUFO et al., 2010). O elevado número de mortes provocadas por esta doença tem requerido a descoberta cada vez mais urgente de novos medicamentos anticâncer, os quais possam ser mais seletivos aos processos de morte celular.

Plantas são consideradas, desde o início da humanidade, excelentes alternativas no desenvolvimento de potenciais fármacos, com atividade anticâncer (GANESAN, 2013). A vimblastina (Velban®), a vincristina (Oncovin®) e os seus análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®), derivados do gênero *Catharanthus roseus*, são exemplos de fármacos obtidos a partir de produtos naturais utilizados no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, câncer de testículo, doença de Hodgking, entre outros; e movimentam anualmente um mercado bilionário (COSTA-LOTUFO et al., 2010; NEWMAN E CRAGG, 2012). Outros compostos oriundos de produtos naturais que foram aprovados como fármacos anticâncer nos EUA são: etoposida, teniposida (*Podophyllum peltatum*), paclitaxel, docetaxel (*Taxus brevifolia*), topotecan e irinotecan (*Camptotheca acuminata*) (LEE, 1999; SILVA, et al., 2017). Desta forma, a descoberta de medicamentos provenientes de plantas medicinais continua exercendo um papel importante no tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer (NEWMAN; CRAGG, 2016).

1.3.1 *Arrabidaea brachypoda* (sinonímia botânica: *Fridericia platyphylla*)

Espécies do gênero *Arrabidaea* têm sido utilizadas na medicina tradicional para diversos fins terapêuticos, tais como adstringentes, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antitumorais. No Brasil, são encontrados 56 gêneros e cerca de 338 espécies utilizadas como antitêrmicos, citotóxicos, adstringentes, anticarcinogênico, antivirais, anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antimaláricos, antirreumático (GARCIA, 2008; BRANDÃO et al., 2010).

Arrabidaea brachypoda (DC.) Bureau (sinonímia botânica: *Fridericia platyphylla*) (Figura 3) é caracterizada por se apresentar em forma de arbusto com cerca de 70 cm de altura encontrado no cerrado brasileiro, apresenta folhas simples e flores róseas ou roxas em inflorescências terminais (SILVA; QUEIROZ, 2003). É conhecida popularmente como “tintureiro”, “cipó-una”, entre outros e amplamente utilizada pela população no tratamento de artrite. Estudos relacionam essa espécie com várias atividades, entre elas antifúngica, anti-inflamatória, antiviral e também, com efeito, antinociceptivo em animais e ainda ação anti-*Trypanosoma cruzi* (ALCERITO et al., 2002; BRANDÃO et al., 2010; ROCHA et al., 2014). Estudos fitoquímicos indicam que este gênero é uma fonte de c-glucosilxantonas, fenilpropanoides, antocianidinas, alantoinas, triterpenos e principalmente flavonoides (ROCHA et al., 2014).



FIGURA 3: Flor da *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (sinonímia botânica: *Fridericia platyphylla*). Fonte: ROCHA et al., 2014.

1.3.2 Flavonoides e atividade anticâncer

Os flavonoides compõem uma classe variada de compostos substâncias naturais de grande interesse terapêutico e científico. São classificados de acordo com sua estrutura fenólica e podem ocorrer como glicosídeos, agliconas ou ainda como flavolignanas, estes últimos são compostos que apresentam flavonoides em sua estrutura (BEHLING et al., 2004). São encontrados normalmente em angiospermas, gimnospermas (dicotiledôneas e monocotiledôneas), samambaias (*Pteridophyta*) e musgos (*Bryophyta*). São um grupo de metabolitos secundários de plantas polifenólicas distribuídos na natureza, utilizados amplamente na indústria cosmética e, possivelmente, estão relacionados com a prevenção de cânceres, doenças cardiovasculares e neurodegeneração (FANG et al., 2010; XIAO et al., 2014). Uma variedade de atividades biológicas tem sido relatada para os flavonoides, tais como anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica antiviral, anti-Alzheimer, anticâncer, entre outras (MERCADER et al., 2010; THAPA et al., 2011; MERCADER et al., 2013; ARAÚJO, et al., 2016; ORFALI, et al., 2016).

Estudos publicados têm apontado diversas atividades dos flavonoides, como por exemplo, capacidade de impedir a carcinogênese através da inibição da evolução tumoral e da proliferação celular. Os flavonoides também influenciam na iniciação, promoção e progressão tumoral, por atuarem modulando diferentes receptores e enzimas responsáveis pela diferenciação e proliferação celular, inflamação, reversão de resistência a múltiplas drogas, apoptose, angiogênese e metástase (RAVISHANKAR et al., 2013; KARABIN et al., 2015). Os principais mecanismos moleculares de ação de flavonoides que têm sido citados são: regulação negativa da proteína p53 mutante, interrupção do ciclo celular, inibição da tirosina quinase, inibição das proteínas de choque térmico, capacidade de ligação ao receptor de estrogênio e inibição da expressão de proteínas RAS (KUMAR et al., 2013).

1.3.2.1 Luteolina

A Luteolina (3', 4', 5, 7 – tetrahidroxiflavona) (FIGURA 4) é um flavonoide integrante do grupo das flavonas, muito comum na dieta humana e pode ser encontrada em vegetais como na pimenta verde, salsa e alcachofra, chá de camomila, entre outros (LIN, et al., 2008).

Diversos estudos descrevem atividades biológicas da luteolina, principalmente, a atividade anticâncer, como a indução de apoptose em linhagem tumoral de hepatoma murino (H4IIE), hepatoma humano (HepG2) e em células de carcinoma de pulmão (CH27) (MICHELS et al., 2005; LEE et al., 2005; LEUNG et al., 2006). Além disso, foi relatada inibição de invasão de células de câncer de próstata (PC-3), atividade antiproliferativa e indução de apoptose em células tumorais de endométrio humano (KIM et al., 2005). A luteolina apresentou também efeito protetor em modelo de carcinogênese de colón induzida por azoximetano (ASHOKKUMAR; SUDHANDIRAN, 2008). Além disso, protegeu as células OLN-93 contra o dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, reduzindo a expressão da NO sintase induzida (iNOS) e a produção de NO em macrófagos NR8383 (MEETEREN et al., 2004).

A luteolina tem apresentado promissora atividade anticâncer em linhagens tumorais de glioma e glioblastoma, como descrito na TABELA 2.

TABELA 2: Descrição da atividade anticâncer da luteolina em linhagens tumorais de glioblastoma humano.

(continua)

Linhagem celular	Atividade anticâncer	Referência Bibliográfica
U87MG T98G	Atividade antitumoral através da superexpressão de miR-7-1-3p levaram a inibição de autofagia e indução de apoptose.	Chakrabarti; Ray, 2016.
SNB19	Inibição da migração e invasão celular, indução de apoptose em células tumorais e estaminais (CSCs).	Chakrabarti; Ray, 2015.
U87MG T98G	Inibição da migração celular através diminuição da expressão de Cdc42 e PI3K/AKT.	Cheng, et al, 2013.

(continuação)

GBM 8401 U87MG	Inibição da proliferação celular através da indução da parada do ciclo celular e apoptose.	Tsai, et al., 2013.
U251MG U87MG	Indução de apoptose através da indução de ROS/ER e disfunção mitocondrial.	Wang, et al., 2017a.
U251MG U87MG	Redução da migração celular através da inibição da via de sinalização p-IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR.	Wang, et al., 2017b.

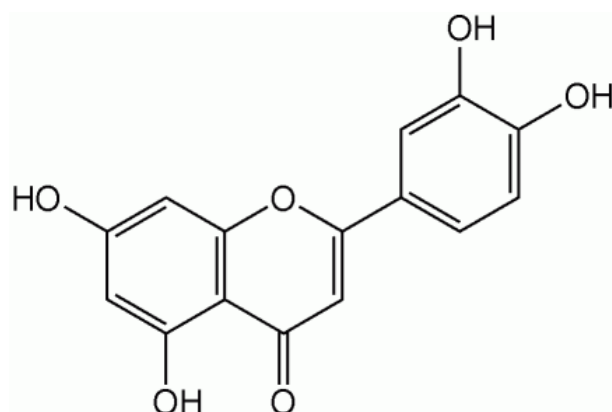


FIGURA 4: Fórmula estrutural da Luteolina.

O aumento exponencial da morbidade causada pelo câncer requer, cada vez mais, a descoberta de novos compostos e possíveis drogas anticâncer, que sejam mais seletivas sobre os processos de morte celular.

Os flavonoides têm sido amplamente estudados devido à variedade de propriedades biológicas promissoras, dentre elas, a antitumoral. A luteolina, como já descrito em estudos citados anteriormente (TABELA 2), apresenta atividade antitumoral para diversas linhagens, principalmente para gliomas e glioblastomas, sendo assim este estudo visou melhor caracterizar a ação deste composto em linhagem tumoral de glioblastoma U251, a fim de elucidar os mecanismos pelos quais a luteolina se mostra tão eficaz frente a este tipo tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo propôs avaliar a atividade antiproliferativa do flavonoide luteolina isolado a partir das folhas da espécie vegetal *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (sinonímia botânica: *Fridericia platyphylla*).

2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar triagem de extratos, frações e flavonoides isolados de 5 espécies nativas quanto à potencial atividade antiproliferativa e selecionar a amostra mais promissora;
2. Avaliar a atividade antiproliferativa da luteolina, amostra mais promissora, nas diversas linhagens celulares (glioma, melanoma, mama, rim, pulmão, próstata, ovário, cólon), determinando a linhagem tumoral mais sensível a este composto;
3. Avaliar a capacidade da luteolina em inibir a replicação e a migração celular da linhagem mais sensível;
4. Investigar o mecanismo de ação da luteolina no processo de morte celular da linhagem mais sensível.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

Primeiramente foi avaliado o potencial antiproliferativo em cultura celular de 21 amostras obtidas de diversas espécies vegetais (TABELA 3), provenientes de colaboração com os professores Dr. Wagner Vilegas, do Laboratório de Biodiversidade e Sustentabilidade da UNESP – campus São Vicente e Dra Cláudia Quintino da Rocha, da Divisão de Química da Universidade Federal do Maranhão.

TABELA 3: Amostras avaliadas em ensaio antiproliferativo.

(continua)

Nome	Pureza	Espécie vegetal	Peso Molecular	Fórmula Molecular	Nome comercial /Nome Popular
RM1	Extrato Bruto	<i>Rhizophora mangle</i> Acetônico casca	n.a.	n.a.	Mangue vermelho
RM2	Extrato Bruto	<i>Rhizophora mangle</i> Etanólico casca	n.a.	n.a.	Mangue vermelho
RM3	Extrato Bruto	<i>Rhizophora mangle</i> Acetônico folha	n.a.	n.a.	Mangue vermelho
RM4	Extrato Bruto	<i>Rhizophora mangle</i> Etanólico folha	n.a.	n.a.	Mangue vermelho
Rab	Extrato Bruto	<i>Fridericia platyphylla</i> Raízes	n.a.	n.a.	Cervejinha do campo
Rab DCM	Fração	<i>Fridericia platyphylla</i> Raízes	n.a.	n.a.	Cervejinha do campo
ABF	Extrato Bruto	<i>Fridericia platyphylla</i> Folhas	n.a.	n.a.	Cervejinha do campo
Mplc-1	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> Raízes	876/ g/mol	$C_{44}H_{44}O_{17}$	n.d.
Mplc-2	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> Raízes	860 g/mol	$C_{44}H_{44}O_{16}$	n.d.
Mplc-3	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> Raízes	714 g/mol	$C_{39}H_{38}O_{13}$	n.d.

(continuação)

Nome	Pureza	Espécie vegetal	Peso Molecular	Fórmula Molecular	Nome comercial /Nome Popular
Cab	Extrato Bruto	<i>Fridericia platyphylla</i>	n.a.	n.a.	Cervejinha do campo
Cab DCM	Fração	<i>Fridericia platyphylla</i>	n.a.	n.a.	Cervejinha do campo
E.CAR	Extrato bruto	<i>Quercus robur</i>	n.a.	n.a.	Carvalho
E.CAVA	Extrato bruto	<i>Clethra scabra</i>	n.a.	n.a.	Carne de Vaca
FAB1	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> folhas	610 g/mol	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutina
FAB2	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> folhas	170 g/mol	C ₁₅ H ₁₀ O ₁₅	Apigenina
FAB3	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> folhas	302 g/mol	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina
FAB4	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> folhas	448 g/mol	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Quercitrina
FAB5	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> folhas	286 g/mol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Luteolina
Rab10	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> folhas	684 g/mol	C ₃₈ H ₃₆ O ₁₂	n.d.
Rabec	Composto Puro	<i>Fridericia platyphylla</i> folhas	694 g/mol	C ₄₈ H ₈₄ O ₂	n.d.

n.a → não se aplica; n.d → não determinado ainda

3.2 Cultivo celular

3.2.1 Linhagens celulares

Os produtos naturais foram avaliados quanto a atividade antiproliferativa *in vitro* utilizando-se o painel de linhagens tumorais humanas comerciais (glioma, mama, rim, pulmão, próstata, ovário, colón) doadas pelo NCI (EUA) e gentilmente cedidas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Além deste painel, foi avaliada também a ação de todos os compostos em linhagem celular não-tumoral de queratinócitos humanos. Para avaliação do

índice de seletividade da luteolina utilizou-se uma linhagem de astrócito humano não tumoral cedida pelo Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos. Todas as linhagens utilizadas estão descritas na TABELA 4.

TABELA 4: Linhagens celulares tumorais utilizadas nos ensaios *in vitro*.

Sigla	Tipo histológico	Principais Mutações
U251	Glioblastoma	Expressa GFAP e vimentina
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Produz proteínas insulina like (liga fatores de crescimento) e superexpressa gene P2P-R. TNF- α inibe seu crescimento
NCI-ADR/RES	Adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplas drogas	Perdeu o receptor de estrógeno, expressa altos níveis do gene resistência multidroga (MDR1) traduzindo para glicoproteína-P. Proto-oncogene Raf-1 pode estar envolvido na regulação da resistência a drogas
786-O	Adenocarcinoma de rim	Produz peptídeo semelhante em forma e ação ao hormônio paratireoidiano. Mutações no gene HVL e da prolina oxidase propiciam a formação do tumor
NCI-H460	Adenocarcinoma de pulmão, tipo não pequenas células	Expressa altos níveis COX-2 que se associam ao fenótipo invasivo e metastático ⁹ . Apresenta características de células endócrinas pulmonares altamente diferenciadas e é deficiente em fator-1 de ativação da protease do citocromo c apoptótico
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	Baixa atividade de fosfatase ácida e 5- α redutase, sem cromossomo Y normal detectado. É uma das 3 linhagens clássicas de tumores prostáticos
HT-29	Adenocarcinoma colorretal	Possui microvilos, microfilamentos, mitocôndrias vacuolizadas e densas, alta expressão de receptores de uroquinase e antígenos p53, mutações pró-tumorais no gene APC (adenomatous polyposis coli) e COX-2
HACAT	Queratinócito não tumoral	-
NHA	Astrócito não tumoral	-

Fonte: Adaptado de LONGATO, 2014.

3.2.2 Descongelamento e congelamento celular

O descongelamento das células foi realizado sempre que houve a necessidade de renovação ou obtenção de células. Para isto, um criotubo de cada uma das diversas linhagens celulares (TABELA 4) foi retirado do freezer -80°C e descongelado a temperatura ambiente. Posteriormente, o conteúdo de cada criotubo foi transferido para tubos de centrífuga (15 mL) contendo 2 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma[®]), 5% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell[®]) e 1% penicilina-estreptomicina (PS) (Gibco[®]) para lavagem do meio de congelamento. A suspensão celular de cada criotubo foi então centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, o meio de cultura sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular obtido foi centrifugado novamente com 2 mL de tampão PBS (5 minutos/1500 rpm). Foi realizado o descarte do sobrenadante e o *pellet* celular foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura e transferido para frascos de manutenção de 25 cm² (T25) (COSTAR[®]) e incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de 75 cm² (T75) (COSTAR[®]) contendo meio RPMI-1640 (5% SFB + 1% PS) até a passagem ideal (4^a à 6^a passagem) para o congelamento. Para isso o meio de cultura do frasco T75 foi removido utilizando bomba de compressão, este foi lavado com 2 mL de tampão PBS, foi adicionado 1 mL de tripsina e levado à estufa por 3-5 minutos. Foi feita a inativação da tripsina utilizando 3 mL de meio de cultura e a suspensão celular foi transferida para um tubo de centrífuga (15 mL) e então centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação o meio de cultura sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi centrifugado novamente com 2 mL de tampão PBS (5 minutos/1500 rpm), o sobrenadante foi descartado e foi realizada novamente a contagem do número de células, sendo que o volume final de suspensão celular foi ressuscitado em meio de congelamento contendo SFB+ 5% DMSO (1×10^6 cél./ mL). Posteriormente a suspensão celular foi transferida para criotubos e estes foram congelados e mantidos em freezer -80°C .

3.3 Ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro*

O desenho experimental utilizando o método colorimétrico MTT Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Tetrazolio, que avalia indiretamente a viabilidade celular através da

atividade da enzima redutase mitocondrial (MOSMANN, 1983) foi empregado para a avaliação da atividade antiproliferativa. Para sua execução, as linhagens celulares foram cultivadas em frascos T75 contendo meio RPMI-1640 (5% SFB + 1% PS) até a passagem ideal (6ª à 9ª passagem) para a realização do ensaio. Após este momento, o meio de cultura do frasco T75 foi removido utilizando bomba de compressão, este foi lavado com 2 mL de tampão PBS, foi adicionado 1 mL de tripsina e levado à estufa por 3 minutos. Foi feita a inativação da tripsina utilizando 3 mL de meio de cultura. A partir da suspensão celular formada, foi realizada a contagem do número de células utilizando corante azul de tripan (Gibco®) e câmara de Neubauer. A suspensão celular foi preparada e ajustada em densidades de inoculação de 5×10^4 cél./ mL (para todas as linhagens avaliadas). Foram inoculados 100 μ L de células suspensas em meio RPMI por poço, em placas de 96 compartimentos (COSTAR®), que foram submetidas à incubação durante 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Foi preparada também uma placa controle (placa T0), que continha todas as linhagens utilizadas no experimento (TABELA 4).

Amostras dos flavonoides foram diluídas em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO- Fisher Scientific®) na concentração de 100.000 μ g/ mL. Para o tratamento, estas soluções foram diluídas em meio de cultura suplementado, evitando assim a toxicidade do DMSO. Os flavonoides foram avaliados nas concentrações 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/ mL (100 μ L/compartimento) em triplicata, e a seguir incubados por 48 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico Cloridrato de Doxorrubicina (Eurofarma), nas mesmas concentrações das amostras citadas acima (100 μ L/compartimento), em triplicata.

As células semeadas na placa controle (T0) foram coradas com o sal MTT (Sigma®) para determinar a quantidade de células viáveis presentes no momento de adição da amostra. Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram então coradas com MTT. Para o preparo da solução de MTT, primeiramente foi feita uma solução estoque na concentração de 5 mg por 1 mL de tampão PBS. A partir desta solução foi realizada a diluição em meio RPMI de modo que a concentração final utilizada foi 0,25 mg/ mL sendo adicionados 100 μ L desta solução por compartimento. Após 4h horas de incubação a solução de MTT + meio RPMI foi descartada e em seguida foi realizada a solubilização dos cristais de MTT utilizando DMSO (100 μ L/compartimento). As placas foram levadas ao agitador por 15 minutos a temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a leitura espectrofotométrica da absorbância a 570 nm em leitor de microplacas (Epoch BIOTEK®).

As médias das absorvâncias das células ao final do experimento (TA) foram calculadas descontando-se o valor da absorvância de seu controle DMSO (branco) e, através das fórmulas, foi determinada a porcentagem de crescimento celular:

Se $TA > T1$, a amostra estimulou o crescimento.

Se $T1 \geq TA > T0$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi

$$100 \times [(TA - T0)/(T1 - T0)].$$

Se $TA < T0$, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi

$$100 \times [(TA - T0)/(T0)].$$

Os dados de absorvância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Através do *software* Origin®, foi feita a regressão não linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e foram obtidos os valores de GI_{50} (*50% growth inhibition*) – concentração necessária para inibir 50% do crescimento das células (utilizado para amostras citostáticas). Esse parâmetro foi empregado para determinar a potência das amostras e evidenciar a seletividade das mesmas. Após este ensaio, o composto que apresentou menores valores de GI_{50} para a maioria das linhagens avaliadas (luteolina) foi selecionado como composto-alvo deste estudo.

3.4 Avaliação da atividade antiproliferativa do flavonoide luteolina em linhagem tumoral de glioblastoma (U251)

A linhagem celular tumoral U251 foi selecionada, dentre as mais sensíveis ao tratamento com luteolina, para continuidade do estudo da atividade antiproliferativa deste composto. Com base na média dos valores de GI_{50} de três experimentos, a concentração de luteolina foi estabelecida e ajustada para cada ensaio realizado, considerando o tempo de exposição. Para ensaios que avaliaram o potencial antiproliferativo (ensaio de migração e formação de colônias) adotou-se a concentração de 10 μ M, estabelecida através do ensaio antiproliferativo utilizando o método colorimétrico MTT. Para os ensaios do mecanismo de ação por citometria de fluxo foram utilizadas as concentrações de 20 μ M (ciclo celular) e 40 μ M (exposição de resíduos de fosfatidilserina e avaliação da perda do potencial de membrana).

Para os ensaios de avaliação do mecanismo de ação por *Western Blotting* foi utilizada a concentração de 40 μM . Essas concentrações foram estabelecidas através de ensaios celulares previamente realizados. Como controle negativo utilizou-se DMSO (1%) e como controle positivo utilizou-se o quimioterápico TMZ (temozolamida- SIGMA®) nas concentrações 1000 (ensaio de ciclo celular) e 3000 μM (ensaio de exposição de resíduos de fosfatidilserina - citometria de fluxo e *Western blotting*). Os ensaios acerca do mecanismo de ação da luteolina foram realizados no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos, sob supervisão do Dr. Rui Reis e Dra. Viviane Aline O. Silva.

3.4.1 Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) é uma análise que permite estimar a seletividade do composto, ou seja, se este é mais seletivo às células tumorais do que as não tumorais. Esta análise pode ser obtida pela divisão do valor do GI_{50} de uma linhagem celular não tumoral por uma linhagem tumoral. Neste ensaio foram utilizadas as linhagens NHA (astrócito não tumoral) e U251 (glioblastoma), através da fórmula: $\text{IS} = \text{GI}_{50} \text{ NHA} / \text{GI}_{50} \text{ U251}$. As linhagens celulares foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (5% SFB + 1% PS) até a passagem de interesse, após este momento foram plaqueadas e tratadas com luteolina (7 concentrações entre 5-314 μM) e o quimioterápico TMZ (7 concentrações entre 50 e 1000 μM). Após as 48 horas, as células foram avaliadas pelo método de colorimétrico MTT nas mesmas condições descritas anteriormente. Segundo o NCI, consideram-se IS significativos valores maiores ou iguais a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

3.4.2 Ensaio de migração celular (*Scratch wound healing assay*)

O ensaio de migração celular é comumente utilizado para avaliar moléculas que possam interferir no processo de migração celular. Para sua execução, as células U251 foram cultivadas em frascos T75 contendo meio RPMI-1640 (5% SFB + 1% PS) até a passagem ideal (6ª à 9ª passagem) para a realização do ensaio. Após este momento, o meio de cultura do frasco T75 foi removido utilizando bomba de compressão, este foi lavado com 2 mL de tampão

PBS, foi adicionado 1 mL de tripsina e levado à estufa por 3 minutos. Foi feita a inativação da tripsina utilizando 3 mL de meio de cultura. A partir da suspensão celular formada, foi realizada a contagem do número de células utilizando corante azul de tripan em câmara de Neubauer. As células foram então semeadas em placas de 6 compartimentos (5×10^5 e 1×10^6 células/ poço), sendo 2 mL por compartimento. Ao atingirem confluência de 100% (cerca de 24 horas), o meio de cultura foi coletado cuidadosamente e posteriormente foram feitas duas ranhuras, utilizando uma ponteira de 200 μM estéril, em paralelo dentro de cada poço. Para que as fotografias fossem realizadas sempre nos mesmo pontos, foram feitas marcações na parte inferior externa da placa, conforme FIGURA 5, assim cada poço teve 4 campos fotografados sendo eles o encontro da ranhura com a marcação da placa. A seguir, as placas foram fotografadas em um microscópio invertido com câmera acoplada e as amostras (DMSO 1% e luteolina 10 μM , 2 mL/poço) foram adicionadas. Após 24 e 48 horas de tratamento novas imagens, sempre das mesmas regiões, foram adquiridas. Antes de cada fotografia o meio de cultura foi coletado cuidadosamente para melhor visualização da ranhura e após as fotografias foi adicionada uma nova solução de meio mais tratamento. A distância entre as duas margens das ranhuras de cada fotografia foi avaliada com o auxílio do programa *Image J*. Os resultados foram expressos como a média das porcentagens de fechamento da ranhura, utilizando a fórmula: $(A \text{ inicial} - A \text{ final}) / (A \text{ inicial}) \times 100 = \% \text{ de fechamento da ferida}$, sendo A a medida da área entre as bordas (LIANG; PARK; GUAN, 2007; YUE et. al., 2010).

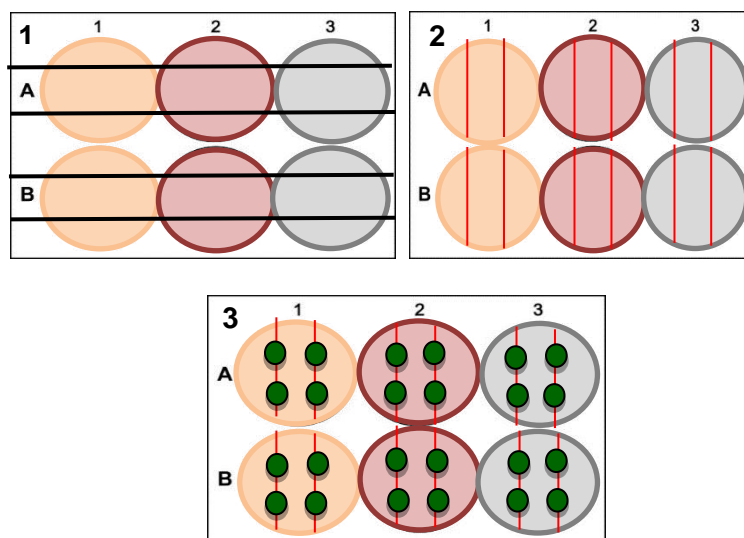


FIGURA 5: Esquema representativo das marcações realizadas nas placas (1), das ranhuras (2) e dos campos fotografados (3) no experimento.

3.4.3 Ensaio de formação de colônias em *Soft Agar* (Clonogenic assay)

O ensaio de formação de colônias em *Soft Agar* é utilizado para avaliar a capacidade de um composto em inibir o processo de replicação celular. As condições deste ensaio foram adaptadas a partir do estudo de Borowicz e colaboradores (2014). Para sua execução, as células U251 foram cultivadas em frascos T75 contendo meio RPMI-1640 (5% SFB + 1% PS) até a passagem ideal (6ª à 9ª passagem) para a realização do ensaio. Após este momento, o meio de cultura do frasco T75 foi removido utilizando bomba de compressão à vácuo, este foi lavado com 2 mL de tampão PBS, foi adicionado 1 mL de tripsina e levado à estufa por 3 minutos. Foi feita a inativação da tripsina utilizando 3 mL de meio de cultura. A partir da suspensão celular formada, foi realizada a contagem do número de células utilizando corante azul de tripan em câmara de Neubauer. Posteriormente foi preparada a primeira camada de ágar (MERK®) (ágar base) contendo 0,5 mL de ágar 1,2% liquefeito + 0,5 mL de meio RPMI 2x suplementado com 20% de SFB + 1% PS por compartimento. A solução foi transferida para uma placa de 6 compartimentos e foi incubada em estufa até a preparação da segunda camada (ágar topo), para esta utilizou-se 0,5 mL de ágar 0,7% liquefeito + 0,5 mL RPMI 2x suplementado com 20% de SFB + 1% PS contendo 5000 células U251 por compartimento de forma que conforme a solidificação do ágar ocorresse, as células fossem incorporadas e se mantivessem aderidas neste meio. As amostras DMSO (1%) e luteolina (10 µM) foram diluídas em 500 µL de meio RPMI 5% SFB e adicionadas sobre o ágar para tratamento, posteriormente, as células foram mantidas sob incubação em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido e o tratamento foi realizado de três em três dias até o final do experimento. Após 21 dias em cultura, o meio foi retirado, os poços foram lavados cuidadosamente com água destilada e posteriormente as colônias foram fixadas e coradas utilizando (2 mL/ poço) de uma solução de formaldeído (4%) e cristal violeta (0,005%). Os poços foram fotografados e as imagens analisadas no software *ImageJ*, para quantificação das colônias.

3.5 Análise por citometria de fluxo

As análises acerca do mecanismo de ação da luteolina foram realizadas em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). As concentrações escolhidas para avaliação foram baseadas, como descrito anteriormente, em testes antiproliferativos prévios, considerando os

valores de GI_{50} e a linhagem celular tumoral (U251) foi selecionada de acordo com a sensibilidade à amostra. De cada amostra foram coletados 10.000 eventos. Os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e réplicas biológicas.

Para realização de cada ensaio, foi realizado o preparo da suspensão celular onde as células U251 foram cultivadas em frascos T75 contendo meio RPMI-1640 (5% SFB + 1% PS) até a passagem ideal (6ª à 9ª passagem) para a realização do ensaio. Após este momento, o meio de cultura do frasco T75 foi removido utilizando bomba de compressão, este foi lavado com 2 mL de tampão PBS, foi adicionado 1 mL de tripsina e levado à estufa por 3 minutos. Foi feita a inativação da tripsina utilizando 3 mL de meio de cultura. A partir da suspensão celular formada, foi realizada a contagem do número de células utilizando corante azul de tripan em câmara de Neubauer.

3.5.1 Análise do ciclo celular

Esse teste é realizado através da marcação fluorescente com iodeto de propídio (PI), que é um intercalante de DNA, e que permite diferenciar as células nos diferentes estágios do ciclo celular. Essa análise é realizada após a permeabilização membranar das células com etanol 70% à 4 °C.

As células foram semeadas em placas de 6 compartimentos na densidade entre 5×10^5 e 1×10^6 / 2 mL de meio RPMI + 5% SFB. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 e ambiente úmido, o meio de cultura contendo SFB foi retirado para o carenciamento, ou seja, para a sincronização das células na fase G0, início do ciclo celular. Foi adicionado então meio de cultura sem SFB por 24 horas. Após este momento, o meio de cultura foi descartado e as células receberam tratamento com luteolina em duas concentrações (20 e 40 μM) / 24 horas e, como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico TMZ (1000 μM) / 24 horas, que é responsável por induzir parada do ciclo celular em G2/M em glioblastomas (GRATAS et al., 2014). Posteriormente, as células tratadas foram submetidas à marcação com iodeto de propídio (PI-viabilidade celular) (FITC) utilizando o *Cell Cycle Kit* (BD Biosciences), conforme as recomendações do fabricante e então analisadas em citômetro de fluxo.

3.5.2 Quantificação de células com exposição de resíduos de fosfatidilserina

Este ensaio é baseado na marcação celular utilizando anexina V e 7-amino-actinomicina D (7-AAD). A anexina V é uma proteína ligante de fosfolípido com elevada afinidade por fosfatidilserina que se localiza na face interna da membrana plasmática de células viáveis. Na fase inicial de alguns processos de morte celular, as moléculas de fosfatidilserina são translocadas para a face externa e ficam disponíveis para a ligação com anexina V, marcando, portanto, as células em fase inicial de morte celular programada. O 7-AAD liga-se ao DNA da célula e atua como um indicador de integridade estrutural de membrana já que não é capaz de atravessar a membrana íntegra. Assim a população celular pode ser dividida em: células viáveis [(-) anexina (-) 7-AAD]; em início de processo de morte celular [(+) anexin (-) 7-AAD]; em fase tardia de processo de morte celular programada [(+) anexina (+) 7-AAD]; e em processos de necrose [(-) anexina(+) 7-AAD].

As células foram semeadas em placas de 6 compartimentos na densidade entre 5×10^5 e 1×10^6 / 2 mL de meio RPMI + 5% SFB. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido, o tratamento foi realizado em duplicata, nas concentrações de 40 µM para o composto luteolina e 3000 µM para o quimioterápico TMZ, utilizado como controle, durante 24 horas. Após a incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e posteriormente lavadas com PBS. Foram transferidos 100 µL de suspensão clular para um microtubo e adicionados 100 µL de *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences), durante 20 minutos no escuro, conforme as recomendações do fabricante e então as suspensões foram analisadas no citômetro.

3.5.3 Avaliação da perda do potencial de membrana mitocondrial (MMP)

Este teste baseia-se na capacidade da mitocôndria em sequestrar o marcador fluorescente *MitoStuatus Red*. Quando a mitocôndria apresenta potencial transmembrânico inalterado, as células incorporam o marcador emitindo alta fluorescência. Alterações no potencial transmembrânico levam ao efluxo do *MitoStuatus Red* de dentro para fora da mitocôndria, gerando eventos com menor fluorescência quando comparados a células integras.

As células foram semeadas em placas de 6 compartimentos na densidade entre 5×10^5 e 1×10^6 / 2 mL de meio RPMI + 5% SFB. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido, o tratamento foi realizado em duplicata com luteolina (40 µM) e, como controle, foi utilizado DMSO durante o tratamento de 24 horas. Após esse período o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS e em seguida incubadas com o reagente *MitoStatus Red* (BD Biosciences) (1µL/ mL/ compartimento por 30 minutos), posteriormente foram tripsinizadas conforme as recomendações do fabricante e então suspensão celular foi analisada no citômetro.

3.6 Western Blotting

Para a análise das vias de sinalização, as células U251 foram cultivadas em frascos T75 contendo meio RPMI-1640 (5% SFB + 1% PS) até a passagem ideal (6^a à 9^a passagem) para a realização do ensaio. Após este momento, o meio de cultura do frasco T75 foi removido utilizando bomba de compressão, este foi lavado com 2 mL de tampão PBS, foi adicionado 1 mL de tripsina e levado à estufa por 3 minutos. Foi feita a inativação da tripsina utilizando 3 mL de meio de cultura. A partir da suspensão celular formada, foi realizada a contagem do número de células utilizando corante azul de tripan em câmara de Neubauer. As células foram então semeadas em placas de 6 compartimentos na densidade entre 5×10^5 e 1×10^6 / 2 mL de meio RPMI + 5% SFB. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido, o tratamento foi realizado em duplicata, nas concentrações de 40 µM para o composto luteolina e 3000 µM para o quimioterápico TMZ, utilizado como controle, durante 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas com tampão PBS e em seguida homogeneizadas em tampão de lise contendo 50mM Tris pH 7.6–8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 10mM NaF, 10mM Na₄P₂O₇, 1% NP-40, suplementadas com um coquetel de inibidores de protease (1mM DTT, 1µg/ mL leupeptina hemissulfato, 1µg/ mL aprotinina, 1mM PSMF, 1mM EDTA) (950 µL de tampão de lise e 50 µL de solução de inibidores por compartimento) por 1 hora, seguido por centrifugação a 13.000g à 4°C por 15 minutos. A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o reagente Bradford (Bio-Rad), de acordo com instruções do fabricante. Logo após, 20 µg do extrato total de proteínas de cada amostra foi separado por SDS-PAGE 10% (amperagem 400, velocidade 100 por aproximadamente 2 horas) e transferido para membranas de nitrocelulose (Hybond-C™ Extra, Amersham Biosciences). As membranas

foram então bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBST (salina tris-tamponada com *Tween*) e incubadas com os anticorpos primários para proteínas totais e fosforiladas. Como controle endógeno foi utilizada a α -tubulina. Os anticorpos primários utilizados estão descritos na TABELA 5.

TABELA 5: Relação de anticorpos primários utilizados nos ensaios de *Western Blotting*.

Anticorpo Primário	Isotipo	Fabricante
anti-PARP clivada (Asp214)	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signalling</i>
anti-p44/42 MAPK (ERK1/2)	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signalling</i>
anti-p-H2AX histona (Ser139)	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signalling</i>
α -tubulina	<i>Mouse mAb</i>	<i>Cell signalling</i>
Anti-Caspase 9	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signalling</i>

Os anticorpos anti-PARP clivada, α -tubulina e Anti-Caspase 9 foram diluídos em TBST + BSA 5% e utilizados a uma diluição de 1:1000; já para o anti-p-ERK, e p-H2AX foram diluídos em TBST + BSA a uma diluição 1:500. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-mouse ou anti-rabbit) e a membrana foi revelada pelo método de quimioluminescência ECL (GE). A detecção do sinal quimioluminescente foi realizada por meio do sistema de fotodocumentação Image Quant LAS 4000 mini (GE) e, posteriormente, as bandas foram analisadas e quantificadas utilizando o software Image J, obtendo o índice de densidade óptica de cada anticorpo utilizado neste projeto. Para esta quantificação utilizou-se a fórmula:

$$\frac{\text{Proteína de interesse/ proteína normalizadora } (\alpha\text{-tubulina)}}{\text{= normalização em pixels}}$$

3.7 Análise estatística

Para a rejeição da hipótese de nulidade (luteolina não apresenta potencial antiproliferativo) e adoção da hipótese alternativa (luteolina apresenta potencial antiproliferativo), os dados foram avaliados como médias \pm desvio padrão. Foi realizada análise de variância (ANOVA e ANOVA *Two Way*) seguida pelos pós testes Bonferron, Tukey, Teste T. Foram considerados significativos e estatísticos os valores de p menores que 0.05 ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

Inicialmente a atividade antiproliferativa de 21 amostras (detalhadas anteriormente na TABELA 3) foi avaliada frente ao painel de diversas linhagens tumorais (cérebro, mama, ovário resistente, pulmão, rim, próstata, cólon e uma linhagem celular não tumoral- queratinócito), utilizando o método colorimétrico MTT. A TABELA 6 evidencia, em vermelho, os valores de GI_{50} , ou seja, a concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular, das linhagens tumorais mais sensíveis às amostras, considerando estes os mais promissores.

TABELA 6. Valores de GI_{50} das amostras, após 48 horas de incubação, expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

(continua)

Amostra	U251	MCF-7	ADR/RES	786-0	H460	PC-3	HT-29	HaCaT
Cloridrato de doxorubicina	0,02	-	30,59	4,97	0,75	3,19	14,88	0,29
RM1	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	>100
RM2	>100	>100	>100	-	>100	-	92,86	>100
RM3	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	>100
RM4	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	>100
Rab	95,78	>100	>100	-	>100	-	>100	>100
Rab DCM	29,70	27,42	>100	-	29,13	-	66,94	>100
ABF	91,09	>100	>100	-	>100	-	>100	>100
Mplc-1	16,45	34,62	63,56	-	20,94	-	19,97	74,36
Mplc-2	11,89	22,89	>100	-	11,42	-	14,04	>100
Mplc-3	13,41	43,44	>100	-	13,06	-	6,90	79,78
Cab	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	>100
Cab DCM	48,84	62,29	>100	-	75,25	-	41,02	>100

(continuação)

Amostra	U251	MCF-7	ADR/RES	786-0	H460	PC-3	HT-29	HaCaT
E.CAR	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	>100
E.CAVA	>100	>100	>100	-	>100	-	>100	>100
RUTINA	>100	-	>100	>100	>100	>100	>100	>100
APIGENINA	>100	-	>100	>100	>100	>100	>100	-
QUERCETINA	>100	-	>100	>100	>100	>100	>100	>100
QUERCITRINA	>100	-	>100	>100	>100	>100	>100	>100
LUTEOLINA	2,60	-	4,26	16,94	2,48	7,43	17,31	2,18
Rab10	>100	-	>100	>100	>100	>100	>100	94,46
Rabec	55,73	-	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Foram realizadas triplicatas biológicas. Linhagens tumorais humanas: U251- glioma; MCF-7-mama; NCI/ADR-RES -ovário resistente; 786-0- rim; NCI-H460- pulmão; PC-3- próstata; HT-29- colon. Linhagem humana não tumoral: HaCaT- queratinócito. – Não avaliado.

A partir das curvas obtidas para avaliar o efeito antiproliferativo das amostras, calculou-se a média dos valores de GI₅₀ conforme apresentado na TABELA 6. Dentre os compostos avaliados, a luteolina (FIGURA 6 e TABELA 7) obteve os menores valores de GI₅₀ para a maioria das linhagens avaliadas, ou seja, foi o mais efetivo dentre todas as amostras testadas, se tornando assim, o objeto de estudo do presente trabalho.

TABELA 7: Valores de GI₅₀ do flavonoide luteolina, após 48 horas de incubação, expressos em µM.

Amostra	U251	ADR/RES	786-0	H460	PC-3	HT-29	HaCat
Cloridrato de Doxorubicina	0,03	52,55	8,57	1,28	5,79	25,58	0,5
Luteolina	10,0	16,4	65,1	12,4	28,6	66,6	8,4

Foram realizadas triplicatas biológicas. U251- glioma; MCF-7-mama; NCI/ADR-RES -ovário resistente; 786-0- rim; NCI-H460- pulmão; PC-3- próstata; HT-29- colon; HaCaT- queratinócito – linhagem não tumoral.

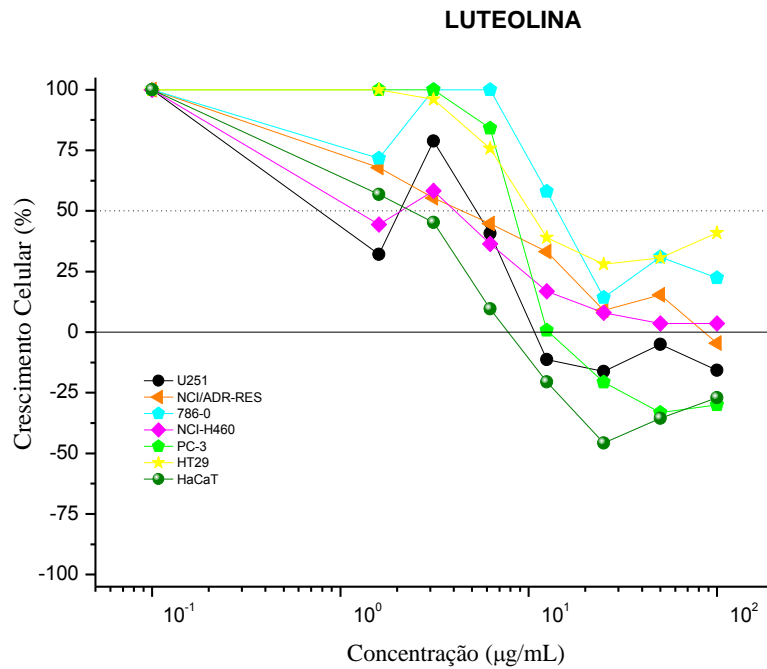


FIGURA 6: Atividade antiproliferativa da luteolina. Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento *versus* concentração, após 48 horas de incubação. Linhagens tumorais humanas: U251- glioma; MCF-7-mama; NCI/ADR-RES -ovário resistente; 786-0- rim; NCI-H460- pulmão; PC-3- próstata; HT-29- colon; linhagem não tumoral humana HaCaT- queratinócito.

Os gliomas e glioblastomas malignos são os tipos mais comuns de tumores cerebrais primários, associados com um mau prognóstico e uma pequena sobrevida dos pacientes (OMURO; DEANGELIS, 2013). Sendo assim, visando descobrir uma nova droga eficaz no tratamento desse tipo tumoral e, tendo em vista que a linhagem U251 (glioma) foi uma das mais sensíveis à luteolina, esta linhagem foi selecionada para as etapas seguintes do estudo.

Um ensaio que mimetiza o processo de migração celular é o *scratch wound healing* assay, por avaliar a retomada das células para o local onde foi realizada a ranhura. Assim, a luteolina foi avaliada quanto a capacidade de inibir a migração celular. Observou-se que somente 23% da ranhura havia sido fechada após 24 horas de exposição ao composto luteolina, já o controle DMSO levou a um fechamento de 56%. Passadas 48 horas de tratamento, esta diferença acentuou-se ainda mais, pois tratamento com a luteolina resultou em fechamento da ranhura de 27%, ao passo que o controle DMSO apresentou fechamento de 95% (FIGURAS 7 e 8). Desta forma, a luteolina parece interferir no processo de migração de células da linhagem U251.

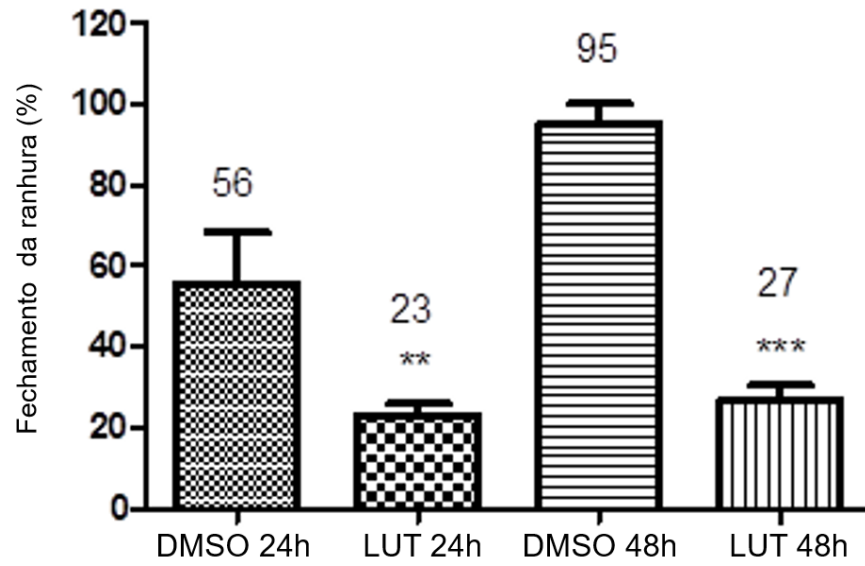


FIGURA 7: Fechamento de ranhura (%) em linhagem U251 ao longo do tempo de tratamento (24 e 48 horas). Ensaio realizado em duplicata experimental e biológica. Tratamento: DMSO (1%) e LUT (10 μ M). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA, teste Tukey).

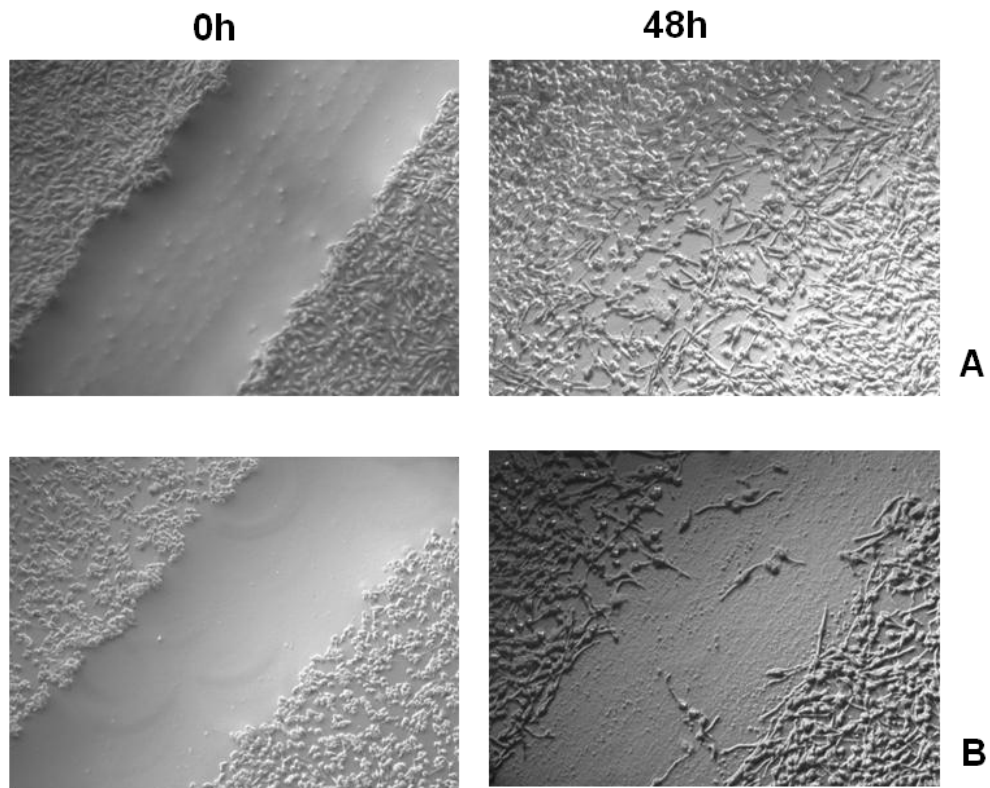


FIGURA 8: Fotomicrografias representativas do efeito do tratamento com controle DMSO (A) e 10 μ M de luteolina (B) no processo de migração de células U251 após 48 horas.

Além disso, a luteolina foi capaz de reduzir em 82% do número de colônias de células U251 formadas comparando com o tratamento com DMSO (FIGURA 9). Como observado na FIGURA 10 fica claramente explícito que o número de colônias formadas no tratamento com o controle DMSO (A) foi muito maior do que número de colônias formadas com o tratamento com luteolina (B). Analisando este resultado foi possível inferir que este composto atua inibindo os mecanismos de replicação de células da linhagem U251.

Segundo Franken e colaboradores (2006) é possível calcular a eficiência do plaqueamento, ou seja, quantas células sem tratamento efetivamente formaram colônias e, a partir disso, calcular a fração sobrevivente. De acordo com a fórmula abaixo, pode-se inferir que o tratamento com luteolina permitiu que apenas 17,7% das colônias originais conseguissem sobreviver.

$$PE = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colônias formadas sem tratamento}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células}} \times 100$$

PE = eficiência de plaqueamento.

$$SF = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colônias formadas após tratamento}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células}} \times PE$$

SF= Fração de sobrevivência.

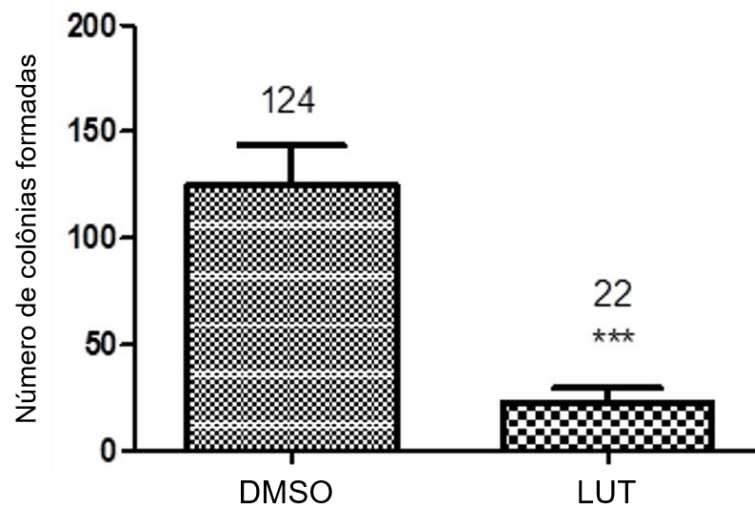


FIGURA 9: Número de colônias U251 formadas. Tratamento: controle DMSO e 10 μ M da luteolina ao final da incubação por 21 dias. *** $p < 0,001$ (ANOVA, teste Tukey).

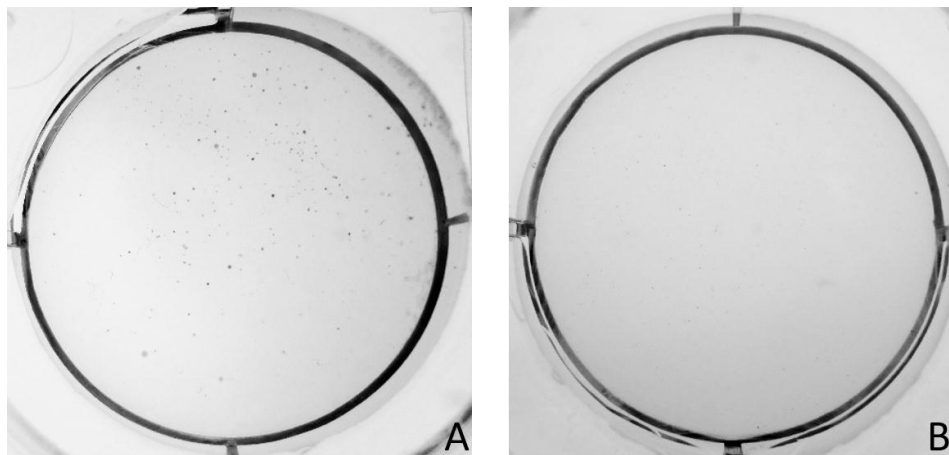


FIGURA 10: Fotografias dos poços celulares contendo linhagem U251. Tratamento: controle DMSO (A) e 10 μM da luteolina (B) ao final da incubação por 21 dias.

Fotomicrografias (FIGURA 11) das células da linhagem U251 tratadas com DMSO e crescentes concentrações de luteolina (10, 20 e 40 μM) foram obtidas (microscópio invertido Zeiss, objetiva 40X) nos tempos 24 e 48 horas. Após 48 horas de tratamento, a luteolina na concentração 40 μM provocou vacuolização celular, considerado um processo degenerativo (FIGURA 11 B). A partir destas imagens foi possível determinar as concentrações e os tempos dos ensaios de ciclo celular e morte celular, sendo:

- 20 e 40 μM para o ensaio de ciclo celular em 24 horas de tratamento;
- 40 μM para os ensaios de morte celular em 24 horas de tratamento.

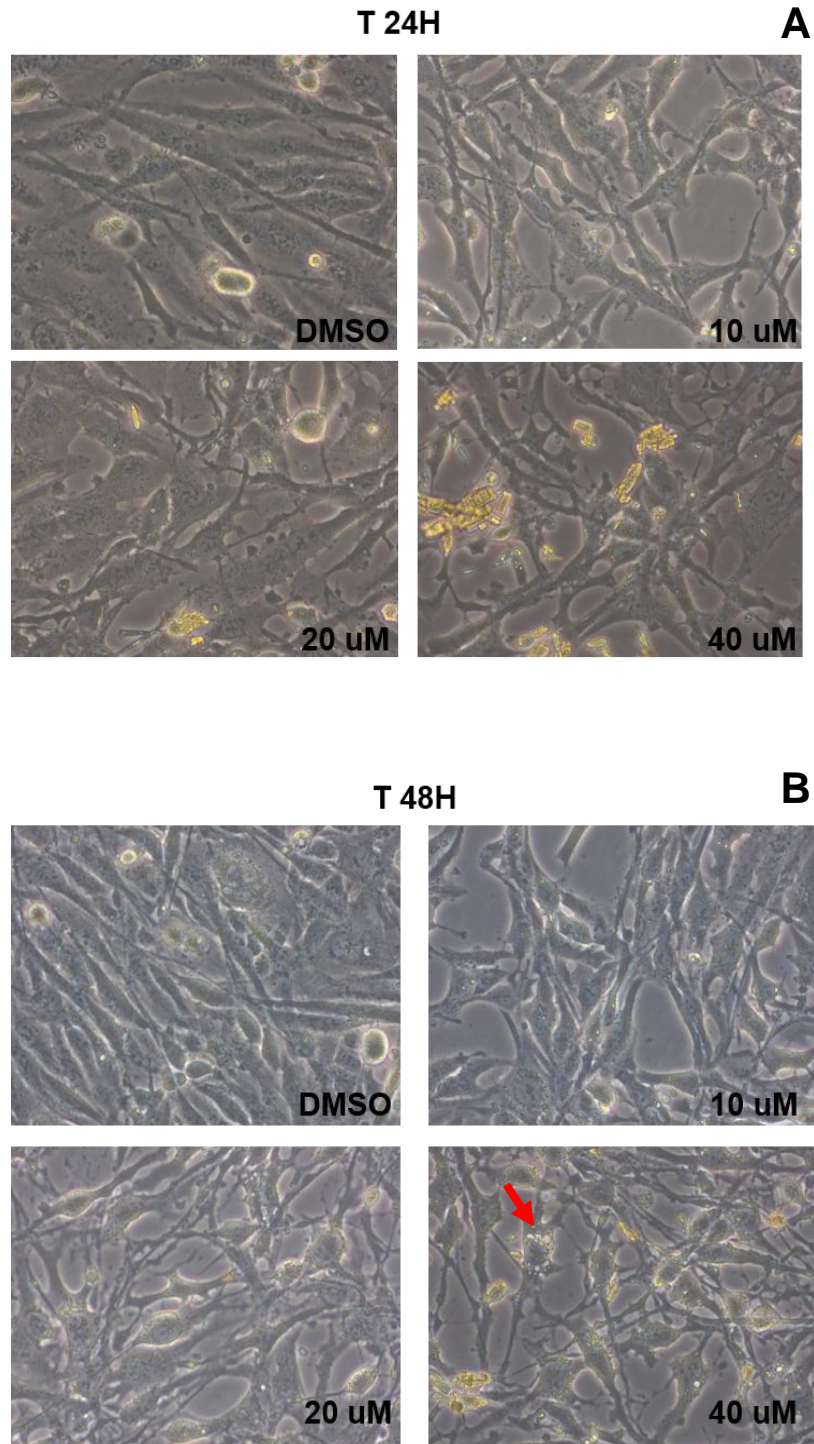


FIGURA 11: Morfologia da linhagem U251 tratada em diferentes concentrações (10, 20 e 40 μM de) luteolina após 24 (A) e 48 (B) horas de tratamento comparadas com o controle DMSO. A partir da imagem é possível observar células em processos de vacuolização (indicado pela seta).

O quimioterápico de escolha mais comumente utilizado na clínica para o tratamento de gliomas é a temozolamida (TMZ) (ALRWAS et al., 2014; MITTAL et al., 2015), e, por isso, foi realizada uma análise comparativa entre a média dos valores de GI_{50} do composto luteolina em relação ao quimioterápico padrão TMZ. Como observado na FIGURA 12 e TABELA 8, a TMZ apresentou valores de GI_{50} maiores do que os observados para a luteolina nos três tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas).

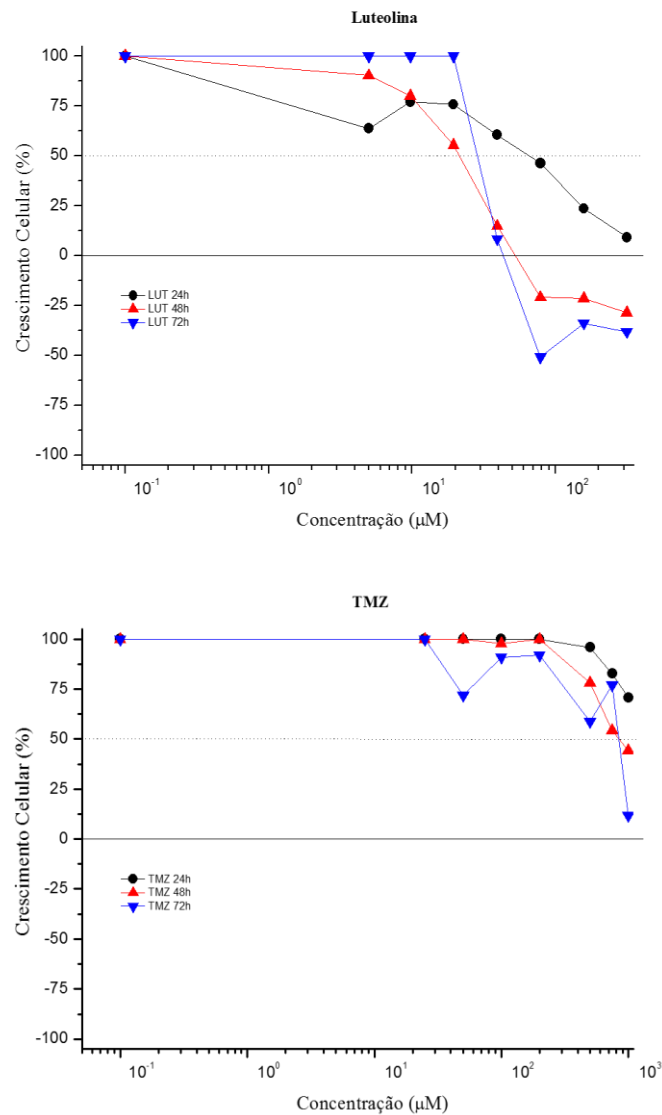


FIGURA 12: Crescimento celular (%) da linhagem U251, comparando o tratamento com a luteolina e o quimioterápico TMZ nos tempos 24, 48 e 72 horas. Concentrações avaliadas TMZ: de 50 a 1000 µM e LUTEOLINA de 5 a 314 µM.

TABELA 8: Valores de GI_{50} para luteolina (LUT) e TMZ na linhagem U251 após 24, 48 e 72 horas de exposição. Valores expressos em μM .

	GI_{50}	TMZ	LUT
24h		1353,9	47,14
48h		873,0	10
72h		719,5	35,14

Com os valores de GI_{50} obtidos, foi possível calcular também o índice de seletividade (IS) da luteolina e da TMZ em relação à linhagem de astrócito não tumoral (NHA) (TABELA 9 e FIGURA 13). Os valores do índice de seletividade obtidos para luteolina (1,65) e TMZ (0,06) indicam que a seletividade foi menor que 2,0 para os dois tratamentos, sendo assim não foram seletivos em relação ao astrócito não tumoral, considerando-se os critérios do NCI (seletividade significativa para valores de IS maiores ou iguais a 2,0) (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

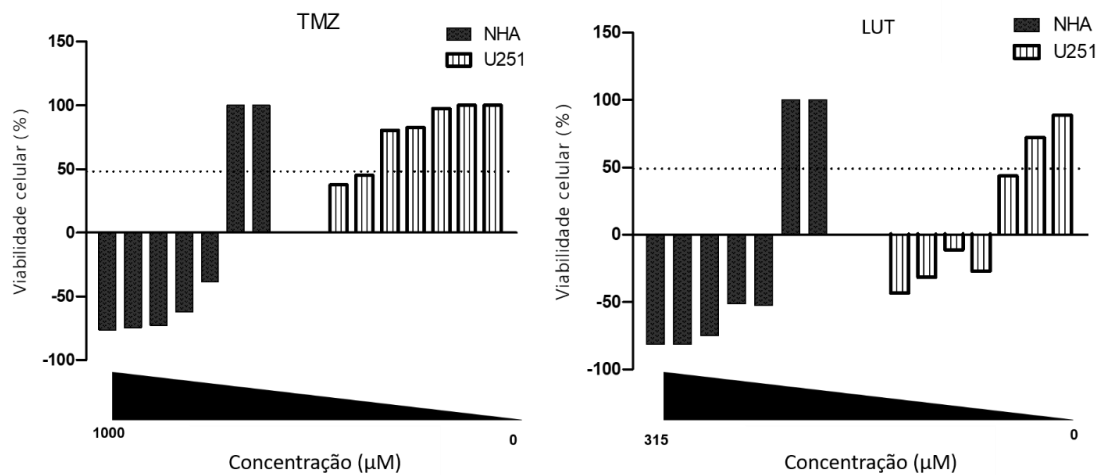


FIGURA 13: Crescimento celular (%) da linhagem NHA (não tumoral) e U251 (tumoral) comparando o tratamento com a luteolina e o quimioterápico TMZ em 48 horas de tratamento.

TABELA 9: Índice de seletividade (IS) para luteolina e quimioterápico TMZ.

	Linhagem	LUTEOLINA	TMZ
GI50 (μM)	NHA	16,51	47,49
GI50 (μM)	U251	10	775
	IS	1,65	0,06

Cálculo utilizado: GI50 linhagem não tumoral/GI50 linhagem tumoral

Continuando a caracterização do efeito antiproliferativo da luteolina, avaliou-se a influência deste composto sobre o ciclo celular, externalização de resíduos de fosfatidilserina e potencial de membrana mitocondrial através da técnica de citometria de fluxo. Para tanto, primeiramente foi realizada a quantificação de células U251 nos diferentes estágios do ciclo celular (sub-G0, G0/G1, S e G2/M). O tratamento foi realizado utilizando duas concentrações diferentes de luteolina (20 e 40 μM) e uma de TMZ (1000 μM) após 24 horas de exposição (FIGURAS 14 e 15).

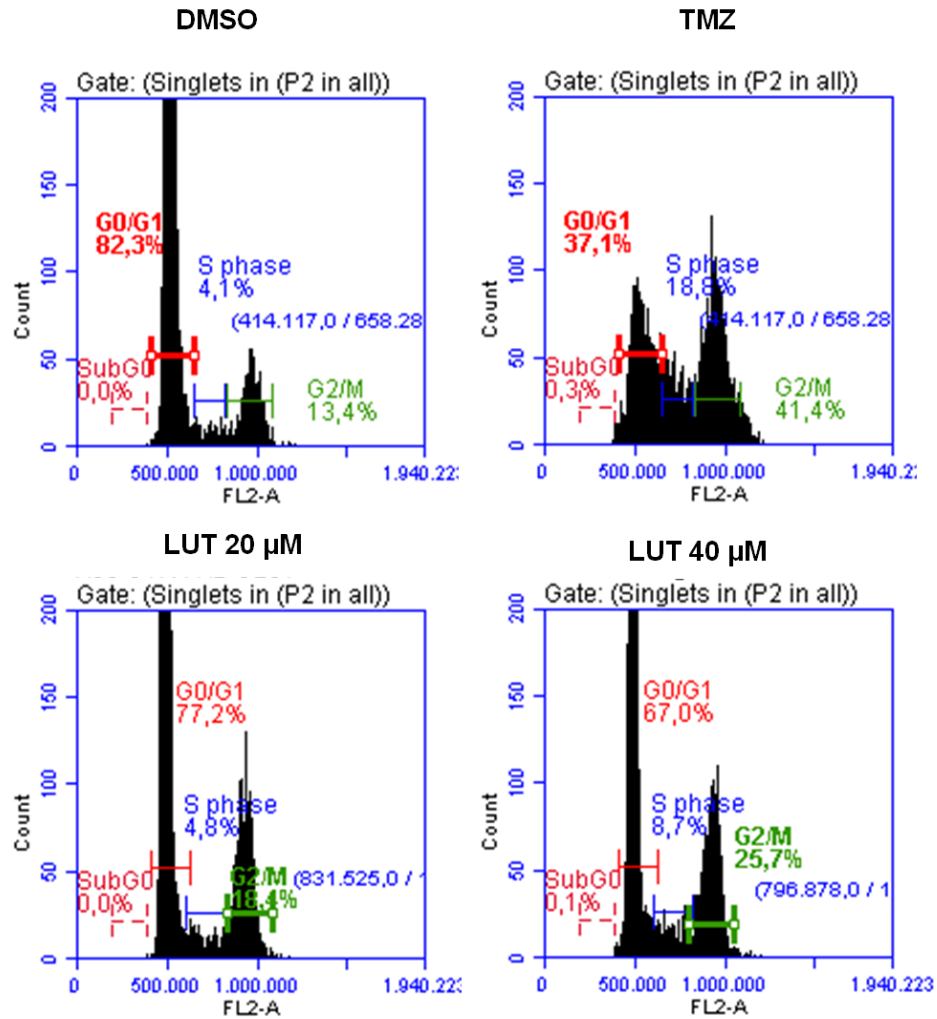


FIGURA 14: Número de células U251 (%) em diferentes fases do ciclo celular: SubG0, G0/G1, S e G2/M. Ensaio realizado em triplicata experimental e duplicata biológica. Tratamento: LUTEOLINA 20 e 40 μM e TMZ 1000 μM após 24 horas de exposição.

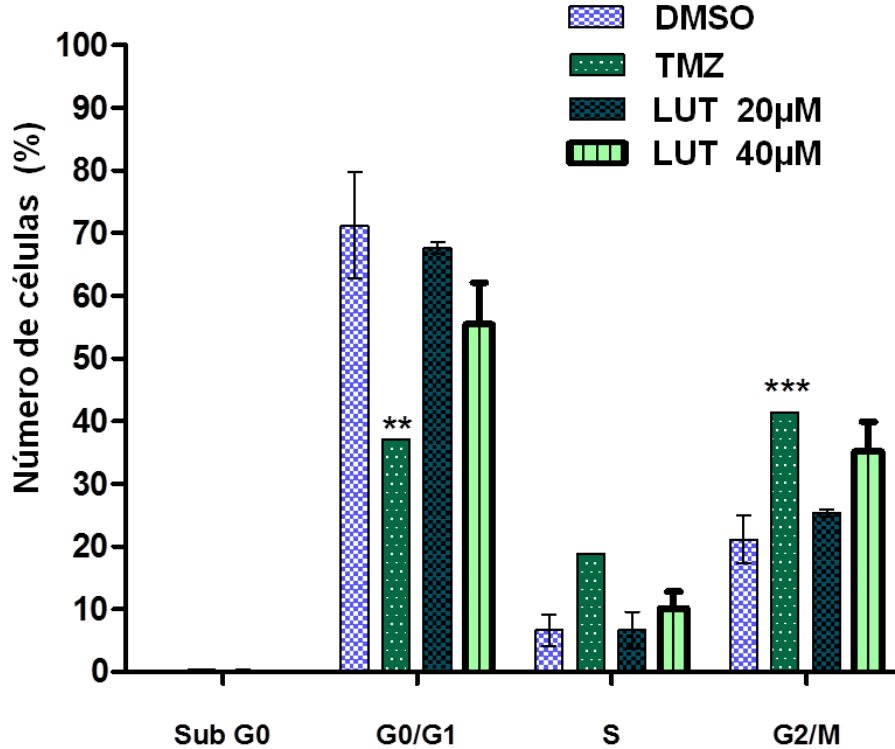


FIGURA 15: Número de células U251 (%) em diferentes estágios do ciclo celular: SubG0, G0/G1, S e G2/M. Ensaio realizado em triplicata experimental e duplicata biológica. Tratamento: LUTEOLINA 20 e 40 µM e TMZ 1000 µM após 24 horas de exposição. ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ (two-way ANOVA: Bonferroni).

Os resultados obtidos evidenciam que a luteolina não teve influência nas fases do ciclo celular após 24 horas de incubação, já a TMZ levou a uma parada do ciclo celular na fase G2/M.

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada também para detectar a quantidade total de células tratadas com luteolina que apresentaram resíduos de fosfatidilserina externalizada em suas membranas (marcador de alguns processos de morte celular programada, como apoptose). Conforme apresentado nas FIGURAS 16 e 17 a concentração de 40 µM de luteolina elevou o número de células (44,85 ± 1,9) duplamente marcadas com anexina e 7-AAD (processo tardio de morte celular programada) em relação ao controle DMSO (8,7 ± 5,7), além de provocar uma diminuição do número de células viáveis (DMSO 78,20 ± 7,35 e luteolina 36,75 ± 7,8) ou seja, duplamente negativas para anexina e 7-AAD.

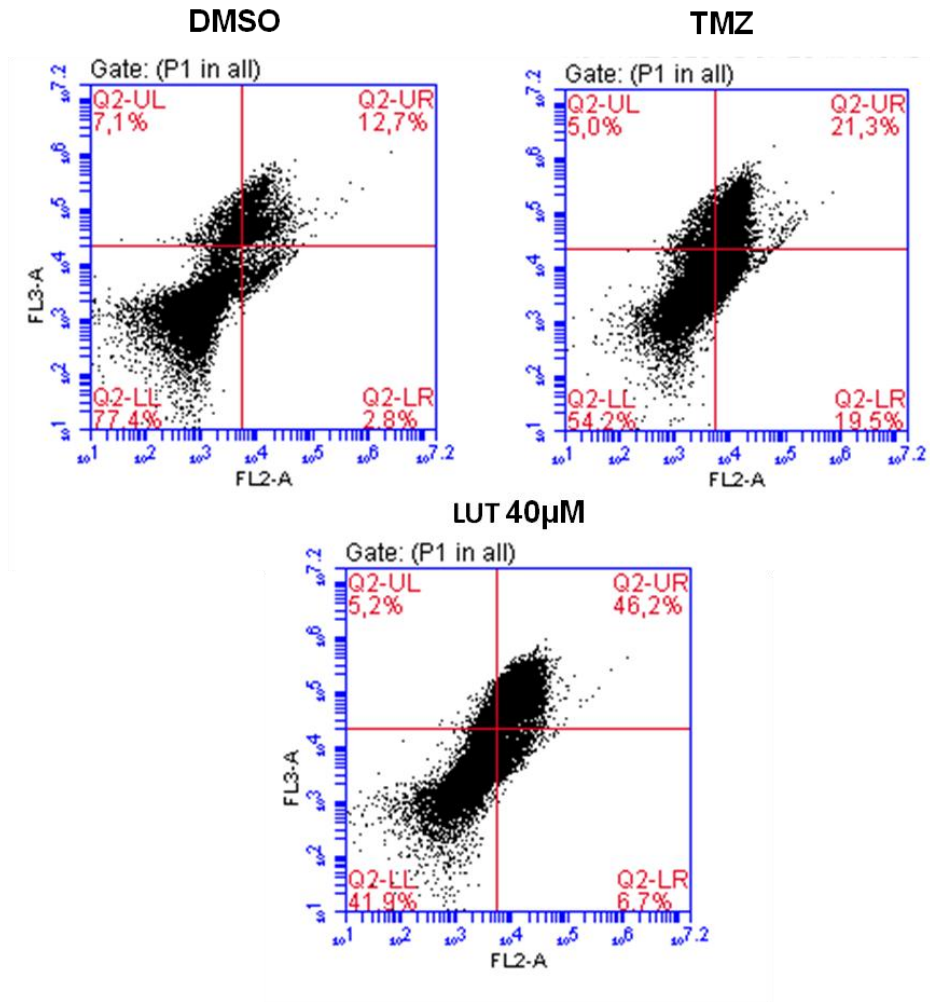


FIGURA 16: Porcentagem de células U251 em diferentes estágios de morte celular. Células viáveis (-) anexina (-) 7- AAD; em início de processo de morte celular (+) anexina (-) 7-AAD; em fase tardia de processo de morte celular programada (+) anexina (+) 7-AAD; e em processos de necrose (-) anexina(+)
7-AAD. Ensaio realizado em triplicata experimental e duplicata biológica. Tratamento: LUTEOLINA 40 µM / TMZ 3000 µM após 24 horas de exposição.

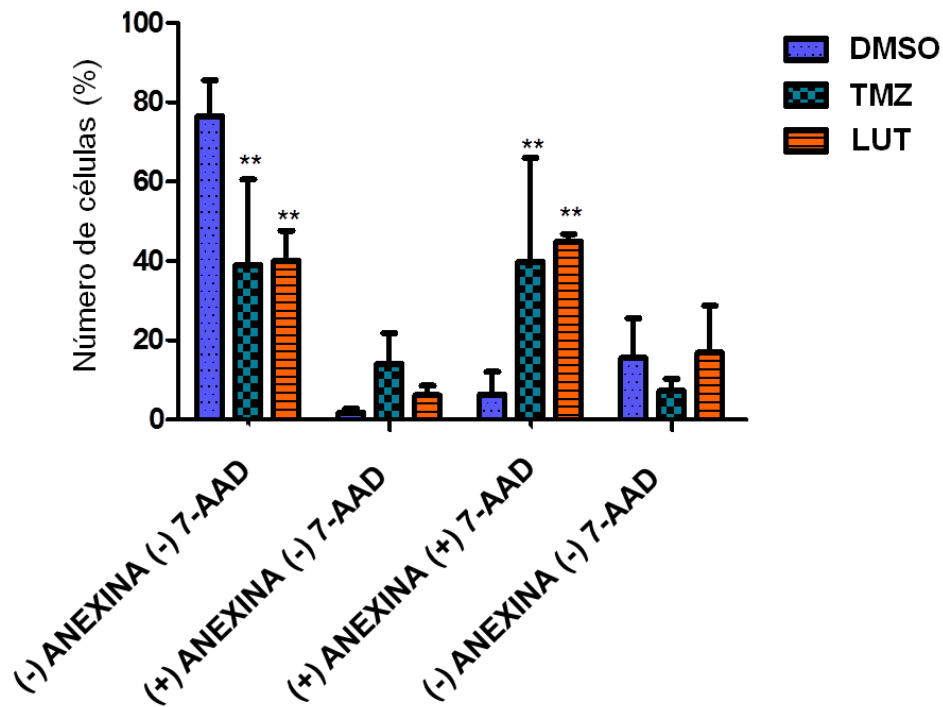


FIGURA 17: Número de células U251 (%) em diferentes estágios de morte celular. Células viáveis (-) anexina (-) 7- AAD; em início de processo de morte celular (+) anexina (-) 7-AAD; em fase tardia de processo de morte celular programada (+) anexina (+) 7-AAD; e em processos de necrose (-) anexina(+) 7-AAD. Ensaio realizado em triplicata experimental e duplicata biológica. Tratamento: LUTEOLINA 40 μ M / TMZ 3000 μ M após 24 horas de exposição. ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ (two-way ANOVA: Bonferroni).

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental nos processos de morte celular programada. Um dos eventos que nelas ocorre, denominado perda de potencial de membrana mitocondrial (MMP) ou despolarização de membrana mitocondrial, leva à desestabilização dos poros mitocondriais, por meio dos quais componentes mitocondriais são liberados (como por exemplo, citocromo c) que levam à ativação de uma cascata de reações que culminam em morte celular programada. A despolarização da membrana mitocondrial acontece nos processos de apoptose intrínseca dependente de caspases, o que não ocorre nas vias independentes (GALLUZZI et al., 2012). Sendo assim, foi realizada a avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial de células U251 tratadas com luteolina 40 μ M por 24 horas de tratamento. Como descrito nas FIGURAS 18 e 19, foi possível observar um aumento na despolarização das células tratadas ($22,2 \pm 5,6$) em relação ao controle DMSO ($7,5 \pm 1,4$).

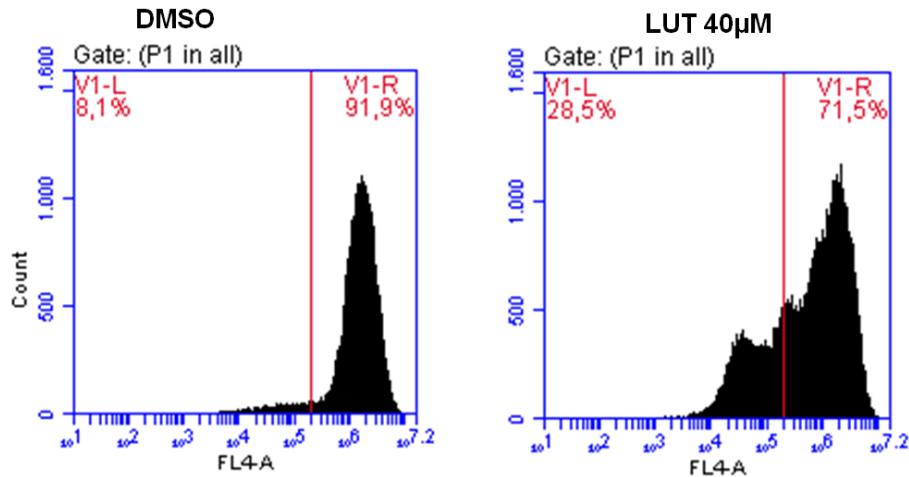


FIGURA 18: Número de células U251 (%) despolarizadas e polarizadas. Ensaio realizado em duplicata experimental e biológica Tratamento: LUTEOLINA 40 µM após 24 horas de exposição.

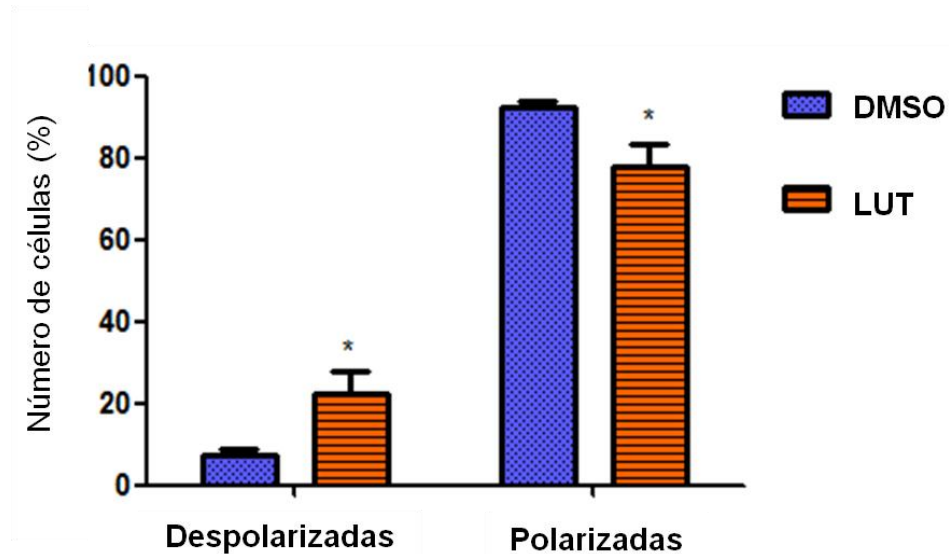


FIGURA 19: Número de células U251 (%) despolarizadas e polarizadas após tratamento com luteolina comparadas ao controle DMSO. Ensaio realizado em duplicata experimental e biológica. Tratamento: LUTEOLINA 40 µM após 24 horas de exposição. * $p < 0,05$ (ANOVA: Bonferroni).

Finalmente, a expressão de algumas proteínas envolvidas com a via intrínseca da apoptose foi investigada através da técnica de Western Blotting. Após o tratamento de células

U251 com a luteolina, foi possível observar clivagem de caspase 9 e da proteína PARP, além do aumento da expressão da proteína ERK e aumento da expressão da fosforilação das proteínas ERK (p-ERK) e H2AX (p-H2AX), quando comparadas com os controles negativo (DMSO) e positivo (TMZ). Esses resultados sugerem em parte que a luteolina pode estar induzindo morte por apoptose através da via intrínseca (FIGURAS 20 e 21).

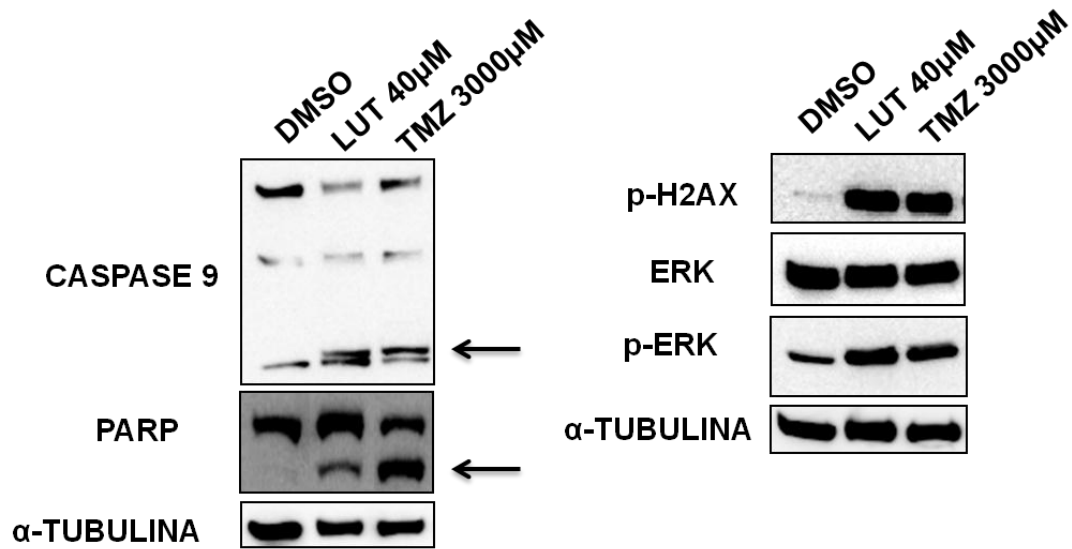


FIGURA 20: Efeito da LUTEOLINA e TMZ na modulação da expressão das proteínas cleaved-PARP, ERK, p-ERK, p-H2AX e cleaved-Caspase 9 analisadas por *Western blotting* na linhagem U251. Controle endógeno: α-tubulina. Tratamento LUTEOLINA 40 µM e TMZ 3000 µM e controle DMSO (1%) após 24 horas de exposição. As clivagens de proteínas estão indicadas pela seta preta.

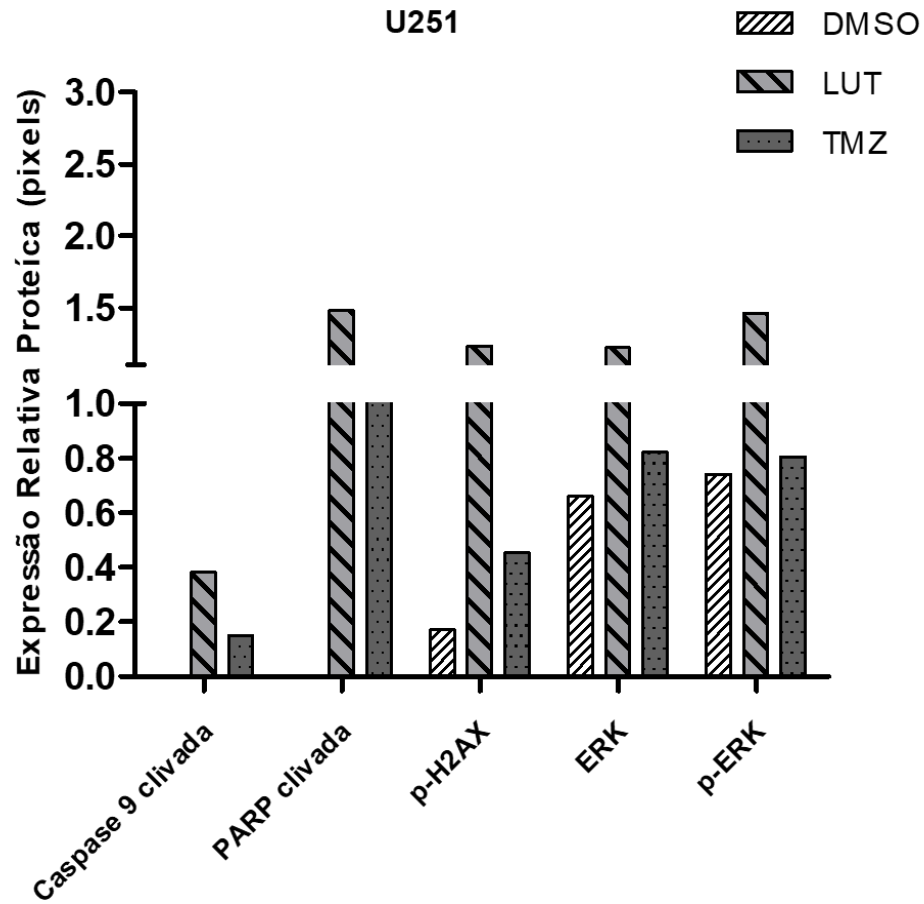


FIGURA 21: Níveis de expressão da atividade das proteínas cleaved-PARP, ERK, p-ERK, p-H2AX e cleaved-Caspase 9. As proteínas foram quantificadas pelo programa *ImageJ*. Os gráficos são representativos de um único experimento.

Em suma, a luteolina inibiu a migração celular e formação de colônias sem interferir no ciclo celular, com o aumento na subpopulação de células com externalização de fosfatidilserina e perda de integridade de membrana associada a pequena, porém significativa, despolarização de membrana mitocondrial e aumento da expressão de caspase 9 clivada, PARP clivada, p-H2AX, ERK e ERK fosforilada.

5 DISCUSSÃO

O câncer constitui um importante problema de saúde pública mundial e é considerada a segunda maior causa de morte no mundo (dentre as doenças não infecciosas) ficando atrás somente de doenças cardiovasculares. Portanto, se faz necessária cada vez mais a busca de novas diretrizes voltadas para o aprimoramento e a melhoria de terapias não convencionais. A descoberta de novos fármacos derivados de plantas medicinais (metabólitos secundários e derivados) tem apresentado um papel importante no tratamento do câncer. De todos os fármacos antitumorais disponíveis entre 1940 e 2014, 77% foram originados de produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Já são muitos os fármacos de origem vegetal que vem auxiliando na resposta terapêutica de alguns tipos de câncer, como vincristina, etoposídeo e paclitaxel, que apresentam expressiva atividade antitumoral contra vários tipos de tumores malignos (DA ROCHA, et al., 2001). Contudo, a busca por novas moléculas de origem vegetal sempre oferece uma grande oportunidade para avaliar não somente novas classes químicas de agentes antitumorais, mas também mecanismos de ação novos e potencialmente relevantes.

O gênero *Arrabidaea* pertencente à família Bignoniaceae, a qual é encontrada principalmente em regiões tropicais, com cerca de 120 gêneros e 800 espécies de plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No cenário brasileiro, esta família apresenta 56 gêneros e cerca de 338 espécies, possuindo uma diversidade enorme de princípios ativos com diversos efeitos farmacológicos (ROCHA et al., 2014).

O flavonoide luteolina foi extraído das folhas da espécie vegetal *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (sinonímia botânica: *Fridericia platyphylla*). Durante o desenvolvimento deste estudo, buscou-se avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* desse flavonoide, bem como elucidar seu possível mecanismo de ação na linhagem celular tumoral de glioblastoma (U251).

Primeiramente o composto foi avaliado frente a um painel de diversas linhagens tumorais e uma não tumoral. De acordo com os resultados, a luteolina apresentou baixos valores de GI50 para todas as linhagens testadas, sendo a linhagem U251 (glioblastoma) a mais sensível e, portanto, selecionada para prosseguir com os ensaios. O valor de GI50, ou seja, a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular para esta linhagem, foi de apenas 10 μ M (2,6 μ g/ mL). Na literatura são encontrados alguns estudos acerca do potencial antiproliferativo da luteolina em linhagens celulares de glioblastoma. CHENG e

colaboradores (2013) utilizaram concentrações antiproliferativas semelhantes às obtidas neste trabalho para as linhagens U-87 MG e T98G; outro estudo realizado com a linhagem U251 apresentou resultados antiproliferativos com concentrações menores que 40 μ M (WANG, et al., 2017b). Estes estudos utilizaram luteolina comercial para o tratamento das linhagens celulares. JEREMIC e colegas (2013) relataram que extratos brutos da espécie *Sideritis scardica* contendo em sua composição luteolina e luteolina-7-O-glicosido apresentaram valores de IC50 entre 80 e 100 μ g/ mL para a linhagem C6.

Gliomas altamente agressivos são caracterizados por invasão e migração das células tumorais para os tecidos adjacentes normais e/ou neurais. São encontrados em áreas de difícil acesso para a remoção completa do tumor, e quando esta ocorre, as células tumorais que permanecem após a ressecção cirúrgica têm a capacidade de migrar e invadir áreas cerebrais circundantes, sendo que a maioria dos tumores se repetem dentro de uma margem de 2 cm do local de ressecção original (PAN et al., 2015; COLQUHOUN, 2017). Alguns processos celulares, incluindo a degradação da matriz extracelular (MEC), a relação transição epitélio-mesenquima (EMT), angiogênese tumoral, desenvolvimento de um microambiente inflamatório, além de alterações nos mecanismos de morte celular, estão envolvidos com um estágio mais avançado dessa metastização de células, que é um passo-chave da progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2010). Uma maneira de resolver esse problema seria inibir efetivamente vias de sinalização que controlam a migração celular e a invasão ou replicação celular.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho a luteolina foi capaz de inibir a migração celular da linhagem U251 além de inibir a replicação celular em condições independentes de ancoragem, isto é, capacidade de crescer em um meio semi-sólido. O crescimento de células em ágar *soft* é uma das características marcantes do crescimento celular descontrolado, pois, células não tumorais normalmente não são capazes de crescer em matrizes semi-sólidas. Este ensaio é amplamente utilizado para validar alvos terapêuticos contra o câncer (STEVEN, et al., 2007). Como descrito por Wang e colaboradores 2017, a luteolina é capaz de dificultar a migração celular da linhagem U251 e U87MG através da inibição da via p-IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR, que está envolvida na regulação da migração celular de células tumorais, comprovando os resultados obtidos neste trabalho.

Estudos recentes apontam que os flavonoides são capazes de inibir a migração, invasão e proliferação celular de várias linhagens tumorais. O flavonoide acacetina inibe a invasão e migração celular da linhagem DU-145 (próstata) atuando via inativação da via de sinalização MAPK (SHEN et al., 2010); o flavonoide apigenina induz a supressão da

proliferação, migração e invasão celular em câncer colorretal (linhagens SW480 e HCT15) via inibição da via de sinalização Wnt/ β -catenina (XU et al., 2016); outros autores relatam também que o flavonoide denominado nobiletina age interrompendo o ciclo celular e suprimindo vias de sinalização MAPK e AKT, impedindo desta forma o crescimento e migração celular em linhagem celular tumoral de glioma (Hs683 e U87MG) (LIEN et al., 2016). Outro estudo recente descreve que a quercetina pode inibir a viabilidade e migração celular e promover apoptose em células de glioma humano suprimindo as vias de sinalização RAS/MAPK/ERK e PI3K/AKT (PAN et al., 2015). No que se refere à luteolina, um estudo utilizando sua forma comercial evidenciou a inibição da migração e invasão celular em células tumorais e estaminais (CSCs) da linhagem SNB19 (CHAKRABARTI; RAY, 2015).

Algumas características marcantes do câncer como proliferação descontrolada e perda do controle do ciclo celular, devido a alterações no controle genético da divisão celular, são muito importantes para o entendimento e descoberta de novos fármacos que atuem efetivamente contra esta patologia. Assim, numerosas estratégias terapêuticas têm como alvo algumas fases do ciclo celular. O ciclo celular pode ser dividido, didaticamente, em cinco fases, a saber, G0 (gap 0), G1, S (síntese), G2 e M (mitose). As primeiras quatro fases correspondem à interfase. Em G0, as células estão em estado de repouso e podem permanecer neste estágio por toda a sua vida útil. Quando necessário, os fatores de crescimento externos são capazes de estimular essas células para entrar em G1, estágio em que os mRNAs e proteínas necessárias são sintetizados para que ocorra posteriormente a replicação de DNA na fase S. Em G2, a replicação do DNA é monitorada e a célula se prepara para sofrer mitose. A mitose por sua vez, compreende e cinco fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. Nesta fase M, os cromossomos e citoplasma dividem-se em duas células filhas (citocinese) (DOMINGUEZ-BRAUER et al., 2015).

Vários estudos relataram envolvimento de flavonoides com a parada do ciclo celular, como por exemplo, a quercetina que levou a parada do ciclo celular em células tumorais de câncer cervical, leucemia, câncer de mama entre outros tipos tumorais (RICHTER, et al., 1999; YUAN, et al. 2012; SRIVASTAVA et al.; 2016); e a apigenina (WANG, et al., 2000). A luteolina na concentração avaliada neste estudo não induziu a parada do ciclo celular; já a TMZ, como descrito na literatura, levou a uma parada do ciclo em G2/M (FILIPPI-CHIELA et al., 2013; SHEN et al., 2014; BARCISZEWSKA et al., 2015).

Dados da literatura publicados por TSAI e colaboradores (2010) mostraram que a luteolina foi capaz de induzir a parada do ciclo celular na fase G2/M de células de glioblastoma GBM8401 e U87MG. Este ensaio foi realizado em linhagens diferentes da apresentada no

presente estudo. Assim, a ausência de influência no ciclo celular pode ser devido a uma resposta particular da linhagem U251. A luteolina promoveu parada do ciclo celular e indução de apoptose em linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231 através da diminuição da expressão de AKT, PLK1, ciclina B1, ciclina A, CDC2, CDK2, Bcl-2 e Bcl-xL, além de aumentar a expressão de Bax, caspase-3 e p21 (LEE; OH; SUNG, et al., 2012). A luteolina também levou à parada do ciclo celular de células de câncer de colon (HCT-15) através da sinalização Wnt / β -

A apoptose é um dos tipos de morte celular mais bem estudadas, é descrita como um processo no qual célula, após receber algum sinal pró-apoptótico, dispara o mecanismo de morte celular, sofrendo compactação e segregação da cromatina, condensação do citoplasma e encolhimento celular, fragmentação nuclear, fragmentação celular (blebbing da membrana) e, finalmente, fragmentação celular em corpos apoptóticos, que são fagocitados por células fagocíticas. A maior parte destes processos é executada por proteínas caspases (proteases cisteíno-aspárticas), ativadas em uma cascata coordenada de clivagens das formas pré-ativas para formas ativas. Entre as caspases há moléculas iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e outras executoras (caspases 3, 6 e 7) do processo, as quais realizam a proteólise de componentes celulares que acabam levando às alterações típicas de apoptose citadas acima.

A apoptose é caracterizada pela externalização de fosfatidilserina da membrana plasmática, além de ser um mecanismo de morte celular que requer a ativação e a execução de uma série de moléculas reguladoras (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013). As mitocôndrias são o principal local de origem para os sinais de iniciação de apoptose, embora este tipo de morte/destruição celular possa ocorrer por uma via extramitocondrial. Alguns dos sinais apoptóticos incluem alteração no sistema de transporte de elétrons, perda do potencial transmembrânico e/ou membrana mitocondrial (MMP), falha na homeostase do fluxo de Ca^{+2} , além de aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de ativadores de caspases. O estágio inicial da apoptose é marcado por uma alteração no MMP, que precede a fragmentação do DNA (KIM et. al., 2011).

No presente estudo, através da técnica de citometria de fluxo, foi possível observar que a luteolina levou a um aumento de células U251 duplamente marcadas com anexina-V e 7AAD, ou seja, células que apresentavam fosfatidilserina externalizada e membrana plasmática permeabilizada, indicando tratar de células em fase avançada do processo de morte celular.

A perda de MMP está intimamente ligada com processos de morte celular, principalmente a apoptose. Estudos realizados em diversas linhagens celulares revelam que os efeitos de compostos naturais nas vias intrínseca e extrínseca da apoptose estão relacionados

com aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) o que leva a uma despolarização da membrana mitocondrial, liberação do citocromo c e, conseqüentemente, ao aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, ativação de caspases e clivagem de PARP (RASUL et al., 2013). Os resultados obtidos revelam um aumento da despolarização da membrana mitocondrial em células U251 tratadas com a luteolina, o que seria mais um indicativo de que a atividade antiproliferativa do composto estaria relacionada com a via de morte celular denominada apoptose. Sendo assim, foram avaliadas algumas proteínas envolvidas com esta via de morte celular através da técnica de Western Blotting.

Primeiramente, a proteína ERK foi avaliada. ERK é uma proteína quinase (possui duas isoformas ERK1/ERK2) regulada por sinais extracelulares (MAPKs) e que, quando ativada, pode mediar mecanismos de proliferação e apoptose celular (MCCUBREY, et al., 2006; MEBRATU, et al., 2009; CAGNOL, et al., 2010). De acordo com os resultados, foi possível observar um aumento na expressão da proteína ERK fosforilada quando comparada com o controle, sugerindo que esta proteína possa estar envolvida com o mecanismo de ação da luteolina na linhagem U251. Alguns estudos que avaliaram a luteolina em linhagens de câncer de próstata e de carcinoma hepático (PC-3 e Hep-G2) demonstraram redução da proliferação celular associada à inibição da atividade de PTK e ativação de MAPK / ERK (LEE, et al, 2002).

Outra proteína avaliada foi a histona H2AX. Esta proteína contribui para a estabilidade do genoma através do seu papel na sinalização de eventos de dano do DNA (PINTO; FLAUS, 2010). Desta forma, foi observado um aumento expressivo da fosforilação desta histona nas células U251 após 24 horas de tratamento com luteolina. Dados da literatura relacionam danos ao DNA e estresse celular com alterações na sobrevivência celular e também na ativação de vias pró-apoptóticas (FRAGKOS, et al., 2009). A fosforilação de H2AX (γ H2AX) é um sinal precoce de danos ao DNA induzidos por estagnação da replicação; esta sinalização pode ocorrer para que os danos sejam reparados dentro da célula ou para dar início a um processo de morte celular programada. De acordo com a literatura, alguns compostos naturais são capazes de induzir danos ao DNA e conseqüentemente levar à indução de H2AX em células tumorais de hepatocarcinoma e de carcinomas renais (SU, et al., 2013; HSIEH, et al., 2015).

A proteína poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) também foi avaliada. Esta proteína possui regulação positiva em tumores, sendo muito importante para processos celulares como a apoptose. Ela está envolvida na regulação da homeostase celular, além de transcrição e reparo do DNA (KO, et al., 2014; RICKS, et al., 2015). Muitos estudos têm associado a clivagem desta proteína com a ativação da cascata de caspases culminando em mecanismo de

morte celular induzida por diversos compostos naturais (WANG, et al., 2013; LV, et al., 2013). Os nossos resultados demonstram que houve clivagem de PARP, indicando que a luteolina está intimamente associada com o processo de apoptose.

A apoptose, como já descrito anteriormente, é um mecanismo de morte celular caracterizado morfológicamente por condensação nuclear, encolhimento de células, formação de “blebs” de membrana e fragmentação de material genético. Este tipo de morte celular pode ser ou não dependente da ativação de caspases, que são uma família de cisteína proteases. As caspases iniciadoras (-2, -8, -9, -10, -11 e -12) estão intimamente ligadas aos sinais pro-apoptóticos. Uma vez clivadas, ativam as caspases efetoras (-3, -6 e -7), que por sua vez executam a apoptose (GALLUZI, et al., 2012; FUCHS; STELLER, 2001; INDRAN, et al., 2011). Considerando que a apoptose é dividida em via intrínseca e extrínseca, os produtos naturais podem ativar uma ou outra dessas vias.

A ativação da via extrínseca se dá através da interação de ligantes específicos aos receptores de mortes correspondentes presentes na membrana celular, como por exemplo, o receptor Fas e o receptor de morte DR-5, que são acoplados aos ligantes extracelulares Fas e o TRAIL, respectivamente, e que levam à ativação de caspases -8 e -10. Estas, indiretamente, podem levar à liberação de citocromo c da mitocôndria, após a MMP, e eventualmente, à apoptose (BORNER; ANDREWS, 2014; SAWAI, 2014).

A via mitocondrial ou intrínseca pode ser ativada por uma variedade de estímulos independentes de receptor, como radiação, radicais livres, infecções virais, entre outros. Esses gatilhos promovem mudanças na permeabilidade interna da membrana mitocondrial. As principais consequências desta mudança de permeabilidade são a perda de MMP e liberação de proteínas pró-apoptóticas. Quando moléculas pro-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2 (bax, bak, bcl-Xs) são translocadas do citoplasma para a mitocôndria ou há inibição das moléculas antiapoptóticas, ocorre dano à mitocôndria e liberação do citocromo c para o espaço intermembrana da mitocôndria no citoplasma. O citocromo c, por sua vez, se associa a Apaf-1 e procaspase-9 para formar o complexo denominado apoptossoma, resultando na ativação da caspase-9, que ativa proteoliticamente as caspases executoras -3, -6 e -7 (BORNER; ANDREWS, 2014; SAWAI, 2014). De acordo com os resultados apresentados para células U251, o tratamento com luteolina induziu clivagem de caspase 9, o que pode ser indicativo de apoptose por via intrínseca.

Os resultados obtidos até o presente momento permitem inferir que a luteolina leva a uma despolarização da membrana mitocondrial, que pode estar relacionada com aumento da produção de ROS, cuja atividade não foi avaliada neste estudo, entretanto, existem relatos na

literatura (WANG, et al., 2017a). Estas, por sua vez, estão envolvidas com a fosforilação da proteína ERK, que desencadeia clivagem de caspase 9 e, conseqüentemente, clivagem da proteína PARP (observada também para as linhagens U87 e GBM 8401 e ainda para adenocarcinoma de pulmão por CHEN e colaboradores (2012), bem como por TSAI (2013)), ou, ainda, a fosforilação de ERK leva à fosforilação da histona H2AX seguida de dano ao DNA. Esta ação já foi descrita na literatura para a linhagem tumoral de carcinoma de células orais escamosas (TJIOE; OLIVEIRA; GAVARD, 2016), porém ainda não foi descrita para linhagens de glioma/glioblastoma). Tanto a clivagem de PARP quanto a fosforilação de H2AX culminam no processo de morte celular denominado apoptose.

Portanto, a proposta para o mecanismo de ação da luteolina observado neste estudo encontra-se esquematizada na FIGURA 22.

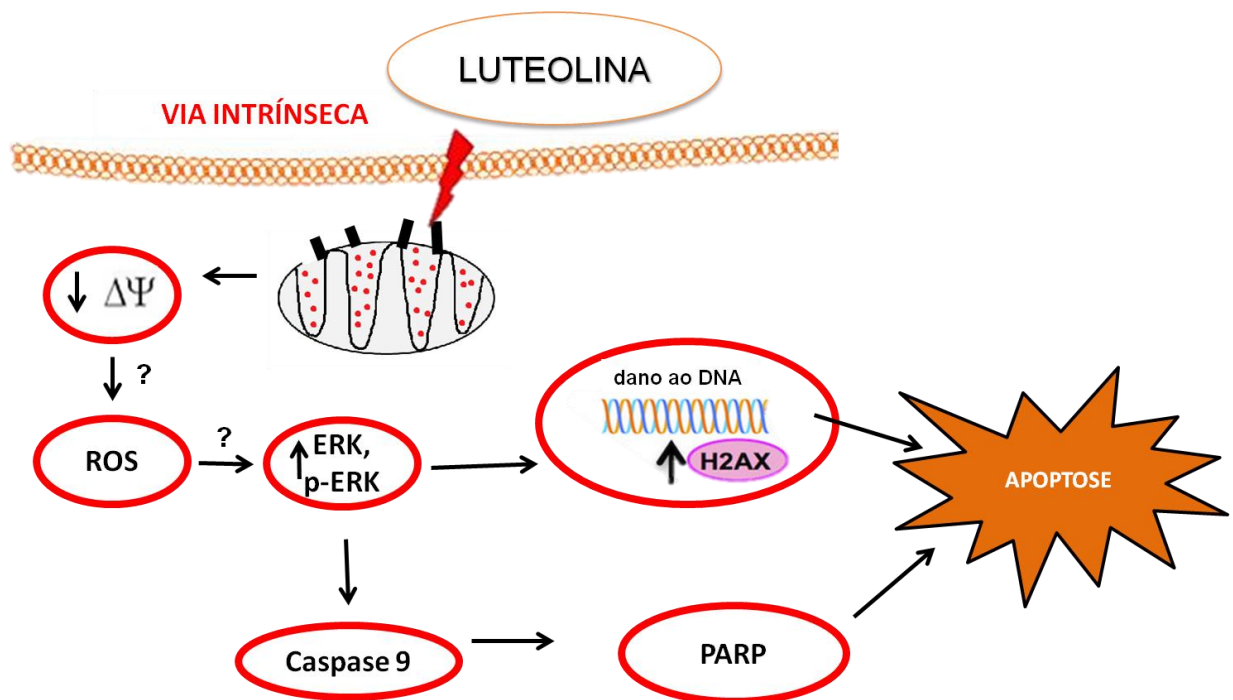


FIGURA 22: Diagrama proposto para o mecanismo de ação da luteolina na linhagem U251 (glioblastoma).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi investigado sistematicamente o efeito da luteolina sobre a linhagem celular tumoral de glioblastoma (U251). Foi possível observar que este flavonoide reduziu significativamente o potencial proliferativo dessa linhagem em 48 horas de tratamento e inibiu também a migração e replicação celular em condições independentes de ancoragem. Os dados acerca do mecanismo de ação sugerem que a luteolina seja capaz de induzir a apoptose pela via intrínseca através da despolarização da membrana mitocondrial, fosforilação de proteínas ERK, clivagem de caspase 9 e proteína PARP ou ainda fosforilação de histona H2AX seguido de dano ao DNA.

Outros ensaios devem ser realizados para avaliar a toxicidade, biodisponibilidade e ação do composto *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHINAV, K.; AQUILINA, K.; GBEJUADE, H.; LA, M.; HOPKINS, K.; IYER, V. A pilot study of glioblastoma multiforme in elderly patients: treatments, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) methylation status and survival. *Clinical Neurology Neurosurgery*, v. 115, n. 8, p. 1375-1378, 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da célula*. 5° ed. p. 1396, 2008.

ALCERITO, T.; BARBO, F.E.; NEGRI, G. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, n. 7, p. 677-683, 2002.

ALRWAS, A.; PAPADOPOULOS, N. E.; CAIN, S.; PATEL, S. P.; KIM, K. B.; DEBURR, T. L. Phase I trial of biochemotherapy with cisplatin, temozolomide, and dose escalation of nab-paclitaxel combined with interleukin-2 and interferon-alpha in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Research*, v. 24, n. 4, p.342-348, 2014.

APPIN, C. L.; BRAT, D. J. Molecular genetics of gliomas. *Cancer Journal*, v.20, n. 1, p. 66-72, 2014.

ARAÚJO, M. E. M. B.; FRANCO, Y. E. M.; MESSIAS, M.; LONGATO, G.; PAMPHILE, J.; CARVALHO, P. O.. Biocatalytic Synthesis of Flavonoid Esters by Lipases and Their Biological Benefits. *Planta Medica*, v. 83, p. 7-22, 2016.

ASHOKKUMAR, P.; SUDHANDIRAN, G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 62, p. 590-597, 2008.

BARCISZEWSKA, A. M.; GURDA, D.; GLODOWICZ, P.; NOWAK, S.; NASKRET-BARCISZEWSKA, M. Z. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. *PLoS One*, v. 10, n. 8, p. e0136669, 2015.

BARONCHELLI, S.; BENTIVEGNA, A.; REDAELLI, S.; RIVA, G.; BUTTA, V.; PAOLETTA, L.; ISIMBALDI, G.; MIOZZO, M.; TABANO, S.; DAGA, A.; MARUBBI, D.; CATTANEO, M.; BIUNNO, I.; DALPRÀ, L.; Delineating the cytogenomic and epigenomic landscapes of glioma stem cell lines. *PLoS One*, v. 8, n. 2, e57462, 2013.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição*, 15:285-292, 2004.

BERGHE, V. T.; VANLANGENAKKER, N.; PARTHOENS, E.; DECKERS, W.; DEVOS, M.; FESTJENS, N.; GUERIN, C. J.; BRUNK UT, D. W.; VANDENABEELE, P. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death & Differentiation*, v. 17, n. 6, p. 922-930, 2010.

BORNER, C.; ANDREWS, D. W. The apoptotic pore on mitochondria: are we breaking through or still stuck ? *Cell Death and Differentiation*, v.21, p. 187-191, 2014.

BOROWICZ, S.; VAN, S. M.; AVASARALA, S.; KARUPPUSAMY, R. M. K.; TAULER, J.; BIKKAVILLI, R. K.; WINN, R. A. The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, v. 27, n. 92, 2014.

BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; DOS SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil). *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 469-476, 2010.

CAGNOL, S.; CHAMBARD, J. C. *ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. The FEBS Journal*, v, 277, n. 1, p.2-21, 2010.

CHAKRABARTI, M.; RAY, S. K. Anti-tumor activities of luteolin and silibinin in glioblastoma cells: overexpression of miR-7-1-3p augmented luteolin and silibinin to inhibit autophagy and induce apoptosis in glioblastoma in vivo. *Apoptosis*, v. 21, n. 3, p. 312-328, 2016.

CHAKRABARTI, M.; RAY, S. K. Synergistic anti-tumor actions of luteolin and silibinin prevented cell migration and invasion and induced apoptosis in glioblastoma SNB19 cells and glioblastoma stem cells. *Brain Research*, v.1629, p. 85-93, 2015.

CHEN, Q.; LIU, S.; CHEN, J.; ZHANG, Q.; LIN, S.; CHEN, Z.; JIANG, J. Luteolin induces mitochondria-dependent apoptosis in human lung adenocarcinoma cell. *Natural Product Communications*, v. 7, n. 1, p. 29-31, 2012.

CHENG, W.; CHIAO, M.; LIANG, Y.; YANG, Y.; SHEN, C.; YANG, C. Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity. *Molecular Biology Reports*, v. 40, p. 5315-5326, 2013.

COLQUHOUN, A. Cell biology-metabolic crosstalk in glioma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 89, p. 171-181, 2017.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Virtual de Química*, 2(1): 47-58, 2010.

CRUCERU, M. L.; NEAGU, M.; DEMOULIN, J. B.; CONSTANTINESCU, S. N. Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 17, n. 10, p. 1218-1235, 2013.

DA ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 1, n. 4, p. 364-369, 2001.

DALBY, K. N.; TEKEDERELI, I.; LOPEZ-BERESTEIN, G. ; OZPOLAT, B. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*, v. 6, n. 3, Apr, p. 322-329. 2010.

DING, Z. B.; SHI, Y. H.; ZHOU, J.; QIU, S. J.; XU, Y.; DAI, Z.; SHI, G. M.; WANG, X. Y.; KE, A. W.; WU, B. ; FAN, J. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, v. 68, n. 22, Nov 15, p. 9167-9175. 2008.

DOLECEK, T. A.; PROPP, J. M.; STROUP, N. E.; KRUCHKO, C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncology*, v. 14, p. 45-49, 2012.

DOMINGUEZ-BRAUER, C.; THU, K. L.; MASON, J. M.; BLASER, H.; BRAY, M. R.; MAK, T. W. Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Molecular Cell*, v. 60, n. 4, p. 524-536, 2015.

FANG, S. C.; HSU, C. L.; LIN, H. T.; YEN, G, C. Anticancer effects of flavonoid derivatives isolated from *Millettia reticulata* Benth in SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2): 814–820, 2010.

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, v. 1, n. 15, p. 2315-2319, 2006.

FILIPPI-CHIELA, E. C.; THOME, M. P.; BUENO, E.; SILVA, M. M.; PELEGRINI, AL.; LEDUR, P. F.; GARICOCHEA, B. *Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells.* *BMC Cancer*, v. 13, p. 147, 2013.

FRAGKOS, M.; JURVANSUU, J.; BEARD, P. H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway. *Molecular and Cellular Biology*, v. 29, n. 10, p. 2828-2840, 2009.

FREIRE, L. H. M. D. S.; ALVES, F. Ação de extratos naturais sobre o câncer. *NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências*, v. 4, n. 08, p. 07-14, 2015.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease *Cell*, v. 147, n. 4, p. 742-758, 2011.

FURNARI, F. B.; FENTON, T.; BACHOO, R. M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J. M.; STEGH, A.; HAHN, W. C.; LIGON, K. L.; LOUIS, D. N.; BRENNAN, C.; CHIN, L.; DEPINHO, R. A.; CAVENEE, W. K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, v. 21, n. 21, p. 2683-2710, 2007.

GALLUZZI, L.; JOZA, N.; TASDEMIR, E.; MAIURI, M. C.; HENGARTNER, M.; ABRAMS, J. M. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differentiation*, v. 15, p. 1113-1123, 2008.

GALLUZZI, L.; VITALE, J. M.; ABRAMS, E. S.; ALNEMRI, E. H.; BAEHRECKE, M. V.; BLAGOSKLONNY, T. M.; DAWSON, V. L.; DAWSON, W. S.; EL-DEIRY, S.; FULDA, E.; GOTTLIE, D. R.; GREEN, M. O.; HENGARTNER, O.; KEPP, R. A.; KNIGHT, S.; KUMAR, S. A.; LIPTON, X.; LU, F.; MADEO, W.; MALORNI, P.; MEHLEN, G.; NUN, M. E.; PETER, M.; PIACENTINI, D. C.; RUBINSZTEIN, Y.; SHI, H-U.; SIMON, P.; VANDENABEELE, E.; WHITE,

J.; YUAN, B.; ZHIVOTOVSKY, G. M.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, v. 19, p. 107–120, 2012.

GANESAN, A. The Impact of Natural Products Upon Cancer Chemotherapy. In: Natural Products and Cancer Drug Discovery. *Humana Press*, p. 3-15, 2013.

GARCIA, F. Estudo fitoquímico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Química na Área de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

GRATAS, C.; Séry, Q.; Rabé, M.; Oliver, L.; Vallette, F. M. Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma. *Oncotarget*, v.; 5, p. 2428-2435, 2014.

GUPTA, M.; DJALILVAND, A.; BRAT, D. J. Clarifying the diffuse gliomas: an update on the morphologic features and markers that discriminate oligodendroglioma from astrocytoma. *American Journal of Clinical Pathology*, p.124, 2005.

HADJIPANAYIS, C. G.; VAN MEIR, E. G. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends in Molecular Medicine*, v. **15**, n. 11, p. 519-530 , 2009. (a)

HADJIPANAYIS, C. G.; VAN MEIR, E. G. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *Journal of Molecular Medicine*, v. 87, n. 4, p. 363-74, 2009. (b)

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70. 2000;

HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, v. 61, p. 90–97, 2013.

HOLLAND, E. C. GLIOMAGENESIS: genetic alterations and mouse models. *Nature Reviews Genetics*, v. 2, p. 120–129, 2001.

HSIEH, Y. H.; LEE, C. H.; CHEN, H. Y.; HSIEH, S. C.; LIN, C. L.; TSAI, J. P. Induction of cell cycle arrest, DNA damage, and apoptosis by nimbolide in human renal cell carcinoma cells. *Tumour Biology*, v. 36, n. 10, p. 7539-7547, 2015.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. www.inca.gov.br (Acesso em 18/05/2017).

INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1807, n. 6, p. 735-745, 2011.

JONES, C.; PERRYMAN, L.; HARGRAVE, D. Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 9, n. 7, p. 400-413, 2012.

JUNTTILA, M. R.; SAUVAGE, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, p. 346–354, 2013.

KARABIN, M.; HUDCOVA, T.; JELINEK, L.; DOSTALEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33:1063–1090, 2015.

KESARI, S. Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Seminars in Oncology*, v. 38 n. 4, p. 2-10, 2011.

KIM, D. I.; LEE, T.; LIM, I.; KIM, H.; LEE, Y.; KIM, C. Regulation of IGF-I production and proliferation of human leiomyomal smooth muscle cells by *Scutellaria barbata* D. Don in vitro: isolation of flavonoids of apigenin and luteolina as acting compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v.205, p.213-224, 2005.

KIM, K. Y.; YU, S. N.; LEE, S. Y.; CHUN, S. S.; CHOI, Y. L.; PARK, Y. M.; SONG, C. S.; CHATTERJEE, B.; AHN, S. C. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 16, n. 413, p. :80-86, 2011.

KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. K. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system, 2000.

KO, H. L.; REN, E. C. Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules*, v.2, n. 4, p. 524-548, 2012.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, PETER, G.; TSCHOPP, M. E.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

KUMAR, A.; REDONDO-MUÑOZ, J.; PEREZ-GARCIA, V.; CORTES, I.; CHAGOYEN, M.; CARRERA, A. Nuclear but not cytosolic phosphoinositide 3-kinase beta has an essential function in cell survival. *Molecular and Cellular Biology*, 31:2122- 2133, 2013.

LAI, A.; KHARBANDA, S.; POPE, W. B.; TRAN, A.; SOLIS, O. E.; PEALE, F. Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 34, p. 4482-4490, 2011.

LEE, E. J.; OH, S. Y.; SUNG, M. K. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 4136–4143, 2012.

LEE, H.J.; WANGA, C.J.; KUO, H.C.; CHOU, F.P.; JEAN, L.F.; TSENG, T.H. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 203, p. 124- 131, 2005.

LEE, K. H. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. *Journal Biomed Sciences*, 6:236-250, 1999.

LEE, L. T.; HUANG, Y. T.; HWANG, J. J.; LEE, P. P.; KE, F. C.; NAIR, M. P.; KANADASWAM, C.; LEE, M. T. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by

quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Research*, v. 22, p. 1615–1627, 2002.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007,

LIEN, L. M.; WANG, M. J.; CHEN, R. J.; CHIU, H. C.; WU, J. L.; SHEN, M. Y.; CHOU, D. S.; SHEU, J. R.; LIN, K. H.; LU, W. J. Nobiletin, a Polymethoxylated Flavone, Inhibits Glioma Cell Growth and Migration via Arresting Cell Cycle and Suppressing MAPK and Akt Pathways. *Phytother Research*, v. 30, n. 2, p. 214-21, ISSN 1099-1573, 2016.

LIN, Y.; SHI, R.; WANG, X.; SHEN, H, M. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, v. 8, n. 7, p. 634-646, 2008.

LITTLE, S. E.; POPOV, S.; JURY, A.; BAX, D. A.; DOEY, L.; AL-SARRAJ, S. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer Research*, v.72, n. 7, p. 1614-1620, 2012.

LONGATO, G. B. Atividade anticâncer e mecanismo de ação de compostos isolados das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*. 2014. Tese (Doutorado em biologia celular e estrutural na área de Biologia Celular)- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, Campinas, 2014.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CAVENEE, W. K. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, v. 131, n. 6, p. 803-20, 2016.

LV, L.; ZHENG, L.; DONG, D.; XU, L.; YIN, L.; XU, Y. Dioscin, a natural steroid saponin, induces apoptosis and DNA damage through reactive oxygen species: a potential new drug for treatment of glioblastoma multiforme. *Food Chemistry Toxicology*, v. 59, p. 657-669, 2013.

MCCUBREY, J. A.; STEELMAN, L. S.; CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L.; WONG, E. W.; CHANG, F. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 773, n. 8, p. 1263-1284, 2007.

MEBRATU, Y.; TESFAIGZI, Y. *How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?* *Cell Cycle*, v. 8, n. 8, 1168-1175, 2009.

MEETEREN, M. E.; HENDRIKS, J. J. A.; DIJKSTRA, C. D.; TOL, E. A. F. Dietary compounds prevent oxidative damage and nitric oxide production by cells involved in demyelinating disease. *Biochemical Pharmacology*, v. 67, p. 967-975, 2004.

MERCADER, A. G.; POMILIO, A. B. Naturally-occurring dimers of flavonoids as anticarcinogens. *Anticancer Agents Medicinal Chemistry*, 13:1217–1235, 2013.

MERCADER, M. T., LUCAS-ABELLÁN, C., GABALDÓN, J. A., FORTEA, M. I., MARTÍNEZCACHÁ, A., & NUÑEZ-DELICADO, E. Kaempferol Complexation in Cyclodextrins at Basic pH. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 58:4675–4680, 2010.

MERCADER-ROS, M. T., LUCAS-ABELLÁN, C., FORTEA, M. I., MARTÍNEZ-CACHÁ, A., GABASILVALDÓN, J. A., & NÚÑEZ-DELICADO, E. Quercetin: Dietary sources, functions and health benefits. *Nova Science Publishers*, 179–198, 2013.

MICHELS, G.; WATJEN, W.; NIERING, P.; STEFFAN, B.; TRAN THI, Q. H.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKOTTER, A.; BAST, A.; PROKSCH, P.; KAHL, R. Proapoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology*, v. 206, p. 337-348, 2005.

MILLIMOUNO, F. M.; DONG, J.; YANG, L.; LI, J.; LI, X. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer and Perspectives with Natural Compounds from Mother Nature. *Cancer Prevention Research*, v. 7, n. 11, p. 1081-1910, 2014.

MIRANDA-FILHO, A.; PIÑEROS, M.; SOERJOMATARAM, I.; DELTOUR, I.; BRAY, F. Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence. *Neuro-Oncology*, v.19, n. 2, p. 270–280, 2017.

MITTAL, S.; PRADHAN, S.; SRIVASTAVA, T. Recent advances in targeted therapy for glioblastoma. *Expert Review Neurotherapeutics*, v. 28, p. 1-12, 2015.

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

MULDOON, L. L.; SOUSSAIN, C.; JAHNKE, K. Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check,” *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 16, p. 2295–2305, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as Sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal Natuarl Products*, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 629–666, 2016.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Journal of the American Medical Association*, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, 2013.

ORFALI, G. C.; DUARTE, A. C.; BONADIO, V.; MARTINEZ, N. P.; ARAÚJO, M. E. M. B.; PRIVIERO, F. B. M.; CARVALHO, P. O.; PRIOLLI, D. G. Review of anticancer mechanisms of isoquercitin. *World Journal of Clinical Oncology*, v.7, n. 2, p. 189-199, 2016.

PAN, H. C.; JIANG, Q.; YU, Y.; MEI, J. P.; CUI, Y. K.; ZHAO, W. J. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *Neurochem Int*, v. 80, p. 60-71, ISSN 1872-9754, 2015.

PANDURANGAN, A. K.; DHARMALINGAM, P.; SADAGOPAN, S. K.; RAMAR, M.; MUNUSAMY, A.; GANAPASAM, S. Luteolin induces growth arrest in colon cancer cells through involvement of Wnt/beta-catenin/GSK-3beta signaling. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, v. 32, p. 131–139, 2013.

PINTO, D. M.; FLAUS, A. Structure and function of histone H2AX. *Sub-cellular Biochemistry*, v. 50 p. 55-78, 2010.

RASUL, A.; BAO, R.; MALHI, M.; ZHAO, B.; TSUJI, I.; LI, J. Induction of apoptosis by costunolide in bladder cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial dysfunction. *Molecules*, v. 18, p. 1418–1433, 2013.

RAVISHANKAR, D.; RAJORA, A. K.; GRECO, F.; OSBORN, H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45:2821–2831, 2013.

RICHTER, M.; EBERMANN, R.; MARIAN, B. Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling. *Nature Cancer*, v. 34, p.88–99, 1999.

RICKS, T. K.; CHIU, H. J.; ISON, G.; KIM, G.; MCKEE, A. E.; KLUETZ, P. Successes and Challenges of PARP Inhibitors in Cancer Therapy. *Frontiers Oncology*, v. 5, .222, 2015.

ROCHA, C. Q.; VILELA, F. C.; SANTA-CECÍLIA, F. V.; CAVALCANTE, G. P.; VILEGAS, W.; GIUSTI-PAIVA, A.; SANTOS, M. H. Oleanane-type triterpenoid: an anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25:228–232, 2014.

ROCHA, C.Q.; QUEIROZ, E.F.; MEIRA, C.S.; MOREIRA, D.R.; SOARES, M.B.; MARCOURT, L.; VILEGAS, W.; WOLFENDER, J.L. Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-*Trypanosoma cruzi* activity *Journal Natural Products*, v. 77, p. 1345–1350, 2014.

ROCHA, C.Q.; VILELA, F.C.; CAVALCANTE, G.P.; SANTA-CECÍLIA, F.V.; SANTOS-E-SILVA, L.; DOS SANTOS, M.H.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. *Journal Ethnopharmacology*, v. 133, p. 396–401, 2011.

SAWAI, L. Characterization of TNF-induced caspase-independent necroptosis. *Leukemia Research*, v. 38, p. 706–713, 2014.

SHEN, W.; HU, J.; ZHENG, J. S. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. *Journal of International Medical Research*, v. 42, n. 1, p.164-172, 2014.

SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A. Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinician*, v. 63, p. 11–30, 2013.

SILVA, M. M.; IRIGUCHI, E. K.K.; KASSUYA, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; SOUZA, K. P.; FORMAGIO, A. S. N. *Schinus terebinthifolius*: phenolic constituents and *in vitro* antioxidant, antiproliferative and *in vivo* anti-inflammatory activities. *Revista brasileira de farmacognosia*. v.27, n.4, 2017.

SILVA, M. M.; QUEIROZ, L.P. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, v. 3, n. ½, p. 3-21, 2003.

SRIVASTAVA, S.; SOMASAGARA, R. R., HEGDE, M.; NISHANA, M.; TAD, S. K.; SRIVASTAVA, M.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S. C. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Scientific Reports*, v. 12, n. 6, p. 24049, 2016.

STEVEN, A. N.; DANLI, L.; TOWNE, D. J. B.; WARRIOR, U. A High-Throughput Soft Agar Assay for Identification of Anticancer Compound. *Journal Biomol Screen*, v. 12, p. 938, 2007.

STUPP, R.; MASON, W. P.; VAN, D. B. M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 10, .987-996, 2005.

STURM, D.; WITT, H.; HOVESTADT, V.; KHUONG-QUANG, D. A.; JONES, D. T.; KONERMANN, C. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*, v. 22, n. 4, p. 425-437, 2012.

SU, J.; LAI, H.; CHEN, J.; LI, L.; WONG, Y. S.; CHEN, T. Natural borneol, a monoterpenoid compound, potentiates selenocystine-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by enhancement of cellular uptake and activation of ROS-mediated DNA damage. *PLoS One*, v. 8, n. 5, p. e63502, 2013.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity*. Edited by Hostettmann K. London: Academic 1990, 71–133.

SUTANDYO, N. Nutritional Carcinogenesis. *Acta Medica Indonesiana*, v. 42, n.1, p.36- 42, 2010.

SZERLIP, N. J.; PEDRAZA, A.; CHAKRAVARTY, D.; AZIM, M.; MCGUIRE, J.; FANG, Y. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 8, p. 3041-3346, 2012.

TELFORD, W. G.; KOMORIYA, A.; PACKARD, B. Z.; BAGWELL, C. B. Multiparametric analysis of apoptosis by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, v. 699, p.203, 2011.

THAPA, R. J. et al. NF-kappaB protects cells from gamma interferon-induced RIP1-dependent necroptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 31(14): 2934- 46, 2011.

TJIOE, K. C.; OLIVEIRA, D. T.; GAVARD, J. Luteolin Impacts on the DNA Damage Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Nutrition and Cancer*, v. 68, 2016.

TSAI, Y.; CHEN, H.; HSU, H.; LU, K.; LIANG, C.; LILIANG, P.; WANG, K.; WANG, H.; WANG, C.; HOUNG, J. Luteolin inhibits proliferation of human glioblastoma cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44, p. 837–845, 2013.

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 a cure for malignant glioma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 60, n. 3, p. 166-93. , 2010.

VANDENABEELE, P.; GALLUZZI, L.; VANDEN, B. T.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 11, n. 10, p. 700-714, 2010.

WANG, Q.; WANG, H.; JIA, Y.; PAN, H.; DING, H. Luteolin induces apoptosis by ROS/ER stress and mitochondrial dysfunction in glioblastoma. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, v. 79, n. 5, p.1031-104, 2017. (a)

WANG, Q.; WANG, H.; JIA, Y.; PAN, H.; DING, H. Luteolin reduces migration of human glioblastoma cell lines via inhibition of the p-IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncology Letters* v. 14, p. 3545-3551, 2017. (b)

WANG, S. G.; HUANG, M. H.; LI, J. H.; LAI, F. I.; LEE, H. M.; HSU, Y. N. Punicalagin induces apoptotic and autophagic cell death in human U87MG glioma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 34, n. 11, p. 1411-1419, 2013.

WANG, W.; HEIDEMAN, L.; CHUNG, C. S.; PELLING, J. C.; KOEHLER, K. J.; BIRT, D. F. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Molecular Carcinogenesis*, v. 28, n. 2, p. 102-110, 2000.

WEINBERG, R. A. A biologia do câncer. *Artmed*, v. 864, 2008.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 5, p. 492-507, 2008.

WING-CHEUNG, H.; LEUNG, A.; CHAO-LIN, K. B.; WEN-HUI, Y. C.; CHIA-HSIEN, L. D.; HONG-ZIN, L. E. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis, *European Journal of Pharmacology*, v. 534, p. 12-18, 2006.

XIAO, J.; MUZASHVILID, T. S.; GEORGIEVE, M. I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. *Biotechnology Advances*, 32(6):1145-56, 2014.

XU, M.; WANG, S.; SONG, Y.; YAO, J.; HUANG, K.; ZHU, Z. Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology Letters*, v. 11, p. 3075-3080, 2016.

YUAN, Z. Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt. *Molecular Biology Reports*, v. 39, p. 7785-7793, 2012.

YUE, P. Y.; LEUNG, E.P.; MAK, N. K.; WONG, R.N. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *Journal of Biomolecular Screening*, 15(4):427-33, 2010.

ZHU, Y.; PARADA, L. F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 8, p. 616-626, 2002.