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

GABRIEL ALVES BONAFÉ

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E CITOTÓXICA DO GLICIRRIZINATO DIPOTÁSSIO EM LINHAGENS CELULARES DE ASTROCITOMAS DE ALTO GRAU E EFEITO HEPATOTÓXICO EM MODELO *IN VIVO*

Bragança Paulista 2024

GABRIEL ALVES BONAFÉ - R.A. 001202015117

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E CITOTÓXICA DO GLICIRRIZINATO DIPOTÁSSIO EM LINHAGENS CELULARES DE ASTROCITOMAS DE ALTO GRAU E EFEITO HEPATOTÓXICO EM MODELO *IN VIVO*

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde -Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Manoela Marques Ortega

Bragança Paulista, SP 2024

WL 358 B685a	Bonafé, Gabriel Alves Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica do glicirrizinato dipotássio em linhagens celulares de astrocitomas de alto grau e efeito hepatotóxico em modelo <i>in vivo</i> / Gabriel Alves Bonafé Bragança Paulista, 2024. 86 p.
	Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Orientação de: Manoela Marques Ortega.
	 Astrocitoma. 2. Glicirrizinato dipotássio (DPG). Complexo NF-kB. 4. MicroRNAs. 5. Estudos pré-clínicos. I. Ortega, Manoela Marques. II. Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF Ficha catalográfica elaborada por: Maria Clara Reginato P. Duarte - CRB-8/040



BONAFÉ, Gabriel Alves. "Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica do glicirrizinato dipotássio em linhagens celulares de astrocitomas de alto grau e efeito hepatotóxico em modelo *in vivo*". Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 30 de julho de 2024 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Prof(a). Dr(a). Manoela Marques Ortega - Orientador(a) e Presidente Universidade São Francisco

> Prof(a). Dr(a). Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz Universidade Estadual de Campinas

Prof(a). Dr(a). Giovanna Barbarini Longato Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Gustavo Jacob Lourenço Universidade Estadual de Campinas

Prof(a). Dr(a). Raquel de Cássia dos Santos Universidade São Francisco



usf.edu.br 0800 727 8855

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, José Cláudio Bonafé e Ana Cristina Viana Alves Bonafé, fundamentais nesta jornada, e por sempre me incentivarem a prosseguir mesmo com todas as dificuldades no caminho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por todas as oportunidades que me foram dadas até hoje.

Aos meus familiares, que com muito carinho e sabedoria sempre me estimularam na vida pessoal, acadêmica e profissional.

Aos meus amigos de fora do meio acadêmico, por terem feito esta etapa mais leve.

À minha orientadora, Profa. Dra. Manoela Marques Ortega, pelos muitos ensinamentos e pela sua amizade.

Aos meus colegas de laboratório, Jéssica Santos, Renata Parisi, Juliana Rodrigues, e Larissa Valensuela por sempre oferecerem momentos de apoio, alegrias e descontração.

À Andrea Fernandes e Jocineide Polaine, por toda atenção e auxílio oferecidos na secretaria da Pós-Graduação.

À dona Alice Cardoso, que de forma simples e encantadora, sempre deixou uma palavra de incentivo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – 88887.706776/2022-00.

À todos quero expressar a minha imensa gratidão!!!

"O sucesso não tem a ver com o lugar de onde você veio, e sim com a confiança que você tem e o esforço que você está disposto a investir."

Michelle Obama

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é um dos tumores neurológicos mais comuns, representando 15-20% dos casos, e é o mais agressivo devido à sua diversidade biológica e resistência à quimioterapia. A via NF-kB está constantemente ativa nas células de GBM, contribuindo para sua agressividade ao regular genes anti-apoptóticos e fatores de adesão e invasão celular. O glicirrizinato dipotássio (DPG), um derivado do ácido glicirrízico (AG) com propriedades anti-inflamatórias e menos efeitos colaterais, demonstrou efeitos citotóxico e antiproliferativo em linhagens celulares de GBM, ativando microRNAs (miRs) que inibem genes da via NF-kB. Em estudos com linhagens celulares de GBM (U87MG, T98G, U251 e U138MG), o DPG induziu apoptose pela fragmentação do DNA e ativação das proteínas pró-apoptóticas caspase-3 e -9, além de inibir células-tronco semelhantes (CTS), responsáveis pela formação de tumores. Um estudo prévio identificou miRs, como *miR-4728-5p* e *miR-22-3p*, moduladores de genes da via NF-κB após tratamento com DPG, pela plataforma Affymetrix Human miRNA 4.0. O presente estudo focou em avaliar o potencial antitumoral da linhagem celular astrocitoma grau IV, NG-97 e avaliar miR-4728-5p e miR-22-3p e seus genes-alvo preditos, BCL3 e PTEN, em linhagens de astrocitoma grau IV (NG-97), GBM resistente (U251) e GBM sensível (U138MG). O DPG apresentou um IC50 de 15mM em 24 horas nas células NG-97 e, combinado com TMZ, reduziu mais a viabilidade celular do que o TMZ isolado. O tratamento com DPG induziu apoptose em NG-97 pela fragmentação do DNA e modulação dos genes BAX e BCL2, com confirmação da morte celular pelo aumento na externalização de fosfatidilserina. Ensaios adicionais demonstraram que o DPG inibiu a proliferação e migração celular, eliminando completamente a formação de neuroesferas da NG-97. A qPCR confirmou que o DPG modulou a expressão de miR-4728-5p (hiperexpressão), miR-22-3p (hipoexpressão), e seus genes-alvo, BCL3 (expressão reduzida) e PTEN (superexpressão) nas linhagens avaliadas. O ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo, revelando que o DPG bloqueou o ciclo celular nas fases S e G2M apenas nas células U251. Além disso, o DPG reduziu a proliferação celular e a invasão, modulando a expressão dos genes MMP9 e TIMP1 nas linhagens estudadas. In vivo, foi investigada a possível hepatoxicidade do DPG, avaliando genes próinflamatórios (NF-KB, COX2, HMGB1), marcadores bioquímicos hepáticos (TGO, TGP, GGT) e hemograma total. Os resultados demonstraram que o DPG não causou hepatoxicidade significativa. Os achados sugerem que o DPG pode ser um composto terapêutico eficaz contra astrocitomas de alto grau, ativando a apoptose e inibindo a proliferação celular, bem como subpopulações de CTS, responsáveis pela formação e recorrência dos tumores, com o benefício adicional de menor hepatoxicidade.

Palavras-chave: Astrocitoma. Glicirrizinato dipotássio (DPG). MicroRNAs.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is one of the most common neurological tumors, accounting for 15-20% of cases, and is the most aggressive due to its biological diversity and resistance to chemotherapy. The NF-kB pathway is consistently active in GBM cells, contributing to its aggressiveness by regulating anti-apoptotic genes and factors involved in cell adhesion and invasion. Dipotassium glycyrrhizinate (DPG), a derivative of glycyrrhizic acid (GA) with anti-inflammatory properties and fewer side effects, has shown cytotoxic and antiproliferative effects in GBM cell lines by activating microRNAs (miRs) that inhibit NF-kB pathway genes. In studies with GBM cell lines (U87MG, T98G, U251, and U138MG), DPG induced apoptosis through DNA fragmentation and activation of pro-apoptotic proteins caspase-3 and -9, as well as inhibited cancer stem cell-like (CSC) populations responsible for tumor formation. A previous study identified miRs such as *miR*-4728-5p and miR-22-3p as modulators of NF- κ B pathway genes after DPG treatment using the Affymetrix Human miRNA 4.0 platform. The present study focused on evaluating the antitumor potential of the grade IV astrocytoma cell line NG-97 and assessing miR-4728-5p, miR-22-3p, and their predicted target genes, BCL3 and PTEN, in grade IV astrocytoma (NG-97), resistant GBM (U251), and sensitive GBM (U138MG) cell lines. DPG exhibited an IC50 of 15mM in 24 hours in NG-97 cells, and when combined with TMZ, it further reduced cell viability compared to TMZ alone. DPG treatment induced apoptosis in NG-97 through DNA fragmentation and modulation of the BAX and BCL2 genes, with cell death confirmed by increased phosphatidylserine externalization. Additional assays demonstrated that DPG inhibited cell proliferation and migration, completely eliminating neurosphere formation in NG-97. qPCR confirmed that DPG modulated the expression of miR-4728-5p (overexpression), miR-22-3p (underexpression), and their target genes, BCL3 (downregulation) and PTEN (overexpression) in all evaluated cell lines. Cell cycle analysis by flow cytometry revealed that DPG blocked the cell cycle in the S and G2M phases only in U251 cells. Additionally, DPG reduced cell proliferation and invasion by modulating the expression of MMP9 and TIMP1 genes in studied cell lines. In vivo, the potential hepatotoxicity of DPG was investigated by evaluating pro-inflammatory genes (NF-KB, COX2, HMGB1), liver biochemical markers (AST, ALT, GGT), and a complete blood count. The results demonstrated that DPG did not cause significant hepatotoxicity. The findings suggest that DPG could be an effective therapeutic compound against high-grade astrocytomas by activating apoptosis and inhibiting cell proliferation, as well as CSC subpopulations responsible for tumor formation and recurrence, with the additional benefit of reduced hepatotoxicity.

Keywords: *Astrocytoma. Dipotassium glycyrrhizinate (DPG). MicroRNAs.*

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIAÇÕES

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μΜ	Micromolar
3'UTR	Região não traduzida
Α	Ampere
AG	Ácido glicirrízico
ATRX	Gene Remodelador da cromatina
BAX	Gene Regulador de apoptose associado ao BCL2-XL
BCL2-XL	Gene Regulador de apoptose
BCL3	Gene Coativador de Fator de Transcrição
BRAF	Proto-oncogene B-Raf serina/treonina quinase
C57BL/6	Estirpe consanguínea de rato de laboratório
CAS	Número de serviço de resumos químicos
CD209	Gene Receptor de membrana CD209
CDKN2A/B	Gene Inibidor de quinase dependente de ciclina - subunidade 2A/B
CEMIB	Centro Multi-Institucional de Bioterismo
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CIAEP	Credenciamento Institucional para Atividades com Animais para Ensino ou Pesquisa
C-JUN	Oncogene
CO ₂	Dióxido de carbono
CTS	Células tronco semelhante

CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX2	Gene Ciclo-oxigenase-2
DMEM	Meio de cultura Dulbecco MEM
DMEM/F12	Meio de Cultura Dulbecco MEM com mistura nutricional F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPG	Glicirrizinato dipotássio
DSS	Dextrano
EFG	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Gene Receptor do fator de crescimento epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
FGFb	Fator básico de crescimento de fibroblastos
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GBM	Glioblastoma
GGT	Enzima Gama-GT
H&E	Corantes Hematoxilina & Eosina
HMGB1	Gene Receptor de alta mobilidade 1
IC50	Metade da concentração inibitória máxima
IDH1	Gene Isocitrato desidrogenase 1
IDH2	Gene Isocitrato desidrogenase 2
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
ING1	Gene Inibidor do Crescimento - subunidade 1
iNos	Isoforma indutível de óxido nítrico sintase

IRAK2	Receptor de interleucina associado a quinase
ІкВα	Gene Inibidor do fator nuclear kappa B
Kg	Kilograma
Ki-67	Marcador de proliferação
KIAA1549	Gene de nome KIAA1549
LOH	Perda de heterozigosidade
mg	Miligrama
MGMT	Gene O6-metilguanina-DNA metiltransferase
miRs	MicroRNAs
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
MMP9	Gene da Matriz metalopeptidase - subunidade 9
MN1	Proto-oncogene MN1 regulador transcricional
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N2	Suplemento N2
NF1	Gene Supressor tumoral
NF-ĸB	Fator nuclear kappa B
NF-ĸB1	Gene Fator nuclear kappa B - subunidade 1
ng	Nanograma
nm	Nanometro
OMS	Organização mundial da saúde

PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF-A	Gene Receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas - subunidade A
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Gene Fosfatidilinositol 3-quinase
poli-HEMA	Poli 2-hidroxietil metacrilato
PRKCA	Proteína quinase C alfa
PTEN	Gene Homólogo da fosfatase e da tensina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
RAGE	Receptor específico do produto final de glicosilação
RANK	Receptor ativador de NF-ĸB
RB	Gene Supressor tumoral
RNA	Ácido ribonucleico
SMAD	Gene Ativador do fator de transformação de crescimento
SNC	Sistema nervoso central
TBE	Tampão tris, borato e EDTA
TERT	Gene Transcriptase reversa da telomerase
TGF-β	Gene Fator de transformação de crescimento β
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase pirúvica
TIMP	Gene Inibidor de metalopeptidase
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TLRs	Receptor do tipo toll
TMZ	Temozolamida
TNC	Gene da Matriz extracelular

TNFα	Fator de necrose tumoral α
TP53	Gene Supressor tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
TRADD	Gene Receptor de fator de necrose tumoral associado ao domínio de morte celular
TRAF6	Receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator 6
TSC1	Gene subunidade complexa 1
TSC2	Gene subunidade complexa 2
TTF	do inglês tumor-treating fields
Ui	Unidade de massa atômica
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
V	Volts
Vegf	Fator de crescimento endotelial vascular
VS	Versus
WH	do inglês wound healing

xiii

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação histopatológica das células da glia, as quais podem originar gliomas	21
Figura 2	Representação esquemática da 5 ^a edição da classificação dos tumores do SNC segundo a OMS	23
Figura 3	Representação histopatológica do córtex cerebral saudável e de um paciente com glioblastoma (GBM) originado a partir de astrócitos	25
Figura 4	Representação esquemática do processo de ativação da via de sinalização NF-κB no glioblastoma (GBM)	30
Figura 5	Espécime adulto e raíz da <i>Glycyrrhiza glabra</i> e a representação molecular de seus substratos: o ácido glicirrízico (AG) e o dipotássio glicirrizinato (DPG)	33
Figura 6	O glicirrizinato dipotássio (DPG) reduz a viabilidade celular e altera a morfologia na linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97)	45
Figura 7	Efeito sinérgico do DPG associado a TMZ na viabilidade celular da linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97)	46
Figura 8	Fragmentação de DNA pelo glicirrizinato dipotássio (DPG) na linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97)	47
Figura 9	O glicirrizinato dipotássio (DPG) diminui a capacidade de migração celular na linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97)	48
Figura 10	O glicirrizinato dipotássio (DPG) inibe a proliferação celular na linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97)	49
Figura 11	O glicirrizinato dipotássio (DPG) apresenta efeito pró-apoptótico em linhagens celulares de astrocitoma grau IV (NG-97) e glioblastoma (GBM) (U251 e U138MG)	50
Figura 12	Avaliação da parada do ciclo celular pelo glicirrizinato dipotássio (DPG) nas linhagens celulares de astrocitoma grau IV (NG-97) e glioblastoma	51

	(GBM) (U251 e U138MG)	
Figura 13	Sensibilização na formação de esferas pela inibição de esferas após exposição do glicirrizinato dipotássio (DPG) na linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97)	52
Figura 14	O glicirrizinato dipotássio (DPG) aumenta a expressão do <i>miR-3620</i> e <i>miR-4443</i> na linhagem de astrocitoma grau IV (NG-97)	53
Figura 15	O glicirrizinato dipotássio (DPG) modula a expressão dos <i>miR</i> -4728 e <i>miR</i> -22) nas linhagens de astrocitoma grau IV (NG-97) e glioblastoma (GBM) (U251 e U138MG)	54
Figura 16	O glicirrizinato dipotássio (DPG) modula a expressão dos genes <i>CD209</i> , <i>TNC</i> , <i>BAX</i> e <i>BCL2</i> na linhagem de astrocitoma grau IV (NG-97)	55
Figura 17	O glicirrizinato dipotássio (DPG) modula a expressão dos genes <i>MMP9</i> , <i>TIMP1</i> , <i>BCL3</i> e <i>PTEN</i> nas linhagens de astrocitoma grau IV (NG-97) e glioblastoma (GBM) (U251 e U138MG)	56
Figura 18	O glicirrizinato dipotássio (DPG) não induziu hepatoxicidade in vivo	58
Figura 19	O glicirrizinato dipotássio (DPG) não provocou alterações histológicas no modelo <i>in vivo</i> estudado	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos astrocitomas com base nos critérios histopatológicos e	
	moleculares estipulados na quinta edição da classificação da Organização	
	Mundial da Saúde para tumores do sistema nervoso central	22
Tabela 2	Classificação molecular das linhagens celulares de astrocitomas de alto	
	grau de acordo com mutações em genes relacionados com a nova	
	classificação dos astrocitomas	37
Tabela 3	Registro de variabilidade de peso entre os grupos avaliados em função do	
	tratamento com DPG	57
Tabela 4	Registro das alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos entre	
	os grupos avaliados em função do tratamento com DPG	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)	20
1.2 Os gliomas	20
1.3 Classificação dos gliomas	20
1.4 Classificação dos astrocitomas	21
1.5 Glioblastoma (GBM)	24
1.6 Caracterização molecular do GBM	25
1.7 Células Tronco Semelhantes (CTS)	28
1.8 A via de sinalização do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) no GBM.	29
1.9 MicroRNAs (miRs) envolvidos com a via de sinalização NF-кB	30
1.10 Glicirrizinato Dipotássio (DPG)	32
1.11 DPG como modulador de miRs envolvidos com a inibição da via	
de sinalização NF-ĸB	34
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivos gerais	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Caracterização do DPG	37
3.2 Linhagens celulares	37
3.3 Ensaio MTT (Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-	
difeniltetrazólio)	38
3.4 Eletroforese em gel de agarose	38
3.5 Ensaio de migração celular pelo método de <i>wound healing</i> (WH)	39

3.6 Ensa	aio de proliferação celular	39
3.7 Aná	lise de apoptose por citometria de fluxo	39
3.8 Aná	lise do ciclo celular por citometria de fluxo	40
3.9 Ensa	aio de formação de esferas	40
3.10 Ide	entificação de miRs envolvidos com a via de sinalização NF-	
кВ		41
3.11 Ext	tração de RNA	42
3.12 Va	alidação dos miRs selecionados pela reação em cadeia da	
polimer	rase em tempo real (qPCR)	42
3.13 An	álise dos genes preditos como alvos de miRs pela qPCR	43
3.14 Ava	aliação de hepatoxicidade do DPG <i>in vivo</i>	43
3.15 An	álise Estatística	44
4 RESULTAD	OS	45
4.1 Efeit	to inibitório do DPG na viabilidade celular	46
4.2 O D	PG induziu a fragmentação do DNA	44
4.3 O D	PG inibe a capacidade de migração celular	47
4.4 Efeit	to inibitório do DPG na proliferação celular	48
4.5 O D	PG induziu a apoptose celular	49
4.6 O I	DPG induziu parada no ciclo celular na linhagem de GBM	
U251		51
4.7 Sens	sibilização de esferas pelo DPG	52
4.8 O D	PG modulou a expressão dos miRs selecionados	52
4.9 O E	DPG modulou a expressão dos genes preditos como alvo dos	
miRs se	elecionados	54
4.10 Res	sposta hepatotóxica do DPG <i>in vivo</i>	57

5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	70
REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)

Os tumores do SNC correspondem a cerca de 2% de todas as neoplasias e estão associados à elevada morbidade e mortalidade (MOREIRA et al., 2011; DOLECEK et al, 2012; WORLD CANCER REPORT, 2014; FERLAY et al., 2019). Foi estimado que no período entre 2020-2025 serão diagnosticados 336.000 novos casos de tumores no SNC no mundo (GLOBOCAN, 2020). No Brasil, estimou-se cerca de 11.100 novos casos de tumores do SNC para o período entre 2020-2022, sendo que 41% destes casos concentram-se na região Sudeste (INCA, 2020).

Baseados em parâmetros histopatológicos e moleculares, a Organização Mundial de Saúde (OMS), classificou os tumores do SNC em 20 grandes áreas (**ANEXO 1**). (LOUIS et al., 2016; LOUIS et al., 2021; GAILLARD, 2022).

1.2 Os gliomas

Os gliomas são os tumores cerebrais malignos mais frequentes com incidência crescente em todo o mundo e responsáveis por aproximadamente 70% de todos os tumores cerebrais (MIRANDA-FILHO et al., 2017). Estimativas da Sociedade Americana do Câncer indicaram a incidência de cerca de 23.820 tumores malignos do SNC para o ano de 2019 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). No Brasil, os gliomas também são o mais comum dos tumores que afetam o SNC, sendo que em cada dez pacientes, sete são diagnosticados em sua forma mais agressiva (AC CAMARGO, 2013). Estima-se em torno de 11.320 novos casos de tumores do SNC para o biênio 2018-2019 (INCA, 2017).

1.3 Classificação dos gliomas

Os gliomas são tumores que afetam as células da glia (astrócitos, oligodendrócitos, e células ependimárias), sendo subdivididos em astrocitomas (30% dos gliomas), oligodendrogliomas (10% dos gliomas) e ependimomas (10% dos gliomas) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014) (FIGURA 1).



FIGURA 1: Representação histopatológica das células da glia, as quais podem originar gliomas. (A) Astrócitos com aspecto estrelado. (B) Oligodendrócitos com morfologia regular e citoplasma claro. (C) Epêndimas com morfologia colunar e cílios em sua porção apical. (D) Astrocitoma apresentando atipias nucleares, como hipercromatismo e mitoses típicas e atípicas. (E) Oligodendroglioma apresentando células arredondadas com núcleos maiores, cromatina abundante e densa, proliferação vascular. (F) Ependimoma com células pouco diferenciadas, citoplasma claro, às vezes esboçando arranjo perivascular em pseudorosetas (ANATPAT; SANTOS et al., p. 21, 2019).

1.4 Classificação dos astrocitomas

Diversas organizações estabeleceram nomenclaturas para a classificação dos tumores do SNC internacionalmente aceita (KERNOHAN & SAYRE, 1952). Em 1979, a OMS publicou pela primeira vez o sistema de classificação World Health Organization (WHO) System, abrangendo todos os tumores do SNC com base nas características histopatológicas. Desde então, várias revisões foram publicadas e reconhecidas internacionalmente, também baseadas na classificação histológica (ZULCH, 1979; KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993; KLEIHUES et al., 2002; LOUIS et al., 2007).

A 4^a edição de classificação dos tumores do SNC considerava quatro graus de malignidade atribuíveis aos astrocitomas, os quais se baseavam em alguns parâmetros histopatológicos tais como presença de células atípicas, mitoses, proliferação endotelial e necrose. Em relação aos parâmetros moleculares, a OMS se baseia na presença ou ausência de mutações nos genes isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2), por se tratar de uma mutação frequentemente observada em astrocitomas de grau II-IV e praticamente ausente em outros tumores do SNC e demais neoplasias

(COHEN et al., 2013).

Já na 5^a edição, o genótipo se sobrepõe em relação ao fenótipo histológico nos casos em que o fenótipo histológico e o genótipo não são concordantes. Entretanto, a classificação destes tumores é bastante heterogênea uma vez que, alguns destes tumores ainda são pouco elucidados molecularmente (LOUIS et al., 2021). A TABELA 1 apresenta a nova nomenclatura e classificação clínicopatológicas dos astrocitomas segundo a 5^a edição da classificação dos tumores do SNC.

TABELA 1. Classificação dos astrocitomas com base nos critérios histopatológicos e moleculares estipulados na quinta edição da classificação da Organização Mundial da Saúde para tumores do sistema nervoso central.

Classificação dos astrocitomas em adultos		
Astrocitomas difuso de alto grau	Genes alterados*	Graus 1 a 4
Astrocitoma, IDH-mutante	IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B	2, 3 ou 4
Glioblastoma, <i>IDH</i> -selvagem	<i>IDH</i> -selvagem, <i>TERT</i> , <i>EGFR</i> , ganho do cromossomo 7, deleção do cromossomo 10	4
Astrocitomas astrocíticos circunscritos	Genes alterados*	Graus 1 a 4
Astrocitoma pilocítico	KIAA1549-BRAF, BRAF, NF1	1
Astrocitoma de alto grau com características pilóides	BRAF, NF1, ATRX, CDKN2A/B (metiloma)	Não atribuído
Xantoastrocitoma pleomórfico	BRAF, CDKN2A/B	2 ou 3
Astrocitoma subependimário de células gigantes	TSC1, TSC2	1
Glioma cordoide	PRKCA	2
Astroblastoma, MN1 - alterado	MN1	Não atribuído

*Mutações, deleções ou alterações na metilação (metiloma) nos genes citados. Adaptado de LOUIS et al., 2021

Resumidamente, a classificação atual da OMS dos tumores de SNC é baseada na histologia e celularidade: astrocitoma IDH mutado, oligodendroma IDH mutado e 1p/19q codeletado e glioblastoma IDH selvagem (LOUIS et al., 2021; GRITSCH et al 2022).

Os astrocitomas IDH-mutados são classificados em grau 2 (baixo grau) e graus 3 ou 4 (alto grau). Os de baixo grau (grau 2), crescem lentamente e são infiltrativos e mal delimitados. Os de alto grau (graus 3 e 4) podem mostrar áreas de realce pós-contraste e altos valores de volume sanguíneo cerebral relativo (rCBV). Os astrocitomas grau 4 podem ter necrose central. A deleção homozigótica CDKN2A/B determina alto grau do astrocitoma, mesmo sem achados histológicos de alto grau. Os astrocitomas de baixo grau podem evoluir para alto grau. Oligodendrogliomas são definidos pela codeleção 1p/19q e mutação do IDH, podendo ser grau 2 (baixo grau) ou 3 (alto

grau) (LOUIS et al., 2021; GRITSCH et al 2022). Radiologicamente, são infiltrativos, semelhantes aos astrocitomas, mas com calcificações grosseiras vistas na tomografia, frequentemente em padrão giriforme. Pequenos focos de realce e aumento do rCBV não indicam transformação para alto grau, ao contrário dos astrocitomas (MOHAMMED et al., 2022).

Os glioblastomas são gliomas astrocíticos difusos com IDH-selvagem, apresentando proliferação microvascular, necrose, mutação do promotor da TERT, amplificação do gene EGFR, ou ganho do cromossomo 7 e perda do cromossomo 10 (LOUIS et al., 2021; GRITSCH et al 2022).

O diagnóstico de glioblastoma pode ser feito apenas com marcadores moleculares, sem necessidade de achados histológicos de alto grau (LOUIS et al., 2021). A FIGURA 2 representa a classificação de 2021 da OMS (LOUIS et al., 2021).



FIGURA 2: Representação esquemática da 5^a edição da classificação dos tumores do SNC segundo a OMS. A classificação da OMS de 2021 inclui dois gliomas difusos do tipo adulto com mutação *IDH*: oligodendrogliomas (graus 2 ou 3) e astrocitomas (graus 2, 3 ou 4). O sistema também classifica tumores que não possuem mutações *IDH* (*IDH* do tipo selvagem) na presença de outras características moleculares, como amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), mutação do promotor *TERT*, ou ganho do cromossomo sete com perda do cromossomo 10 (+7/-10), como glioblastomas de grau 4, independentemente de sua aparência histológica. A classificação da OMS de 2021 também define os oligodendrogliomas pela perda dos cromossomos 1p e 19q (codeleção 1p19q) em comparação com os

astrocitomas que não possuem essa característica. A classificação dos tumores com mutação *IDH* em graus 2 e 3 nos oligodendrogliomas e 2, 3 e 4 nos astrocitomas continua a depender da aparência histológica, exceto quando os tumores astrocíticos possuem deleção homozigótica de *CDKN2A/B*, tornando-os tumores de grau 4 independentemente das características histológicas (ALSHIEKH, 2023).

1.5 Glioblastoma (GBM)

O glioblastoma (GBM), o tipo mais comum e maligno de astrocitoma, possui uma taxa média de incidência de 5-7 casos por 100.000 indivíduos. Apesar dos avanços consideráveis no diagnóstico e tratamento desses tumores, o prognóstico ainda é significativamente limitado, com uma média de sobrevivência de 10 a 15 meses após o diagnóstico. Apenas uma pequena proporção de pacientes, entre 0,05% e 4,7%, sobrevive por mais de 5 anos após o diagnóstico (PHILIPS, 2018). O GBM afeta predominantemente indivíduos com mais de 64 anos e mostra uma discreta prevalência no sexo masculino em comparação ao feminino. Estudos também indicam uma maior incidência de GBM em indivíduos de origem caucasiana em relação a outras etnias (ELLOR et al., 2014; OSTROM et al., 2018).

O diagnóstico de glioblastoma (GBM) é fundamentado em exames de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, sendo confirmado definitivamente por meio de análise anatomopatológica (LUCENA et al., 2006). Os sinais e sintomas da doença variam amplamente, dependendo do tamanho do tumor, sua localização e o impacto nas estruturas anatômicas circundantes (YOUNG et al., 2015). Entre os sintomas mais comuns estão cefaleia, déficits neurológicos focais progressivos e crises convulsivas, observadas em aproximadamente 25% dos casos (PERRY et al., 2006; SCHIFF et al., 2015). Tais sintomas podem ser decorrentes do crescimento tumoral com infiltração e/ou compressão de estruturas do SNC ou podem ser secundários a obstrução do fluxo de líquidos do cérebro, acarretando um aumento da pressão intracraniana (VAN MEIR et al., 2010).

O tratamento convencional para os astrocitomas grau III (agora grau IV de acordo com a nova classificação) e GBM consiste na cirurgia para retirada do tumor associada a radioterapia adjuvante e quimioterapia com temozolamida (TMZ) (STUPP et al., 2005; THAKKAR et al., 2014; REDMOND & MEHTA, 2015). Também, novos estudos foram realizados envolvendo terapia localizada com um dispositivo conhecido como tumor-treating fields (TTF), o qual direciona feixes alternantes de campos elétricos de frequências de intensidade baixa e intermediária com o objetivo de inibir a mitose das células tumorais seletivamente e com baixa toxicidade, demonstraram

melhora no prognóstico do GBM (KAZDA et al., 2018).

Macroscopicamente, o GBM apresenta-se como grande massa hemisférica, com áreas císticas, necróticas e hemorrágicas. Dentre os achados microscópicos destacam-se hipercelularidade, infiltrado inflamatório, polimorfismos celular e nuclear, mitose, necrose de coagulação e proliferação de células vasculares ou endoteliais (LUCENA et al., 2006; BADKE et al., 2014; LOUIS et al., 2016) (FIGURA 3).





Considerando as características histológicas e os aspectos clínicos, o GBM pode ser subdividido em primário e secundário (LOUIS et al., 2016). O GBM primário representa 90% dos casos (CASTAÑEDA et al., 2015; LOUIS et al., 2016). A principal característica histológica é o crescimento celular exacerbado e sem indícios de evolução a partir de uma lesão pré-existente de baixo grau (OHBA & HIROSE, 2016). Em contraste, o GBM secundário desenvolve-se a partir de uma lesão pré-existente de menor grau, como por exemplo, um astrocitoma de grau II ou III (COHEN et al., 2013; LOUIS et al., 2016).

1.6 Caracterização molecular do GBM

O GBM é um tumor que usualmente ocorre como esporádico, sem que haja evidência de qualquer tendência familiar ou identificação de fatores de risco. Estes podem ser divididos em

fatores ambientais, como por exemplo exposição à radiação ionizante, cloreto de vinil, pesticidas, fumo e refino de petróleo (ALIFIERIS & TRAFALIS, 2015). Menos de 1% dos GBM pode estar associado à síndrome de câncer hereditário, incluindo neurofibromatose do tipo 1 e 2, síndrome de Turcot e síndrome de Li Fraumeni (ELLOR et al., 2014).

Diversos genes foram recentemente descritos como envolvidos com a progressão de tumores astrocíticos de baixo grau (LOUIS et al., 2016). Mutações no gene supressor tumoral TP53 é uma das anormalidades mais comumente observadas em astrocitomas de baixo grau e GBM secundário (FONSECA et al., 2003; LOUIS et al., 2016). O gene TP53 codifica uma fosfoproteína que é fundamental em vários processos celulares, incluindo o ciclo celular, resposta das células a danos no DNA, morte celular, diferenciação celular, e angiogênese (BÖGLER et al., 1995; LOUIS et al., 2016). Mutações no TP53 inativam a proteína p53 e causam hiperexpressão do fator de crescimento derivado das plaquetas - subunidade A (PDGF-A) e seu receptor, levando à proliferação descontrolada das células (OHGAKI & KLEIHUES, 2007; LOUIS, 2016).

A transição da doença para um grau mais elevado está associada também a inativação de outros genes supressores tumorais, como o RB e o gene inibidor de quinase dependente de ciclina - subunidade 2A/B (CDKN2A/B) e mutações no gene receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (ROBBINS & COTRAN, 2010). Mutações no gene EGFR ocorrem em 36% dos GBM primários e raramente (8%) em secundários, promovendo a divisão celular descontrolada, capacidade de invasão tecidual e resistência à radioterapia a quimioterapia (OHGAKI & KLEIHUES, 2007; THAKKAR et al., 2014; PURKAIT et al., 2016). As mutações ocorrem frequentemente na variante 3 do gene EGFR com exclusão de éxons, associada com a ativação constitutiva de seu receptor e podem aumentar a proliferação celular através da ativação do gene fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (HUANG et al., 1997; NARITA et al., 2002).

Outro fator genético relevante no GBM é a perda de heterozigosidade (LOH) do braço curto ou longo do cromossomo 10 resultante de variações ambientais (LEE et al., 2014; THAKKAR et al., 2014). Vários estudos identificaram a perda de três lócus no cromossomo 10, 10p14-p15, 10q23-24, e 10q25-pter, sugerindo a inativação de vários genes supressores tumorais localizados nessas regiões e que podem desempenhar papéis importantes na patogênese do GBM (OHGAKI & KLEIHUES, 2007). A LOH 10q25-pter é observada em quase 80% dos casos de GBM primário e está associada com a transição de um astrocitoma de baixo grau para um de grau mais elevado

(OHGAKI & KLEIHUES, 2007; THAKKAR et al., 2014).

O gene transcriptase reversa da telomerase (TERT) codifica uma subunidade catalítica da telomerase e está localizada no cromossomo 5p15. A telomerase é importante para a replicação e estabilização das extremidades dos telômeros, tendo impacto na replicação cromossômica e senescência celular. Portanto, o mau funcionamento da telomerase pode resultar em anomalia cromossômica e subsequente formação de tumores (KHATTAR et al., 2016). Mutações no gene TERT são observadas em 72% dos pacientes adultos diagnosticados com GBM primário, apresentando pior prognóstico que aqueles sem mutações nesse gene (THAKKAR et al., 2014; PURKAIT et al., 2016).

Também, mutações no gene supressor tumoral homólogo da fosfatase e da tensina (PTEN) já foram observadas em cerca de 25% dos pacientes com GBM primário, embora sua interação com o prognóstico da doença ainda não foi completamente esclarecida (OHGAKI, 2007; THAKKAR, 2014).

Mutações no gene remodelador da cromatina (ATRX), presente em 71% dos pacientes com GBM secundário, associada com mutações no gene TP53, desencadeiam a proliferação celular descontrolada e inibição da apoptose nas células cancerígenas (OHGAKI & KLEIHUES, 2007; COHEN et al., 2013; THAKKAR et al., 2014; OHBA & HIROSE, 2016).

Alguns estudos indicaram que mutações no gene IDH1 são frequentemente observados em GBM secundário (PARSONS et al., 2008; YAN et al., 2009). Além disso, pacientes que não apresentam mutações no IDH1 frequentemente apresentam mutações no gene IDH2 e com pior prognóstico (OHGAKI & KLEIHUES, 2007). GBM secundários sem mutações no gene IDH1 também não apresentaram mutações no gene TP53 (OHGAKI & KLEIHUES, 2007).

Finalmente, o gene O-6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), localizado no cromossomo 10q26, é responsável por codificar uma proteína que promove reparo de erros no DNA pela remoção de radicais alquil da posição O6 da guanina. O nucleotídeo guanina pode ser danificado pela ação de quimioterápicos alquilantes, como a TMZ, sendo esta propriedade responsável pela resistência ao tratamento observado em pacientes com GBM (IACCARINOL et al., 2011; PURKAIT et al., 2016). Foi observado que 30-40% dos pacientes com GBM apresentam metilação de MGMT, e dessa forma não há a tradução da proteína reparadora favorecendo a ação dos quimioterápicos alquilantes, resultando em um melhor prognóstico (IACCARINOL et al.,

2011; PURKAIT et al., 2016).

Na 4^a edição de classificação dos tumores do SNC, o GBM era subdividido de acordo com suas alterações moleculares em quatro categorias, sendo estas pró-neural, neural, clássico e mesenquimal (VERHAAK et al., 2010; COHEN et al., 2013; OHBA & HIROSE, 2016). O subtipo pró-neural é caracterizado principalmente pela amplificação de PDGFRA e mutação no gene IDH1 em mais de 30% dos casos. Diferentemente, o subtipo molecular neural caracteriza-se principalmente pela hiperexpressão de EGFR em 96% dos pacientes. O subtipo molecular clássico apresenta frequentemente hiperexpressão de EGFR e deleção de PTEN em 100% dos pacientes. O subtipo molecular mesenquimal frequentemente apresenta mutações nos genes supressores tumorais NF1 e TP53 em mais de 30% dos casos e deleção de PTEN em 87% dos pacientes (VERHAAK et al., 2010; AGNIHOTRI et al., 2013). Os principais genes envolvidos com o diagnóstico do GBM, de acordo com a última classificação dos tumores do SNC estão apresentados na TABELA 1 e FIGURA 2.

1.7 Células tronco semelhante (CTS)

Astrocitomas de alto grau apresentam uma subpopulação de células tumorais conhecidas como células-tronco tumorais (CTS), que exibem propriedades semelhantes às células-tronco normais. As CTS possuem capacidade de autorrenovação, invasão, resistência à quimioterapia e radioterapia, e são capazes de recidivar o tumor após remoção. Elas podem ser encontradas em nichos específicos dentro do tumor, incluindo os nichos perivascular, hipóxico/necrótico e na frente invasiva. Dependendo do nicho em que se encontram, as CTS podem diferenciar-se em células especializadas enquanto mantêm sua pluripotência. As CTS perivasculares são altamente proliferativas e contribuem para a progressão tumoral e formação de vasos sanguíneos. As CTS hipóxicas/necróticas estão envolvidas na angiogênese e na diferenciação em células endoteliais (SINGH et al., 2004; BAO et al., 2006; CALABRESE et al., 2007; CHEN et al., 2012; LATHIA et al., 2015; PRAGER et al., 2020). Estudos indicam que parte das células endoteliais nos tumores podem surgir da diferenciação das CTS (RICCI-VITIANI et al., 2010). Além disso, as CTS podem adquirir características mesenquimais, promovendo a migração e invasão celular (TEJERO et al., 2019; VELÁSQUEZ et al., 2019). As CTS na frente invasiva utilizam os vasos sanguíneos no tecido saudável para se disseminar, aumentando a invasividade do GBM (ROSIŃSKA & GAVARD, 2021).

1.8 A via de sinalização do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) no GBM

Uma via de sinalização importante e envolvida com o desenvolvimento do GBM, é a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (BRASSESCO et al., 2013). A via NF- κ B regula a proliferação celular, apoptose e resposta inflamatória através da ativação de um fator de transcrição também denominado de NF- κ B. Esse fator está continuamente ativado no GBM regulando o aumento da expressão de genes anti-apoptóticos, tais como BCL2-XL, BAX, ING1, TIMP, entre outros, e fatores de sobrevida, adesão e invasão celular (BRASSESCO et al., 2013).

Em mamíferos são conhecidas cinco proteínas desta família, as quais fazem parte de duas vias conhecidas como canônica e via alternativa: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) e o NF- κ B2 (p100/p52). Essas proteínas formam vários homodímeros e heterodímeros e são mantidas inativas por associação citoplasmática com proteínas inibitórias, tais como I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ (JOST & RULAND, 2007). A via NF- κ B canônica é a mais comumente estudada em diferentes tipos tumorais, incluindo o GBM (SMITH et al., 2008). No citoplasma das células, o complexo heterodímero p65/cRel:p50 está normalmente ligado a proteína inibitória I κ B α , tornando a via NF- κ B inativa. Em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, entre outros, o complexo I κ B quinase (IKK γ /IKK α /IKK β) fosforila I κ B α , causando degradação de I κ B α e liberando o heterodímero de proteínas p65/cRel:p50, que se transloca para o núcleo onde liga-se a região promotora de seus genes-alvo ativando-os (FIGURA 4) (JOST & RULAND, 2007; SUN, 2011, CAHILL et al., 2015).



FIGURA 4: Representação esquemática do processo de ativação da via de sinalização NF-κB no glioblastoma (GBM). A ativação da via canônica NF-κB inclui citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , modelos moleculares associados a patógenos, como aqueles que se ligam a TLRs, co-receptores de linfócitos ou ainda o receptor ativador de NF-κB (RANK). No citoplasma das células, o complexo p65/cRel:p50 está normalmente ligado a proteína inibitória IκB α , tornando a via NF-κB inativa. Em resposta a ativação, o complexo IκB quinase (IKK γ /IKK α /IKK β) fosforila IκB α , causando ubiquitinação e degradação de IκB α e liberando o heterodímero de proteínas p65/cRel:p50, o qual transloca para o núcleo onde liga-se a região promotora de seus genes-alvo ativando-os (Adaptado de JOST & RULAND, 2007; SUN, 2011; CAHILL et al., 2015).

A ativação constitutiva da via canônica NF-κB foi observado em tecidos e linhagem celular de GBM, indicando que a inibição dessa via poderia diminuir a resistência das células tumorais a quimioterápicos e contribuir para aumentar a sobrevida dos pacientes com GBM (SMITH et al., 2008; GALARDI et al., 2011; ZANOTTO-FILHO et al., 2011; WESTHOFF et al., 2013; BONAFÉ et al., 2019).

1.9 MicroRNAs (miRs) envolvidos com a via de sinalização NF-ĸB

Os microRNAs (miRs) são moléculas pequenas (em média cerca de 22 nucleotídeos) de RNA não-codificante que se ligam a sequências complementares na porção 3'UTR do mRNA alvo transcrito geralmente resultando em repressão translacional ou degradação e silenciamento gênico (BARTEL, 2004). Aproximadamente 2.000 genes de miRs foram identificados no genoma humano (BERNSTEIN et al., 2012) e mais da metade destes miRs estão localizados em regiões genômicas associados ao câncer ou em regiões de LOH, amplificações ou regiões conhecidas como envolvidas em pontos de quebra cromossômicos (KAWAHARA, 2014). Os miRs regulam a expressão de cerca de 60% de todos os genes humanos e estão abundantemente presentes em todas as células (BARTEL, 2004).

A desregulação de miRs está associada com o desenvolvimento e progressão de diversos tipos de tumores (VENTURA & JACKS, 2009), incluindo o GBM (MA et al., 2012), através da inibição da tradução de seus genes-alvo (BARTEL, 2004). Recentes evidências sugerem que miRs apresentam um papel essencial na etiologia do GBM, uma vez que estão envolvidos em uma série de processos biológicos, tais como crescimento, migração e invasão, apoptose e diferenciação celulares (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015). Entretanto, poucos estudos têm focado em miRs envolvidos com a via NF-κB no GBM.

Um estudo avaliou que a expressão ectópica da via NF-κB e do oncogene C-JUN, em linhagem celular de GBM (U87MG), contribuíram com a indução da transcrição de miR-221/222 (GALARDI et al., 2011). Outro estudo caracterizou a expressão aumentada do miR-196a em linhagens celulares de GBM (U87MG e T98G) e amostras de tecido tumoral de pacientes com GBM, responsável por promover a proliferação celular e inibir a apoptose pela supressão do gene IKBA (YANG et al., 2014). A hiperexpressão de miR-16 diminuiu a malignidade e invasão das células das linhagens U87MG, U373MG e SHG44, pela regulação dos genes NF-κB1 e MMP9 (YANG et al., 2014). RAJBHANDARI e colaboradores (2015) demonstraram que NF-κB induz a expressão de miR-31 e que por sua vez, inibe os níveis de TRADD, um ativador da via NF-κB. Portanto, os autores propuseram que o grau de ativação da via NF-κB é regulado, em parte, pela relação entre TRADD e miR-31. Outro estudo observou a correlação do miR-148a e a via NF-κB em linhagens celulares de GBM (U87MG e U138MG) e amostras de tecido tumoral de pacientes com GBM (WANG et al., 2015), sendo que a baixa expressão do miR-148a ativou TGF- β /SMAD e a via NF-κB nas células tumorais.

Opções terapêuticas eficazes que possam contribuir no tratamento e melhoria do prognóstico dos pacientes com GBM têm sido investigadas, sendo os compostos naturais alvos destes estudos (CHUNG et al., 2014). Dessa forma, Wu e colaboradores (2015) investigaram o efeito citotóxico e os mecanismos de ação da curcumina, um composto polifenólico natural isolado da cúrcuma (Curcuma longa) na linhagem celular de GBM, U87MG. Os autores observaram que a exposição à curcumina levou a uma regulação positiva de miR-146a nas células. A curcumina combinada

com TMZ inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose, pela supressão da via NF-κB por meio da modulação de miR-146a. Os resultados desse estudo demostraram que compreender o papel desempenhado pelos miRs na progressão do GBM poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a doença.

1.10 Glicirrizinato Dipotássio (DPG)

A raíz do alcaçuz (Glycyrrhiza glabra) é amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa por sua ação farmacológica e fisiológica, como desintoxicação, indução da diminuição da glicose, hipocolesterolêmica, antialérgica, antibiótica e antiinflamatória (SHIBATA et al., 2000) (FIGURAS 5A E 5B).

O Ácido Glicirrízico (AG) (fórmula química: C42H62O16) (FIGURA 5C) é um composto isolado do alcaçuz e tem sido amplamente utilizado por seus efeitos antiinflamatórios (SHIBATA et al., 2000; FELTRIN et al., 2010). Estudos recentes comprovaram que doses orais de 15mg/kg de AG administrados em ratos wistar foi capaz de inibir o processo infeccioso nos animais (KHAN et al., 2013), reduzindo os níveis proteicos de TNF-α, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e a liberação de citocromo C. Também, estudos demonstraram que AG foi capaz de suprir a expressão proteica de Ki-67, NF-KB p65, Cox2, iNos e Vegf e aumentar a expressão da proteína p53, connexin-43, caspase-9 e -3 clivadas in vitro e in vivo (SCHRÖFELBAUER et al., 2009; YANG et al., 2009; MANNS et al., 2012; KHAN et al., 2013). Entretanto, foi observado nos animais vários efeitos adversos após a administração do AG, como, eritema, hipersudorese ou reações alérgicas na pele (SHIBATA et al., 2000; FELTRIN et al., 2010; CEC EDITORE, 2013). Também, o efeito antitumoral do AG foi demonstrado pela indução da apoptose em diversas linhagens celulares, incluindo o hepatoma humano (HLE), a leucemia promielocítica (HL-60), o câncer de estômago (KATO III), as células de sarcoma de kaposi associadas à infecção pelo herpes viral (KSHV) e o câncer de próstata (LNCaP e DU-145), pela fragmentação do DNA e estresse oxidativo das células tumorais (HIBASAMI et al., 2005; HIBASAMI et al., 2006; SIVASAKTHIVEL et al., 2008).

O Glicirrizinato dipotássio (DPG) (fórmula química: C42H60K2O16) (FIGURA 5D) é um sal dipotássio do AG e apresentou semelhança ao AG quanto às suas propriedades antiinflamatórias e antialérgicas em ratos wistar, porém não foi observado efeitos adversos após a sua administração, podendo ser usado continuadamente (CEC EDITORE, 2013). Além disso, o DPG já é utilizado na

indústria farmacêutica e cosmética por apresentar tais propriedades (CEC EDITORE, 2013). Estudos recentes comprovaram que doses orais de 3mg/kg e 8mg/kg do DPG diminuíram significativamente a gravidade da colite aguda induzida por sulfato de sódio dextrano a 3% (DSS) em camundongos C57BL/6 (VITALI et al., 2013). Foi observado que o tratamento com DPG, além de possibilitar a diminuição da perda de peso corporal e do comprimento do intestino grosso, também demonstrou melhora na consistência das fezes, presença de sangue nas fezes, condição cínica geral, além de melhora na morfologia celular e arranjo tecidual quando comparado ao grupo controle. Finalmente, observou-se também a diminuição da expressão de importantes citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, assim como dos receptores pró-inflamatórios HMGB1, RAGE e TLR4 (VITALI et al., 2013).



FIGURA 5. Espécime adulto e raíz da *Glycyrrhiza glabra* e a representação molecular de seus substratos o ácido glicirrízico (AG) e o dipotássio glicirrizinato (DPG). (A) Espécime adulto de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) com flores. (B) Raíz isolada e seca do alcaçuz. (C) O AG, um substrato obtido da raíz do alcaçuz em sua estrutura molecular. (D) O DPG, um sal dipotássio, derivado do AG em sua estrutura molecular (Adaptado de BONAFÉ et al., 2022).

Recentemente, nosso grupo avaliou o efeito anti-inflamatório do DPG tópico na cicatrização de feridas cutâneas por segunda intenção em um modelo experimental in vivo. Excisões circulares foram realizadas nas patas de camundongos Wistar e as feridas foram tratadas topicamente por 14 dias com o DPG. Os resultados demonstraram que o tratamento com DPG causou uma diminuição no exsudato inflamatório, bem como uma ausência de hiperemia ativa. Foram observados aumentos no tecido de granulação, na reepitelização tecidual e no conteúdo total de colágeno. Adicionalmente, o tratamento com DPG resultou na supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Tnf- α , Cox-2, Il-8, Irak-2, Nf-kB e Il-1) e na indução da expressão de Il-10. Com base nos nossos resultados, conclui-se que o DPG atenua o processo inflamatório e promove a cicatrização de feridas cutâneas ao modular diversos mecanismos e vias de sinalização, incluindo aqueles com perfil anti-inflamatório (LEITE et al., 2022).

Também, Huang e colaboradores (2022) avaliaram os possíveis efeitos anti-histamínicos do DPG no processo de ativação, diferenciação e proliferação celular de fibroblastos pulmonares mediadas por histamina. Dentre os achados, foi observado que o DPG inibiu a ativação, proliferação e migração celular induzida por histamina, reduzindo a expressão de PAR-2, MMP-2, FAK, TNF-α, P38, iNOS e aumentando a expressão de BAX, Caspase-3 e P53. Com base nisso, conclui-se que o DPG pode inibir os efeitos induzidos pela histamina nos fibroblastos pulmonares e promover a apoptose de fibroblastos pulmonares anormalmente ativados pela histamina.

1.11 DPG como modulador de miRs envolvidos com a inibição da via de sinalização NF-κB

Um estudo prévio por nosso grupo avaliou, por meio de ensaios in vitro com as linhagens celulares de GBM, U87MG e T98G, a ação citotóxica, antiproliferativa e antimigratória do DPG. Também foi verificado que o DPG induziu apoptose nas linhagens celulares estudadas pela fragmentação do DNA e da expressão da proteína pró-apoptótica caspase-3 clivada. Além disso, o DPG inibiu a via NF-κB através da modulação de miR-16 e miR-146a, os quais inibiram a expressão de seus genes-alvo IRAK2 e TRAF6, respectivamente (BONAFÉ et al., 2019). Foi

também demonstrado no estudo que o DPG foi capaz de inibir a subpopulação de células-tronco essencial para a formação de tumores, sobrevivência e recorrência (BONAFÉ et al., 2019).

Em continuação à caracterização da ação do DPG, foi demonstrado por nosso grupo a reprodutibilidade dos efeitos celulares observados acima em outras duas linhagens de GBM, U251 e U138MG (BONAFÉ et al., 2020), e de melanoma, SK-MEL-28, (BONAFÉ et al., 2020). Além disso, foi verificado o potencial inibidor do DPG, frente a outros miRs, por análise de 91 miRs preditos como reguladores de genes envolvidos com a regulação pós-transcricional da via NF-κB, a partir da linhagem celular T98G exposta ao DPG, utilizando a plataforma Affymetrix Human miRNA 4.0. De forma interessante, foi validado pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) a expressão de dois miRs, miR-4443 e miR-3620 e de seus genes-alvo, CD209 e TNC, respectivamente. Os resultados da qPCR evidenciaram que o DPG ativou a expressão de miR-4443 e miR-3620 nas células de GBM e inibiu a expressão de CD209 e TNC, sugerindo que o DPG também é capaz de modular miRs envolvidos com a inibição pós-transcricional da via NF-κB, podendo ser considerado um potencial composto terapêutico para o GBM (BONAFÉ et al., 2020).

Em nosso melhor conhecimento, somos o primeiro grupo a investigar os efeitos antitumorais do DPG. Os resultados do efeito antitumoral do DPG obtidos em todos os estudos prévios foram reprodutíveis em diferentes linhagens celulares de GBM (U87MG, T98G, U251, U138MG) e melanoma (SK-MEL-28). Assim, o presente projeto teve como objetivo principal avaliar a ação do DPG em uma linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97). Os resultados obtidos in vitro em linhagens celulares de astrocitoma grau IV (NG-97), GBM resistente a TMZ (U251) e GBM sensível a TMZ (U138MG), poderão fornecer informações para estudos in vivo propostos no presente estudo e em outras pesquisas em curso pelo grupo. Tais achados contribuirão para a elucidação dos mecanismos celulares e moleculares associados ao DPG, com particular ênfase na via de sinalização NF-κB, continuamente ativa nesses tumores.
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito antitumoral e citotóxico do DPG em linhagens celulares de astrocitoma grau IV (NG-97) e GBM resistente a TMZ (U251) e GBM sensível a TMZ (U138MG) e observar se o DPG é capaz de induzir hepatoxicidade em modelo in vivo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antitumoral do DPG, TMZ e o efeito sinérgico do DPG e da TMZ na linhagem celular NG-97 por meio do ensaio MTT;
- Verificar a apoptose celular pela fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose e pela expressão dos genes BAX e BCL2 por qPCR na linhagem celular NG-97;
- Confirmar a apoptose celular por citometria de fluxo nas linhagens celulares NG-97, U251 e U138MG;
- Verificar a proliferação celular pelo método de exclusão pelo corante azul de trypan e a capacidade de migração celular pelo ensaio de wound healing e pela expressão dos miRs (miR-4443 e miR-3620) e de seus genes-alvo (CD209 e TNC) pela qPCR na linhagem celular NG-97;
- Confirmar o efeito do DPG no ciclo celular por citometria de fluxo nas linhagens celulares NG-97, U251 e U138MG;
- Investigar a capacidade de formação de esferas, na linhagem celular NG-97;
- Mensurar a expressão dos miRs (miR-4728 e miR-22), seus respectivos genes-alvo (BCL3 e PTEN) e dos genes MMP9 e TIMP1 pela qPCR nas linhagens celulares NG-97, U251 e U138MG;
- Avaliar o potencial hepatotóxico DPG em modelo in vivo;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização do DPG

O DPG (número de serviço de resumos químicos [CAS] 68797-35-3) foi gentilmente doado pela Verdi Cosméticos LTDA (Joanópolis, São Paulo, Brasil). Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, avaliou-se o composto por espectrometria de massas onde foram identificados e caracterizados os íons moleculares [M-H]- (ânion do DPG) e [M-2H]-2 na amostra de DPG. Esses resultados confirmam o grau de 100% de pureza do composto utilizado no presente estudo (BONAFÉ et al. 2020).

3.2 Linhagens celulares

A linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97) foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Marcelo Lancelotti, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). E as linhagens celulares de GBM (U251 e U138MG) foram gentilmente doadas pela Dra. Adriana da Silva Santos Duarte, Hemocentro - UNICAMP. Todas as linhagens acima citadas foram descongeladas e cultivadas com um intervalo de pelo menos 2 semanas antes de cada experimento e mantidas em meio de cultura Dulbecco MEM (DMEM) enriquecido com glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil). Todos os experimentos foram realizados com células até a sétima passagem após o descongelamento. Os frascos de culturas foram mantidos em estufa a 37°C, 5% de CO2. A TABELA 2 apresenta a caracterização molecular das linhagens utilizadas no presente estudo, com base em dados da ATCC (www.atcc.org).

Tabela 2. Classificação molecular das linhagens celulares de astrocitomas de alto grau de acordo com mutações em genes relacionados com a nova classificação dos astrocitomas.

		Linhagens celulare	es
Genes	NG-97	U251	U138MG
IDH	SI	SI	SI
CDNK2A	Mutado	SI	Mutado
PTEN	Mutado	Mutado	Mutado
CDKN2C	SI	SI	SI
TP53	Mutado	Mutado	Mutado
EGFR	Mutado	Mutado	SI
NF-kB	Mutado	Mutado	Mutado

SI: sem informações; GBM: glioblastoma; Adaptado ATCC (www.atcc.org)

3.3 Ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio]

As concentrações e tempos de tratamentos utilizadas foram baseados em estudos anteriores, para as linhagens U87MG, T98G, U251, U138MG e SK-MEL-28 (BONAFÉ et al., 2019; BONAFÉ et al., 2020). Assim, cerca de 0,2x106 células/placa da linhagem NG-97 foram plaqueadas em triplicata em placas de 96-poços (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), em um volume de 100µL por poço, e mantidas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO2. Posteriormente, as células foram tratadas por diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 horas) com diferentes concentrações do DPG (Verdi) (5, 8, 12, 15, 18, 20, 24, 28, 32, 36 e 40mM). Também foi realizado um segundo tratamento com TMZ (CAS 85622-93-1) (Schering Plough, Kenilworth, Nova Jersey, EUA), utilizando concentrações anteriormente relatadas para tratamento de pacientes com GBM ou para linhagens celulares de GBM (25, 50, 75, 150, 350, 550, 850, 1000, 1250, 1500, 1750 e 2000µM) (BAKER et al., 1999; PAZHOUHI et al., 2018; BONAFÉ et al., 2019) e um terceiro tratamento onde foi avaliado o sinergismo do DPG (Verdi) (IC50) com a TMZ (Schering Plough) nas doses mencionadas acima. Uma triplicata contendo apenas meio de cultura DMEM enriquecido com glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab) foi utilizada como controle para normalização dos resultados obtidos. Após o tratamento, as linhagens celulares foram incubadas com 0,2µg/µL de MTT (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) durante 4 horas a 37°C. Os cristais de formazan foram dissolvidos em 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540nm (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA). O cálculo utilizado para determinar o percentual de inibição dos compostos avaliados foi pela equação: AA%= 100-{[(Abs.amostra – Abs.branco)×100]÷Abs.controle}. A concentração IC50 e tempo de exposição foram utilizados em todos os outros ensaios propostos no presente estudo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4 Eletroforese em gel de agarose

Cerca de 1x106 células/poço em um volume de 2mL da linhagem NG-97 foram plaqueadas em triplicata em placas de 6-poços (Kasvi) e mantidas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO2. Após atingir a confluência necessária, as células foram expostas ao DPG (Verdi) (12, 15 e 18mM por 24 horas). Uma triplicata contendo apenas meio de cultura DMEM enriquecido com glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab) foi utilizada como controle. Ao final do tratamento, o DNA foi isolado utilizando o protocolo de extração fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (BARNETT et al., 2012). A pureza e concentração do DNA foi analisada em um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher) a 260/280nm e confirmada pela razão entre 1,7 e 1,9. As amostras de DNA foram então submetidas à eletroforese utilizando tampão de corrida TBE 0,5x (Tris base, borato e EDTA) em uma corrente de aproximadamente de 100V/50A por 1 hora em gel de agarose a 1,5% e visualizadas com coloração com brometo de etídio sob iluminação UV.

3.5 Ensaio de migração celular pelo método de wound healing (WH)

Cerca de 1x106 células/poço em um volume de 2mL da linhagem NG-97 foram plaqueadas em triplicata em placas de 6-poços (Kasvi) e mantidas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO2. Após atingir a confluência necessária, com o auxílio de uma ponteira estéril de 200µL foi realizada uma ranhura na monocamada de células. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e expostas ao DPG (Verdi) (15mM). Uma triplicata contendo apenas meio de cultura DMEM enriquecido com glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab) foi utilizada como controle. As células foram fotografadas em microscópio invertido (Axio Vert. A1 ZEISS, Jena, Oberkochen, Alemanha) nos tempos de 0, 24 e 48 horas após tratamento e o programa de computador Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) foi utilizado para medir as áreas em torno das ranhuras realizadas.

3.6 Ensaio de proliferação celular

Cerca de 0,4x106 células/poço em um volume de 1mL da linhagem NG-97 foram plaqueadas em triplicata em placas de 24-poços (Kasvi) e mantidas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO2. Posteriormente, as células foram expostas ao DPG (Verdi) (15mM). Uma triplicata contendo apenas meio de cultura DMEM enriquecido com glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab) foi utilizada como controle. Durante 4 dias seguidos, as células foram coletadas, lavadas com PBS e submetidas a contagem do número de células viáveis em microscópio invertido (Axio Vert. A1 ZEISS) pelo método de exclusão pelo corante azul de trypan (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA) em câmara de Neubauer, conforme descrito em estudo anterior (ORTEGA et al., 2015).

3.7 Análise de apoptose por citometria de fluxo

Para o ensaio de citometria de fluxo para avaliar apoptose, cerca de 1x104 células/poço em

um volume de 1mL das linhagens NG-97, U251 e U138MG foram plaqueadas em triplicata em placas de 12-poços (Kasvi) e mantidas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO2. Em seguida, as células foram expostas ao DPG (Verdi) (NG-97: 15mM por 24 horas; U251: 32mM por 48 horas; U138MG: 20mM por 48 horas). Uma triplicata contendo apenas meio de cultura DMEM enriquecido com glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab) foi utilizada como controle negativo. E uma triplicata tratada com TMZ (Schering Plough) foi utilizada como controle positivo. A análise da morte celular foi realizada seguindo protocolo do fabricante do corante Anexina V Guava Nexin Reagent (Millipore). Após o tratamento com DPG, as células foram coletadas em PBS. Foram transferidos 100µL de Guava Nexin Reagent (Millipore) e incubado por 20 minutos no escuro. Todas as leituras foram feitas no citômetro Guava Easy Cyte 5HT Benchtop Flow Cytometer (Millipore).

3.8 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Para o ensaio de citometria de fluxo para avaliar o ciclo celular, cerca de 1x104 células/poço em um volume de 1mL das linhagens NG-97, U251 e U138MG foram plaqueadas em triplicata em placas de 12-poços (Kasvi) e mantidas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO2. Em seguida, as células foram expostas ao DPG (Verdi) (NG-97: 15mM por 24 horas; U251: 32mM por 48 horas; U138MG: 20mM por 48 horas). Uma triplicata contendo apenas meio de cultura DMEM enriquecido com glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab) foi utilizada como controle. A análise do ciclo celular foi realizada seguindo protocolo do fabricante do corante intercalante de DNA iodeto de propídio (PI) Guava Cell Cycle (Millipore). Após o tratamento com DPG, as células foram coletadas em PBS, fixadas em etanol 70% gelado, coradas com PI (Millipore) e transferidas para uma placa de 96-poços que foi incubada por 30 minutos no escuro e então analisada no citômetro de fluxo Guava Easy Cyte 5HT Benchtop Flow Cytometer (Millipore).

3.9 Ensaio de formação de esferas

Estudos indicam que uma alta porcentagem das linhagens celulares de astrocitomas apresenta células CD133 positivas. Assim, a linhagem NG-97, apresenta uma porcentagem de células CD133 positivas entre 20-30% (MACHADO et al., 2008). Essas células CD133 positivas são associadas às características de células-tronco cancerígenas, que são essenciais para a manutenção da tumorigênese e contribuem significativamente para a agressividade do tumor, resistência a terapias,

e potencial de recorrência.

Para ativar a formação das esferas, cerca de 1x104 células/poço em um volume de 2mL da linhagem NG-97 foram plaqueadas em triplicata em placas de 6-poços revestidas de poli 2hidroxietil metacrilato (poli-HEMA) (Kasvi) para evitar a adesão celular. As esferas tumorais foram formadas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com N2 livre de soro fetal bovino (StemCell, Vancouver, British Columbia, Canadá). O fator de crescimento epidérmico (EFG) (20ng/mL) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGFb) (20ng/mL) (Peprotech, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) foram adicionados ao meio antes do cultivo celular. As esferas foram mantidas em cultura por 6 dias a 37°C, 5% de CO2. Ao atingir cerca de 75µm de diâmetro, as esferas foram expostas ao DPG (Verdi) (15mM) por 48 horas. Uma triplicata contendo apenas meio de cultura DMEM/F12 suplementado com N2 livre de soro fetal bovino (StemCell) foi utilizada como controle. O fator de crescimento epidérmico (EFG) (20ng/mL) e o fator básico de crescimento epidérmico (EFG) (20ng/mL) e o fator básico de crescimento epidérmico (XemCell) foi utilizada como controle. O fator de crescimento epidérmico (EFG) (20ng/mL) e o fator básico de crescimento epidérmico (EFG) (20ng/mL) e o fator básico de crescimento epidérmico (EFG) (20ng/mL) e o fator básico de crescimento epidérmico (EFG) (20ng/mL) e o fator básico de crescimento epidérmico (EFG) (20ng/mL) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGFb) (20ng/mL) (Peprotech) foram adicionados ao meio antes do cultivo celular. As esferas foram observadas e fotografadas em microscópio invertido (Axio Vert. A1 ZEISS).

3.10 Identificação de miRs envolvidos com a via de sinalização NF-ĸB

Em um estudo anterior, Bonafé e colaboradores (2020) realizaram uma análise no banco de dados Gene Ontology (www.geneontology.org) para identificar genes envolvidos com a via NFκB. Em seguida, os genes encontrados foram cruzados com o banco de dados TargetScan (www.targetscan.org) para identificar miRs preditos como reguladores destes genes. Após análises in silico, foram selecionados apenas aqueles miRs com probabilidade maior ou igual a 99% de predição de regular os genes-alvo. Também, foi feita uma seleção baseada na patogênese dos astrocitomas de alto grau.

Ainda, foi realizada uma análise global do perfil de expressão diferencial de cerca de 2.578 miRs utilizando a plataforma Affymetrix Human miRNA 4.0 (Macrogen Inc., Gasan-dong, Geumchun-gu Seoul, Coreia do Sul) em amostras de RNAs a partir da célula T98G, expostas ou não ao DPG. Os dados brutos foram extraídos automaticamente utilizando o programa de computador Affymetrix GeneChip® Command Console[™] (AGCC). Os dados contidos nos arquivos CEL foram exportados usando o programa de computador Affymetrix® Power Tools (APT). Em seguida os dados foram normalizados e foi realizada uma análise comparativa entre as

amostras avaliadas no ensaio através do teste estatístico fold change (FC). Todos os testes estatísticos e visualização de miRs expressos foram realizados pelo programa de computador Statistic R.3.3.3 (https://cran.r-project.org/bin/windows/base/).

3.11 Extração de RNA

Cerca de 1x106 células/poço em um volume de 2mL das linhagens NG-97, U251 e U138MG foram plaqueadas em triplicata em placas de 6-poços (Kasvi) e mantidas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO2. Após atingir a confluência necessária, as células foram expostas ao DPG (Verdi) (NG-97: 15mM por 24 horas; U251: 32mM por 48 horas; U138MG: 20mM por 48 horas). Uma triplicata para cada linhagem contendo apenas meio de cultura DMEM enriquecido com glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina (Cultilab) foi utilizada como controle. Ao final do tratamento, as células foram coletadas e o RNA total foi obtido por meio do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Resumidamente, os precipitados de células foram conservados em Trizol® (Invitrogen) e fragmentados com o auxílio de seringa e agulhas de calibre 0,70 x 25mm. O RNA foi separado e isolado de DNA, proteínas e restos celulares através de lavagens com clorofórmio e álcool isopropílico. Em seguida, o RNA precipitado foi purificado com etanol 75%, e após a evaporação dos RNAs foi determinada por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher) e em seguida, armazenado em freezer -80°C até o momento da análise.

3.12 Validação dos miRs selecionados pela reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (qPCR)

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de cDNA específico para os miRs selecionados (miR-4443 e miR-3620) para o estudo com o kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da expressão dos miRs selecionados para o estudo foi realizada utilizando o kit TaqMan microRNA assay (Applied Biosystems). O miR U6 foi utilizado como controle endógeno em todas as reações de qPCR. Os ensaios de expressão dos referidos miRs foram realizados com 50ng de cDNA de cada amostra utilizando o conjunto de reagentes do kit TaqMan Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as reações foram realizadas em triplicata e controles negativos, com água estéril em substituição ao cDNA, também foram utilizados. A expressão de cada gene foi calculada pela

aplicação da fórmula aritmética $2-\Delta\Delta CT$.

Foram também avaliados novos miRs selecionados pela plataforma Affymetrix após a ação do DPG (miR-4728-5p e miR-22-3p) nas linhagens celulares de astrocitoma grau IV (NG-97) e GBM (U251 e U138MG).

3.13 Análise da expressão dos genes preditos como alvo de miRs pela qPCR

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de cDNA total com o kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno em todas as reações de qPCR. Os ensaios de expressão dos genes-alvos dos miRs escolhidos foram realizados com 500ng de cDNA de cada amostra utilizando um par de iniciadores (sense e anti-sense) para a amplificação por meio da qPCR com o reagente SYBRGreen (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as reações foram realizadas em triplicata e controles negativos, com água estéril em substituição ao cDNA, também foram utilizados. A expressão de cada gene foi calculada pela aplicação da fórmula aritmética $2-\Delta\Delta$ CT.

Além dos genes preditos como alvo de miRs, foi analisado também a expressão de importantes genes envolvidos com o processo de apoptose (BAX e BCL2), migração celular (MMP9 e TIMP1) e inflamação (NFκB, COX2 e HMGB1).

3.14 Avaliação preliminar da hepatoxicidade do DPG in vivo

Os estudos in vivo foram realizados após avaliação e aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade São Francisco (CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014) (ANEXO 2). A realização deste estudo obedeceu a Lei Federal 6.638 e às orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Camundongos machos Swiss foram obtidos do CEMIB/UNICAMP e armazenados no biotério da Universidade São Francisco (USF), em condições controladas de ciclo noite-dia, de temperatura e umidade, com recebimento de água e ração ad libitum até o momento do tratamento. Caso ocorra sinais de sofrimento o animal será eutanasiado.

Os grupos experimentais foram constituídos de 9 animais, com oito a dez semanas de idade. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente em 3 grupos: controle (n=3), DPG 3mg/kg (n=3) e DPG 8mg/kg (n=3) de peso do animal. As doses foram baseadas em um único estudo anterior (VITALI et al., 2013) como sendo as possíveis doses mínimas e máximas farmacologicamente ativas, sem causar citotoxicidade aos animais:

- 1. Grupo Controle: animais não submetidos a tratamento com DPG (administração de água por gavagem durante 10 dias consecutivos e no mesmo horário);
- Grupo DPG 3mg/kg: administração de 3,0mg/kg de DPG por gavagem durante 10 dias consecutivos e no mesmo horário;
- Grupo DPG 8mg/kg: administração de 8,0mg/kg de DPG por gavagem durante 10 dias consecutivos e no mesmo horário;

Para o tratamento, os animais foram submetidos a um jejum de 30 minutos, e em seguida submetidos à gavagem, realizada com auxílio da cânula ponta-bola, para evitar danos ao esôfago. O animal foi manualmente contido para a realização desse procedimento. A cânula foi introduzida lentamente na cavidade oral, através da boca e da faringe para o esôfago, sem resistência, assegurando-se que o tubo não penetre a traqueia. O DPG foi administrado lentamente nas doses acima descritas, respeitando o peso do animal, em volume máximo de 0,5mL.

Encerrando-se o tratamento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico através da associação de cloridrato de xilazina (30mg/kg) com cloridrato de cetamina (300mg/kg).

Foi coletado o fígado dos animais e dividido em duas partes. Uma parte foi fixada em solução de formalina 10% e posteriormente emblocada em parafina para avaliação de possíveis danos hepáticos através da análise histológica pela técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). E a outra parte foi armazenada em RNAlater (Sigma) para análise genômica de marcadores inflamatórios como NFκB, COX2 e HMGB1. Também foi coletado, por punção cardíaca, amostras de sangue para realização de exames como Hemograma, TGO, TGP e GGT para avaliação de possível citotoxicidade do DPG.

Ao término das análises, a dose que apresentar menos reações adversas será utilizada em outros projetos envolvendo a resposta terapêutica do DPG em modelos in vivo em andamento pelo nosso grupo de pesquisa.

3.15 Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média \pm desvio padrão. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste-T. Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa de computador SPSS.11 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Foi considerado p< 0.05 para indicar uma diferença estatisticamente significativa.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito inibitório do DPG na viabilidade celular

Não foi observado redução significativa na viabilidade celular quando as células de astrocitoma de grau IV (NG-97) foram expostas às concentrações de 5, 8 ou 12mM por 24, 48 e 72 horas. Entretanto, observou-se um efeito citotóxico diretamente proporcional à concentração do DPG quando concentrações altas foram utilizadas (15, 18, 20, 24, 28, 32, 36 ou 40mM) por 24, 48 e 72 horas, indicando um efeito dose- e tempo-dependentes (FIGURA 6A). Além disso, foram observadas alterações na morfologia celular e nuclear das células após o tratamento com DPG, quando comparadas às células não tratadas (FIGURA 6B). Foi adotado o IC50 de 15mM após 24h de exposição para a linhagem NG-97.



B



FIGURA 6: O glicirrizinato dipotássio (DPG) reduz a viabilidade celular e altera a morfologia na linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97). (A) As células NG-97 tratadas com 15, 18, 20, 24, 28, 32, 36 e 40mM do DPG por 24, 48 e 72 horas pelo ensaio MTT e o IC50 foi determinado (15mM por 24 horas). **(B)** Alterações morfológicas e nucleares foram observadas nas células NG-97 já com 24 horas de

exposição ao DPG quando comparadas com as células controles não tratadas. Os dados apresentados são a média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

As células NG-97 apresentaram quimioresistência ao tratamento com TMZ (FIGURA 7A); somente com 72 horas de exposição foi observado uma discreta redução na viabilidade celular, principalmente com doses mais altas (350, 550, 850, 1000, 1250, 1500, 1750 e 2000µM) (Figura 7A). De maneira interessante, observou-se um efeito sinérgico quando as células NG-97 foram tratadas simultaneamente com o TMZ e a dose IC50 do DPG (15mM), iniciando-se a partir da concentração menor de TMZ (25µM) e menos tempo de exposição (24 horas). Assim, foi observado um efeito sinérgico significativo quando TMZ foi associado ao DPG, pela redução significativa na viabilidade celular em comparação com a triplicata de controles (FIGURA 7B).



Figura 7: Efeito sinérgico do TMZ associado ao DPG na viabilidade celular da linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97). (A) TMZ inibe a proliferação das células NG-97 após 72 horas de tratamento (350-2000μM). (**B**) Efeito sinérgico significativo do TMZ com o IC50 do DPG (15mM) nas células NG-97 a partir de 25μM por 24 horas. Os dados apresentados são a média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

4.2 O DPG induziu a fragmentação do DNA

Foi observado que o tratamento com DPG induziu a degradação do DNA nas células NG-97 após 24 horas de tratamento (FIGURA 8), em comparação com as células controles. Estes resultados sugerem que o DPG parece apresentar efeito pró-apoptótico.



FIGURA 8: Fragmentação de DNA pelo glicirrizinato dipotássio (DPG) na linhagem celular de astrocitoma grau IV NG-97. As células NG-97 foram incubadas com 12, 15 e 18mM do DPG por 24 horas. O DNA genômico foi isolado e analisado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. M: marcador de DNA de 100 pares de bases; C: células controles não expostas a ação do DPG. Os resultados são representativos de um dos três experimentos realizados.

4.3 DPG inibe a capacidade de migração celular

O ensaio de wound healing é muito utilizado para o estudo das características da migração celular, assim como para a validação de moléculas, que podem estar envolvidas com a inibição de metástase. Assim, a linhagem de astrocitoma grau IV (NG-97) exposta a ação do DPG foi avaliada e os resultados demonstraram que o tratamento com DPG inibiu significativamente a capacidade de migração das células quando comparadas com células controles não tratadas no tempo de 24 horas (p< 0.05). Já no tempo de 48 horas, devido ao efeito pró-apoptótico e perda de adesão celular proporcionado pelo tratamento com DPG, não foi possível realizar a quantificação dos dados (FIGURA 9).



FIGURA 9: O glicirrizinato dipotássio (DPG) diminui a capacidade de migração celular na linhagem celular de astrocitoma grau IV NG-97. As células NG-97 tratadas com DPG tiveram sua capacidade de migração celular significativamente reduzida quando comparadas com as células controles não tratadas no tempo de 24 horas. O teste *wound healing* foi quantificado pelo programa de computador *Image J* através da medida relativa da largura da ranhura após tratamento com DPG, representada pelos gráficos com média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. O teste-T indicou valores de p < 0.05.

4.4 Efeito inibitório do DPG na proliferação celular

O efeito antiproliferativo do DPG foi observado pelo ensaio de proliferação celular. Assim, a linhagem de astrocitoma grau IV (NG-97) exposta a ação do DPG por 4 dias seguidos apresentou inibição significativa na taxa de proliferação celular (p< 0.05) (FIGURA 10).



FIGURA 10: O glicirrizinato dipotássio (DPG) inibe a proliferação celular na linhagem celular de astrocitoma grau IV NG-97. O tratamento com DPG inibiu significativamente a taxa de proliferação nas células NG-97 em comparação com as células controles não tratados. Os dados apresentados são a média \pm desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. O teste-T indicou valores de *p*< 0.05.

4.5 O DPG induziu a apoptose celular

O ensaio de citometria de fluxo para avaliar o efeito pró-apoptótico do DPG indicou que o DPG induziu significativamente a externalização da proteína fosfatidilserina presente na membrana celular, facilitando provavelmente, o reconhecimento das células apoptóticas por macrófagos. As células expostas ao DPG apresentaram um aumento significativo na taxa de externalização da fosfatidilserina em comparação com células controles não expostas ao DPG (p< 0.05) (FIGURA 11A-F) Os resultados foram apresentados em gráficos "dot-plot". As marcações foram analisadas com base na intensidade de FL1-H (Anexina V) e FL2-H (7-AAD). Os dados obtidos foram analisados no programa computacional GuavaSoft 3.3 (Millipore) e as porcentagens de células agrupadas em cada quadrante foram calculadas, onde quadrante superior esquerdo = Anexina V-, 7-AAD +; quadrante inferior esquerdo = Anexina V+, 7-AAD +; quadrante inferior direito = Anexina V-, 7-AAD -; quadrante superior direito = Anexina V+, 7-AAD+. Foram realizados, no mínimo, dois experimentos independentes em duplicata. A linhagem celular NG-97 (FIGURAS 11A E 11D) apresentou um efeito pró-apoptótico mais significativo quando comparado

as linhagens de GBM, U251 e U138MG (FIGURAS 11B, 11E, 11C E 11F).

Vale comentar que este é o primeiro ensaio da avaliação do efeito pró-apoptótico do DPG por ensaio de citometria de fluxo utilizando linhagens de astrocitomas graus IV e GBM.



FIGURA 11: O glicirrizinato dipotássio (DPG) apresenta efeito pró-apoptótico em linhagens celulares de astrocitoma grau IV (NG-97) e glioblastoma (GBM) (U251 e U138MG). (A) Resultados representativos demonstrando as porcentagens de células NG-97 positivamente coradas com Anexina V-PE/7-AAD, após tratamentos com TMZ (controle positivo) [4000 μ M], DPG [15mM], após 24 horas. (B) Resultados representativos demonstrando as porcentagens de células U251 positivamente coradas com Anexina V-PE/7-AAD, após tratamentos com TMZ (controle positivo) [4000 μ M], DPG [32mM], após 48 horas. (C) Resultados representativos demonstrando as porcentagens de células U251 positivamente coradas com Anexina V-PE/7-AAD, após tratamentos com TMZ (controle positivo) [4000 μ M], DPG [20mM], após 48 horas. (C) Resultados representativos demonstrando as porcentagens de células U251 positivamente coradas com Anexina V-PE/7-AAD, após tratamentos com TMZ (controle positivo) [4000 μ M], DPG [20mM], após 48 horas. Gráfico demonstrando a média e desvio padrão dos ensaios em triplicata das porcentagens de células (D) NG-97, (E) U251 e (F) U138MG positivamente coradas com Anexina V-PE/7-AAD e indicativo de células apoptóticas e necróticas, após exposição com o DPG. Os dados apresentados são a média \pm desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. O teste-T indicou valores de p < 0.05.

4.6 O DPG induziu parada no ciclo celular na linhagem de GBM U251

O ensaio por citometria de fluxo avaliou o ciclo celular após exposição ao DPG, permitindo acompanhar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo nas linhagens celulares avaliadas. As análises demonstraram que o DPG agiu significativamente no ciclo celular da linhagem U251, uma vez que, o número de células marcadas pelo intercalante de DNA, iodeto de propídio, nas fases S e G2M foi significativo comparado às células controles não expostas ao DPG (FIGURA 12B). De maneira interessante, foi observado que a exposição ao DPG induziu a parada no ciclo celular na linhagem de GBM resistente (U251); entretanto, células resistentes parecem que continuaram a divisão celular (fases S e G2M).



FIGURA 12: Avaliação da parada do ciclo celular pelo glicirrizinato dipotássio (DPG) nas linhagens celulares de astrocitoma grau IV (NG-97) e glioblastoma (GBM) (U251 e U138MG). O histograma é um resultado representativo de um ensaio demonstrando as porcentagens de cada fase do ciclo celular nas linhagens celulares (A) NG-97 [G1 (78,80% e 81,35%), S (12,5%, e 12,20%) e G2/M (2,45% e 0,50%)] (B) U251 [G1 (84,35% e 39,70%), S (10,65% e 41,40%) e G2/M (0,25% e 17,15%)] (C) U138MG [G1 (88,70% e 88,15%), S (6,35% e 6,30%) e G2/M (0,25% e 0,15%)] expostas ou não ao tratamento com DPG. Os dados apresentados são a média \pm desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. O teste-T indicou valores de p < 0.05.

4.7 Sensibilização de esferas pelo DPG

Foi verificado que na presença de DPG houve uma diminuição na capacidade de formação de esferas das células NG-97 após 24 e 48 horas de incubação (p< 0.05), indicando que o composto foi capaz de reduzir uma subpopulação de células essencial para a formação de tumores, sobrevivência e recorrência (FIGURA 13).



FIGURA 13: Sensibilização na formação de esferas pela inibição de esferas após exposição do glicirrizinato dipotássio (DPG) na linhagem celular de astrocitoma grau IV NG-97. A capacidade de formação de esferas da linhagem celular NG-97 (p < 0.05) após 24 e 48 horas de tratamento com DPG foi significantemente reduzida quando comparado com as células controles não expostas ao composto. Os dados apresentados são a média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

4.8 O DPG modulou a expressão dos miRs selecionados

Foi observado que a média de expressão relativa de miR-3620 e miR-4443, na linhagem celular NG-97, embora não significativo, foi induzida pela ação do DPG em comparação com as células controles não expostas (1,17 versus (vs.). 1,02, p= 0.63) e (1,41 vs. 1,10, p= 0.55), respectivamente) (FIGURA 14).



FIGURA 14: O glicirrizinato dipotássio (DPG) aumenta a expressão do *miR-3620* e *miR-4443* na linhagem de astrocitoma grau IV (NG-97). As células NG-97 expostas ao DPG apresentaram um aumento na média dos níveis de expressão relativa de *miR-3620* e *miR-4443* quando comparadas com as células controles não expostas ao DPG (p = 0.63 e p = 0.55, respectivamente). Os dados apresentados são a média \pm desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

Ainda, utilizando a plataforma Affymetrix Human miRNA 4.0 (Macrogen Inc.) foram selecionados dois novos miRs (miR-4728-5p e miR-22-3p) para validação dos valores expressão em função do tratamento com DPG nas linhagens celulares de astrocitoma grau IV (NG-97), GBM resistente (U251) e GBM sensível (U138MG).

Foi observado uma significativa modulação dos níveis médios de expressão de mRNA dos miR-4728 e miR-22 nas células expostas ao tratamento com DPG quando compradas com as células controles (NG-97: 1,80 vs. 1,00, p= 0.0001 e 0,61 vs. 1,00, p= 0.0170, respectivamente; U251: 2,36 vs. 1,10, p= 0.0290 e 0,30 vs. 1,00, p= 0.0003, respectivamente; U138MG: 2,80 vs. 1,03, p= 0.0045 e 0,73 vs. 1,00, p= 0.0154, respectivamente) (FIGURA 15).



FIGURA 15: O glicirrizinato dipotássio (DPG) modula a expressão dos *miR-4728* e *miR-22* nas linhagens de astrocitoma grau IV (NG-97) e glioblastoma (GBM) (U251 e U138MG). As células NG-97, U251 e U138MG expostas ao DPG apresentaram um aumento significativo dos níveis médios de expressão de mRNA do *miR-4728* e uma diminuição significativa dos níveis médios de expressão de mRNA do *miR-22* (NG-97: p = 0.0001 e p = 0.0170, respectivamente; U251: p = 0.0290 e p = 0.0003, respectivamente; U138MG: p = 0.0045 e p = 0.0154, respectivamente) quando comparadas com as células controles não expostas. Os dados apresentados são a média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

4.9 O DPG modulou a expressão dos genes preditos como alvo dos miRs selecionados

Para confirmar o efeito antimigratório observado pelo ensaio de WH, foram avaliados também os níveis de expressão relativa dos genes CD209 e TNC na linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97). Foi observado que a média da expressão relativa de mRNA dos genes CD209 e TNC, envolvidos com os processos de migração e invasão celular, foi significativamente menor nas células NG-97 tratadas com DPG em comparação com células controles (0,86 vs. 1,08, p= 0.0382 e 0,67 vs. 1,01, p= 0.047), respectivamente (FIGURA 16A).

Foram também avaliados os níveis de expressão dos genes BAX e BCL2 nas células NG-97 para confirmar a indução do processo de morte celular e foi observado uma regulação próapoptótica na média de expressão relativa do genes BAX e BCL2 nas células expostas ao DPG em comparação com controles (1,25 vs. 1,00, p= 0.13 e 0,68 vs. 1,00, p= 0.0244), respectivamente) (FIGURA 16B).



FIGURA 16: O glicirrizinato dipotássio (DPG) modula a expressão dos genes *CD209*, *TNC*, *BAX* e *BCL2* na linhagem de astrocitoma grau IV (NG-97). (A) As células NG-97 expostas ao DPG apresentaram uma diminuição significativa na média dos níveis de expressão relativa de mRNA dos genes *CD209* e *TNC* quando comparadas com as células controles não expostas (p = 0.0382 e p = 0.047, respectivamente). (B) As células NG-97 expostas ao DPG apresentaram um aumento dos níveis médios de expressão de mRNA do gene *BAX* (p = 0.13) e uma diminuição significativa dos níveis médios de expressão de mRNA do gene *BCL2* (p = 0.0244) quando comparadas com as células controles não expostas. Os dados apresentados são a média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

Além disso, foi observado uma modulação dos níveis médios de expressão de mRNA dos genes MMP9 e TIMP1 nas células expostas ao tratamento com DPG quando compradas com as células controles (NG-97: 0,54 vs. 1,09, p= 0.15 e 1,30 vs. 1,00, p= 0.22, respectivamente; U251: 0,39 vs. 1,48, p= 0.24 e 2,80 vs. 1,01, p= 0.0002, respectivamente; U138MG: 5,42 vs. 1,17, p= 0.0328 e 1,16 vs. 1,00, p= 0.0151, respectivamente) (FIGURA 17A), envolvidos com os processos de migração e invasão celular, e uma significativa modulação dos níveis médios de expressão de mRNA dos genes BCL3 e PTEN nas células expostas ao tratamento com DPG quando compradas com as células controles (NG-97: 0,63 vs. 1,00, p= 0.019 e 2,77 vs. 1,00, p= 0.0002, respectivamente; U251: 0,31 vs. 1,00, p= 0.0005 e 2,86 vs. 1,11, p= 0.0226, respectivamente; U138MG: 0,76 vs. 1,00, p= 0.0544 e 3,15 vs. 1,03, p= 0.0114, respectivamente) (FIGURA 17B), envolvidos com o processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com processo de quimioresistência nas linhagens celulares tratadas com DPG quando comparadas com as células controle.



FIGURA 17: O glicirrizinato dipotássio (DPG) modula a expressão dos genes *MMP9*, *TIMP1*, *BCL3* e *PTEN* nas linhagens de astrocitoma grau IV (NG-97) e glioblastoma (GBM) (U251 e U138MG). (A) As células NG-97 e U251 expostas ao DPG apresentaram uma diminuição na média dos níveis de expressão relativa de mRNA do gene *MMP9* e as células NG-97, U251 e U138MG apresentaram um aumento dos níveis médios de expressão de mRNA do gene *TIMP1* quando comparadas com as células controles não

expostas (NG-97: p = 0.15 e p = 0.22, respectivamente; U251: p = 0.24 e p = 0.0002, respectivamente; U138MG: p = 0.0328 e p = 0.0151, respectivamente). (**B**) As células NG-97, U251 e U138MG expostas ao DPG apresentaram uma diminuição significativa dos níveis médios de expressão de mRNA do gene *BCL3* e um aumento significativo dos níveis médios de expressão de mRNA do gene *PTEN* (NG-97: p = 0.019 e p = 0.0002, respectivamente; U251: p = 0.0005 e p = 0.0226, respectivamente; U138MG: p = 0.0544 e p = 0.0114, respectivamente) quando comparadas com as células controles não expostas. Os dados apresentados são a média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

4.10 Resposta hepatotóxica do DPG in vivo

Os resultados do estudo toxicológico in vivo com o DPG demonstraram que a administração oral diária do DPG (3mg/kg e 8mg/kg) não resultou em nenhuma alteração comportamental nos animais quando comparadas com o grupo controle. Também não foi observada nenhuma diferença significativa de peso entre os grupos avaliados (Tabela 3).

TABELA 3. Registro de variabilidade de peso entre os grupos avaliados em função do tratamento com DPG.

		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Média	Desvio Padrão
Controle	Animal 1	19	18	18	18	18	19	19	19	20	20	18,8	0,788810638
	Animal 2	25	24	25	25	25	25	26	25	26	26	25,2	0,632455532
	Animal 3	24	24	24	24	25	25	26	26	26	25	24,9	0,875595036
3mg/kg	Animal 1	25	25	24	24	24	25	25	25	25	26	24,8	0,632455532
	Animal 2	24	23	26	23	24	24	25	24	25	24	24,2	0,918936583
	Animal 3	26	26	29	26	26	26	26	27	27	28	26,7	1,059349905
8mg/kg	Animal 1	27	26	28	27	27	28	28	28	30	30	27,9	1,286683938
	Animal 2	22	21	22	21	21	22	22	22	22	23	21,8	0,632455532
	Animal 3	32	31	31	31	31	32	32	31	32	32	31,5	0,527046277

Além disso, foi observada uma discreta modulação dos níveis de expressão relativa de mRNA dos genes NF κ B, COX2 e HMGB1 após o tratamento com DPG quando comparado com o grupo controle (3mg/kg: 1,53 vs. 1,15, p= 0.51; 0,48 vs. 1,06, p= 0.12; e 0,73 vs. 1,19, p= 0.59, respectivamente; 8mg/kg: 1,30 vs. 1,15, p= 0.78; 0,57 vs. 1,06, p= 0.14; e 0,84 vs. 1,19, p= 0.59, respectivamente) (FIGURA 18).



FIGURA 18: O glicirrizinato dipotássio (DPG) não induziu hepatoxicidade *in vivo*. O tratamento com DPG induziu uma discreta modulação dos níveis médios de expressão de mRNA dos genes $NF\kappa B$, COX2 e HMGB1 após o tratamento com DPG quando comparado com o grupo controle (3mg/kg: p = 0.51, p = 0.12e p = 0.59, respectivamente; 8mg/kg: p = 0.78, p = 0.14 e p = 0.59, respectivamente). Os dados apresentados são a média ± desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata.

Ainda, observou-se que o tratamento com o DPG provocou algumas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, principalmente no grupo onde foi administrado uma maior dose do DPG (8mg/kg) (TABELA 4), mas não foram considerados importantes ou significativos.

TABELA 4. Registro das alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos entre os grupos avaliados em função do tratamento com DPG.

		TGO (10-88UI/L)	TGP (44-87UI/L)	GGT (Ref. não encontrada)	Plaquetas (100.000-1.000.000mm3)	Leucócitos (5.000-12.000mm3)
Controle	Animal 1	193	69	5	713.000	4.300
	Animal 2	164	50	5	715.000	4.200
	Animal 3	222	87	4,9	710.000	4.300
3mg/kg	Animal 1	198	106	5	518.000	2.450
	Animal 2	181	95	5	520.000	2.500
	Animal 3	165	85	5	525.000	2.500
8mg/kg	Animal 1	497	125	5	600.000	6.800
	Animal 2	201	98	5	593.000	6.900
	Animal 3	349	98	5	591.000	6.850

Por último, observa-se um aumento do processo de hiperemia passiva em vasos de grande calibre de maneira gradativa entre os grupos avaliados, e um consequente processo de edema celular a nível de hepatócitos. Entretanto as alterações histológicas observadas não apresentam significância clínica entre os grupos avaliados, evidenciando que o tratamento não apresenta hepatoxicidade significativa nos animais (FIGURA 19).



FIGURA 19: O glicirrizinato dipotássio (DPG) não provocou alterações histológicas no modelo *in vivo* **estudado.** Corte histológico de fígado (aumento de 20x) corado com Hematoxilina & Eosina, no qual não se observa nenhum padrão celular fora da normalidade.

5 DISCUSSÃO

O GBM é o tumor cerebral maligno mais prevalente em adultos acima de 50 anos, representando cerca de 48% dos casos (PHILIPS et al., 2018; SANTOS et al., 2021). O tratamento inicial é complexo e inclui ressecção cirúrgica seguida de radioterapia combinada com quimioterapia utilizando TMZ (STUP et al., 2005). Contudo, pacientes que apresentam resposta positiva a esse protocolo terapêutico frequentemente apresentam baixa sobrevida pós-diagnóstico (PHILIPS et al., 2018; SANTOS et al., 2021). No contexto brasileiro, dados abrangentes de incidência e taxa de mortalidade do GBM não estão disponíveis, sendo que estudos epidemiológicos existentes fornecem informações regionalizadas e baseiam-se em amostras de tamanho limitado (MIRANDA-FILHO et al., 2017; MARQUES et al., 2022).

Opções terapêuticas eficazes que possam contribuir no tratamento e melhoria do prognóstico dos pacientes com GBM tem sido estudada, e os composto naturais têm sido alvo de grande parte dos estudos (CHUNG et al., 2014; BONAFÉ et al., 2022). Na medicina popular, o uso de plantas com efeitos terapêuticos é muito comum, como a espinheira-santa (Maytenus ilicifolia), o gengibre (Zingiber officinale), o ginseng (Panax ginseng), o chá verde (Camellia sinensis), e o açafrão-da-terra (Curcuma longa) (MENTZ & SCHENKEL, 1989; FRANÇA et al., 2008; FIRMINO & MIRANDA, 2015; MARCHI et al., 2016;). O alcaçuz (Glycyrrhiza glabra) também é bastante utilizado na medicina chinesa por sua ampla ação farmacológica (SHIBATA et al., 2000).

O AG é o composto isolado da raiz do alcaçuz e que apresenta ação terapêutica (FELTRIN et al., 2000; SHIBATA et al., 2000). Entretanto, foram observados vários efeitos adversos após a administração do AG (SHIBATA et al., 2000; FELTRIN et al., 2010; CEC EDITORE, 2013). O DPG, um subproduto do AG, apresentou efeito anti-inflamatório em modelos animais de colite aguda pela modulação de citocinas e receptores de citocinas pró-inflamatórias (VITALI et al., 2013). Além disso, o DPG já é utilizado na indústria farmacêutica e cosmética por apresentar propriedades anti-inflamatórias e antialérgicas (CEC EDITORE, 2013). Assim, o DPG apresentou semelhança ao AG quanto às suas propriedades e não foi observado efeitos adversos após a sua administração (CEC EDITORE, 2013).

O efeito antitumoral do AG foi demonstrado pela indução da apoptose em diversas linhagens celulares tumorais, como hepatoma humano (HLE), leucemia promielocítica (HL-60), câncer de estômago (KATO III) e câncer de próstata (LNCaP e DU-145) (HIBASAMI et al., 2005;

HIBASAMI et al., 2006; SIVASAKTHIVEL et al., 2008). A ação antitumoral do DPG foi recentemente demonstrada pela indução da apoptose e inibição da proliferação celular nas linhagens tumorais de GBM, U87MG e T98G e pela modulação de genes (IRAK2 e TRAF6) e miRs (miR-16 e miR-146a) envolvidos com a via NF-κB (BONAFÉ et al., 2019). Também foi observado que o tratamento com DPG nas linhagens celulares de GBM (U87MG, T98G, U251 e U138MG) e de melanoma (SK-MEL-28) modulou dois miRs (miR-3620 e miR-4443) e seus respectivos genes alvo (CD209 e TNC), importantes na progressão do GBM pela regulação da migração, adesão e invasão das células tumorais nos tecidos adjacentes (XIA et al., 2015; GABRUSIEWICZ et al., 2016; BONAFÉ et al., 2020).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a reprodutibilidade dos efeitos antitumorais do DPG em uma linhagem celular de astrocitoma de grau IV (NG-97) e avaliar o efeito toxicológico do DPG in vivo, visando futuros estudos utilizando o DPG como tratamento em modelos animais.

A viabilidade celular para a linhagem tumoral estudada, NG-97, após exposição ao DPG indicou efeito citotóxico significativo, dose- e tempo-dependentes, como observado em um estudo anterior com as linhagens de GBM, U87MG e T98G (BONAFÉ et al., 2019), U251, U138MG (BONAFÉ et al., 2020) e melanoma, SK-MEL-28 (BONAFÉ et al., 2020). Os resultados estão também de acordo com estudos prévios utilizando compostos naturais, com potencial terapêutico, tais como AG, safranal, subfrações metanólicas da Scrophularia oxysepala, ácido valpróico, raloxifene e resveratrol, aveloz, em linhagens de células tumorais, incluindo câncer de estômago, leucemia promielocítica, hepatoma humano, câncer de próstata, câncer de mama, adenocarcinoma de pâncreas e de pulmão e GBM (HIBASAMI et al. 2005; HIBASAMI et al., 2006; SIVASAKTHIVEL et al., 2008; SAMARGHANDIAN et al., 2013; ORANGI et al., 2016; KIM et al., 2017; MIRZAPUR et al., 2018; SILVA et al., 2018). Além disso, foi adotado o valor de IC50 como sendo a concentração ideal de forma semelhante a outros estudos (ORANGI et al., 2016; KIM et al., 2017; MIRZAPUR et al., 2018; SILVA et al., 2018; BONAFÉ et al., 2019, BONAFÉ et al., 2020).

Ainda, alterações na morfologia celular e nuclear foram observadas na linhagem tumoral estudada (NG-97) após o tratamento com DPG, similar aos resultados observados previamente nas linhagens celulares de GBM, U87MG e T98G (BONAFÉ et al., 2019) U251 e U138MG (BONAFÉ

et al., 2020) e melanoma, SK-MEL-28 (BONAFÉ et al. 2020). Também, os resultados foram similares aos observados com as linhagens celulares HL-60 e câncer KATO III tratadas com AG (HIBASAMI et al., 2005). Da mesma maneira, alterações morfológicas celulares foram observadas em estudos prévios com compostos naturais, como células da linhagem de câncer de próstata (PC-3) expostas ao safranal, um composto isolado do açafrão (Crocus sativus) (SAMARGHANDIAN et al., 2013), linhagens de câncer de mama (MCF7 e MDA-MB-231) tratadas concomitantemente com raloxifene e resveratrol, flavonoides isolados principalmente da uva (Vitis vinífera) e seus derivados (MIRZAPUR et al., 2018).

A TMZ é um quimioterápico alquilante oral, o qual provoca alterações nas cadeias de DNA impedindo a sua replicação e geralmente, administrado concomitantemente à radioterapia em pacientes com GBM (NEIDLE et al., 2005; STUPP et al., 2005). Ainda, foi observado que as células expostas a TMZ entraram em um processo de morte celular uma vez que, o tratamento com TMZ induz um quadro de estresse oxidativo e metilação do DNA, dependentes da concentração e tempos de exposição (BARCISZEWSKA et al., 2015). Assim, no presente estudo, foi avaliado a viabilidade celular antes e após o tratamento com a TMZ em uma linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97).

A linhagem celular NG-97 apresentou uma quimioresistência em relação ao tratamento com a TMZ em doses altas e baixas nos tempos de 24 e 48 horas, e somente com 72 horas foi observada uma discreta redução na viabilidade principalmente nas doses mais altas. Por outro lado, em concordância com estudos prévios utilizando linhagens celulares de GBM, U87MG e T98G (BONAFÉ et al., 2019) U251 e U138MG (BONAFÉ et al., 2020), a TMZ em combinação com o IC50 do DPG foi um indutor mais eficaz da parada de crescimento nas células NG-97 do que a TMZ sozinho, a partir da concentração de 25µM por 24 horas de exposição. Assim, quando associado a TMZ, o DPG apresenta efeito significativo em comparação com as células de astrocitoma grau IV apenas expostas a TMZ, conferindo uma nova oportunidade terapêutica para estes tumores.

Para verificar até onde as alterações morfológicas observadas na linhagem celular estudada poderiam ser devido a um processo apoptótico, foi realizado o ensaio de fragmentação do DNA, principal característica bioquímica da apoptose celular (SAMARGHANDIAN et al., 2013). Foi observado a fragmentação do DNA nas células NG-97 após 24 horas de tratamento, em

comparação com as células controles. Estes resultados confirmam que o DPG parece apresentar efeito pró-apoptótico, da mesma forma como foi observado em estudos anteriores com as linhagens celulares de GBM, U87MG, T98G (BONAFÉ et al., 2019), U251, U138MG (BONAFÉ et al. 2020) e de melanoma, SK-MEL-28 (BONAFÉ et al 2020). Resultados similares também foram observados com as células HL-60, KATO III, LNCaP e DU-145 tratadas com AG (HIBASAMI et al., 2005; SIVASAKTHIVEL et al., 2008). Além disso, a fragmentação do DNA também foi observada na linhagem tumoral PC-3 exposta ao safranal (SAMARGHANDIAN et al., 2013) e nas linhagens de câncer de mama (MCF7, L929 e WEHI-164), expostas a subfrações metanólicas da Scrophularia oxysepala (ORANGI et al., 2016).

Ainda, o tratamento com DPG nas células tumorais estudadas apresentou efeito antiproliferativo evidenciado pelo ensaio da proliferação celular e anti-migratório evidenciado pelo ensaio de wound healing. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios com as células de GBM, U87MG e T98G (BONAFÉ et al., 2019), U251 e U138MG (BONAFÉ et al., 2020) e melanoma, SK-MEL-28 (BONAFÉ et al., 2020), expostas ao DPG, células de câncer de próstata, LNCaP e DU-145, tratadas com AG (SIVASAKTHIVEL et al., 2008) e linhagens de GBM, U373 e GAMG, tratadas com aveloz, composto isolado da planta Euphorbia tirucalli (SILVA et al., 2018). Também, foi observado a modulação dos genes MMP9 e seu heterodímero TIMP1 nas linhagens de astrocitoma grau IV (NG-97) e GBM (U251 e U138MG) em função do tratamento com DPG. Estes resultados corroboraram com estudos prévios, os quais demonstraram que o tratamento com alguns flavonoides foi capaz de reduzir a expressão e atividade das metaloproteinases MMP2, MMP3 e MMP9 (LIN et al., 2010; SANTOS et al., 2015; LI et al., 2019). Em um estudo envolvendo a linhagem de melanoma SK-MEL-28, foi observada uma redução significativa na expressão de MMP9 após a exposição das células ao DPG, mesmo na presença do ativador da migração celular 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), conforme descrito por Bonafé et al. (2020). Esses resultados indicam que o DPG exibe propriedades antiproliferativa e inibitória da migração e invasão celular, sugerindo seu potencial como agente terapêutico contra tumores.

A análise por citometria de fluxo revelou que o DPG promoveu significativa externalização de fosfatidilserina, facilitando a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos. Além disso, houve intensa ligação do 7AAD, um corante fluorescente para DNA, indicando que o processo de apoptose observado também resultou em necrose nas linhagens celulares estudadas.

Adicionalmente, o DPG demonstrou capacidade moduladora sobre genes relacionados a esse processo de morte celular, incluindo BAX e seu heterodímero BCL2. Resultados semelhantes foram observados em células de melanoma (SK-MEL-28) após exposição ao DPG (BONAFÉ et al., 2020).

Um estudo adicional investigou os efeitos de diversos flavonoides, incluindo rutina, quercetina, kaempferol e 3',4'-diidroxiflavona, em células de glioblastoma (GL-15). Consistente com nossa pesquisa, os autores observaram que todos os flavonoides reduziram a viabilidade celular e induziram apoptose (SANTOS et al., 2015). Além disso, em nosso estudo, identificamos uma parada do ciclo celular nas fases S e G2/M em células da linhagem de glioblastoma U251 resistente ao TMZ após tratamento com DPG. Os resultados observados podem ser correlacionados com o mecanismo de ação de compostos naturais como o kaempferol, que induz a parada do ciclo celular na fase G2/M, inibindo a migração em células de astrocitoma humano por meio de aumento dos níveis de IL-6, IL-8, quimiocinas, MCP-1, Bcl-2, caspase-3 clivada, proteínas antiapoptóticas survivina e XIAP, expressão de poli(ADP-ribose) polimerase clivada, despolarização do potencial de membrana mitocondrial e rápida redução na fosforilação de ERK e AKT (SHARMA et al., 2007; JEONG et al., 2009; COLOMBO et al., 2018).

Os tumores, de maneira geral, são caracterizados por apresentarem uma subpopulação de CTS para a sobrevivência, recorrência e quimioresistência (REYA et al., 2001; LEDUR et al., 2012; ZONG et al., 2015: PARMIANI, 2016; BRINCKERHOFF, 2017). Portanto, a identificação de compostos que possam inibir CTS poderia ser uma estratégia promissora no desenvolvimento de quimioterápicos. De fato, há diversos compostos categorizados como inibidores da proliferação de neuroesferas, como a TMZ, indicando efeito inibitório na proliferação das CTS (BEIER et al., 2008). Assim, foi demonstrado que a TMZ reduziu em 50% a formação de neuroesferas a partir de cultura primária de pacientes com GBM (BEIER et al., 2008). No presente estudo, foi observado redução de 100% na formação de esferas, na linhagem tumoral estudada, após 24 e 48 horas de exposição ao DPG. Resultados similares também foram observados nas células de GBM, U87MG e T98G (BONAFÉ et al., 2019), U251 e U138MG (BONAFÉ et al., 2020) e melanoma, SK-MEL-28 (BONAFÉ et al., 2020) tratadas com DPG. Estes resultados indicam que o DPG também inibe a capacidade de uma subpopulação de células-tronco à recorrência e resistência a quimioterápicos.

A influência da desregulação de miRs no desenvolvimento e progressão do GBM pela

modulação de seus genes-alvo têm sido descritos (MA et al., 2012). Estudos demostraram que o fenótipo mais agressivo do GBM está relacionado a uma diversidade de processos biológicos como a proliferação, a migração e a invasão celulares e que são regulados pela ação de miRs (JHANWAR-UNIYAL et al., 2015). Entretanto, poucos estudos têm focado em miRs envolvidos com a via NF-κB, que se encontra continuamente ativa (BRASSESCO et al., 2013) no GBM (GALARDI et al., 2011; YANG et al., 2014; RAJBHANDARI et al., 2015; WANG et al., 2015 WU et al., 2015; BONAFÉ et al., 2019; BONAFÉ et al., 2020). Estudos prévios avaliaram 91 microRNAs preditos como reguladores de genes envolvidos com a regulação pós-transcricional da via NF-κB, utilizando a plataforma Affymetrix Human miRNA 4.0 na linhagem celular de GBM T98G. Destes 91 microRNAs, foram selecionados dois microRNAs e seus respectivos genes-alvo para validação antes e após a ação do DPG nas linhagens celulares de GBM (U87MG, T98G, U251 e U138MG) e de melanoma (SK-MEL-28) (BONAFÉ et al., 2020).

Neste estudo, foram selecionados miRNAs com superexpressão (miR-4728-5p) e subexpressão (miR-22-3p) em resposta ao tratamento com DPG, conforme observado na plataforma Affymetrix. Análises computacionais identificaram seus genes-alvo preditos, BCL3 e PTEN, com porcentagens de predições observadas de 99%. Análises quantitativas confirmaram significativa ativação de miR-4728 e expressão significativamente reduzida de miR-22 nas linhagens celulares estudadas após o tratamento com DPG. Além disso, os genes-alvo preditos, BCL3 e PTEN, apresentaram expressão reduzida e ativada, respectivamente.

Os genes BCL3 e PTEN desempenham importante papel na progressão do GBM pela regulação de importantes processos celulares, como por exemplo a modulação de fatores inflamatórios (via NF-κB) e apoptóticos e quimioresistência (HASHEMI et al., 2023; SEATON et al., 2024). Estudos recentes confirmam que o gene BCL3 desempenha um papel central na modulação de uma rede de fatores de transcrição relacionados ao câncer e marcadores genéticos importantes que auxiliam no diagnóstico (LEGGE et al., 2020) e modulam a progressão do câncer (MALDONADO & MELENDEZ-ZAJGLA, 2011). De fato, foi observado que, quando silenciado o gene BCL3, houve aumento significativo na apoptose e na indução da senescência celular em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7) (TURNHAM et al., 2024). Outro estudo envolvendo linhagens celulares de GBM (LN229 e U87MG), observou que o tratamento com o composto EAC-100C red induziu um aumento significativo de apoptose e autofagia através da modulação de genes pró-apoptótico tais como BCL3, BNIP3L e NFKBIA (ZAPPAVIGNA et al.,

2019). Também, foi observado em um estudo com pacientes diagnosticados com GBM, que mutações envolvendo o gene supressor tumoral PTEN estão relacionadas com a formação de uma microbiota tumoral mais propicia a progressão e invasão das células cancerígenas, resultando em uma pior resposta aos tratamentos disponíveis (ZHAO et al., 2019). Assim, os resultados do presente estudo, em relação as expressões relativas dos genes avaliados estão de acordo com o observado em estudos anteriores.

O miR-4728 é um miR intrônico derivado do gene HER2, que pertence à família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). O HER2 é amplificado em cerca de 25% dos cânceres de mama e sua amplificação está associada à recorrência e mortalidade da doença. Recentemente, foi identificado que o miR-4728, codificado por HER2, pode ter como alvo o gene ESR1 (receptor de estrogênio 1) e proteger cânceres de mama HER2-positivos do tratamento com lapatinibe ao reprimir ESR1 (RUI et al., 2022). No entanto, a função do miR-4728 ainda não foi completamente elucidada, especialmente em astrocitomas de alto grau.

O miR-22 tem sido extensivamente investigado em diversos tipos de câncer, demonstrando um papel regulatório crucial e robustas propriedades supressoras de tumor (YANG et al., 2015; ZUO et al., 2015; ZEKRI et al., 2016; YOU et al., 2016; WANG et al., 2020; FRIEDRICH et al., 2020; LI et al., 2022). Sua baixa regulação foi fortemente associada a características clínicopatológicas e prognóstico geral, indicando seu potencial como um metastamir, ou seja, miRs diretamente relacionados ao processo de metástase. No entanto, é importante notar que estudos apresentaram achados contraditórios, pois o miR-22 exibe capacidades supressoras de tumor em níveis elevados de expressão (WANG et al., 2020; MA et al., 2021; KONG et al., 2021 KWON et al., 2022). Além disso, estudos funcionais revelaram que o miR-22 dificulta a proliferação e migração, inibindo especificamente a proliferação e migração de células de glioma (SANO et al., 1999). Um estudo investigou o efeito da expressão de PTEN (gene-lavo de miR-22) em células de glioma e seu efeito na proliferação celular, ciclo celular, sensibilidade ao agente antineoplásico TMZ e à radiação ionizante. Os resultados revelaram que a expressão de PTEN atrasou o tempo de duplicação da proliferação celular, possivelmente devido à inibição da transição G2/M para G1, e aumentou a sensibilidade à TMZ e à radiação ionizante. A expressão de PTEN foi pouco detectável em todas as linhagens celulares de glioma humano e de rato, exceto T98G (SANO et al., 1999). Os resultados confirmaram as descobertas de um estudo anterior que relatou a pouca expressão de PTEN em muitas células de glioma, incluindo U251 (REN et al., 2010) e U138MG (SINHA et al.,

2019). A função do PTEN é frequentemente perdida em muitos cânceres humanos devido a mutações, silenciamento gênico ou mecanismos epigenéticos. Mutações podem ocorrer em todos os domínios do PTEN, indicando relevância patológica para a progressão do câncer. A quantidade inadequada de PTEN, seja por haploinsuficiência ou por mecanismos como metilação e expressão de miRs, é crítica no desenvolvimento tumoral (MILELLA et al., 2015). Assim, sabe-se que em gliomas observa-se 70% de perda de heterozigosidade (LOH) em PTEN e 44% de mutação em PTEN (coincidente com LOH) (MILELLA et al., 2015). LOH em PTEN indica que uma das duas cópias do gene PTEN está perdida, o que pode levar à redução da expressão ou função do PTEN. Nestes casos, compostos naturais como o DPG, poderiam restaurar a expressão de PTEN, embora existem vários fatores a considerar como os expostos acima.

A maioria das terapias direcionadas para o câncer é desenvolvida com o objetivo de interromper processos de promoção de crescimento descontrolado. Em particular, muitos dos medicamentos direcionados usados hoje bloqueiam proteínas produzidas por genes causadores de câncer, ou oncogenes, que estimulam o crescimento das células cancerígenas. No entanto, outra classe de proteínas importantes para o desenvolvimento do câncer, as proteínas supressoras de tumor, tem sido mais desafiadora de manipular. Estas proteínas normalmente atuam para inibir o crescimento celular anormal, mas podem perder essa função nas células cancerígenas (devido deleção ou mutações). Se pudessem ser reativadas com medicamentos, tal abordagem representaria uma nova frente na terapia contra o câncer. Assim, o DPG foi capaz de ativar a proteína supressora de tumor PTEN, em células de astrocitoma de alto grau, sendo importante considerar este composto natural, que, ao menos em estudos in vitro, pode ativar essa função via suprexpressão de miR-22.

Estudos anteriores demonstraram que o DPG foi capaz de modular genes alvo de miRs envolvidos com a inibição pós-transcricional da via NF-κB. De forma interessante, o DPG inibiu a via NF-κB através da modulação de miR-16 e miR-146a, os quais inibiram a expressão de seus genes-alvo IRAK2 e TRAF6, respectivamente em linhagens celulares de GBM, U87MG e T98G (BONAFÉ, 2019). Em continuação à caracterização da ação do DPG, foi validado pela qPCR a modulação de expressão de dois miRs, miR-4443 e miR-3620 e de seus genes-alvo, CD209 e TNC, respectivamente em linhagens celulares de GBM (U87MG, T98G, U251 e U138MG) e de melanoma (SK-MEL-28), sugerindo que o DPG foi capaz de modular miRs envolvidos com a inibição pós-transcricional da via NF-κB, podendo ser considerado um potencial composto terapêutico para o GBM (BONAFÉ et al., 2020).

Para o estudo de toxicidade aguda do DPG, testamos duas doses identificadas como mínima (3mg/kg) e máxima (8mg/kg) permitida na literatura. A dosagem mínima (3mg/kg) foi a concentração mais tolerada pelos animais. Ao final do experimento, nenhuma anormalidade significativa nos órgãos foi encontrada durante a autópsia e não houve reações tóxicas significativas nos camundongos.

O peso corporal é considerado um indicador sensível de toxicidade medicamentosa (DEYNO et al., 2020; WU et al., 2022; CANH et al., 2023), e nenhuma alteração anormal foi observada neste estudo.

Também foi avaliado a expressão dos níveis médios de mRNA dos genes NFκB, COX2 e HMGB1 uma vez que eles estão envolvidos em uma ampla variedade de funções biológicas, destacando-se principalmente processos relacionados e inflamação e hepatoxicidade celular. Sendo assim foi observado que o tratamento com DPG, embora não significativo, foi capaz de modular a expressão dos genes avaliados.

A partir dos parâmetros hematológicos, em comparação com o grupo controle, observou-se uma diminuição do número de plaquetas no grupo tratado com 3mg/kg do DPG, sugerindo maior ativação e capacidade de agregação de plaquetas. Além disso, a redução significativa do número de leucócitos do grupo tratado com 3mg/kg do DPG, indica uma melhora da resposta antiinflatória. Isto poderia ser possivelmente influenciado pela ação de flavonoides e polissacarídeos, uma vez que estas substâncias podem regular a função plaquetária melhorando a microcirculação ou afetando componentes do sistema de coagulação sanguínea e modulando a resposta imunológica (ZARAGOZÁ et al., 2021; ZARAGOZÁ et al., 2022; ARAUJO et al., 2023).

Como marcador da função hepática, o aumento de TGP nos dois grupos tratados com DPG sugere que o composto avaliado pode intensificar a capacidade metabólica hepática. Isto sugere que o DPG pode ter um efeito lesivo no fígado, levando ao aumento do dano às células hepáticas e, consequentemente, ao aumento dos níveis séricos de TGP (XU et al., 2018). Entretanto, na análise histológica não foi encontrado nenhuma alteração indicativa de lesão hepatotóxica em função do tratamento com o DPG.

É importante ressaltar que os componentes e mecanismos de ação das formulações de compostos da medicina tradicional chinesa são muito complexos. Pode haver interações entre diferentes componentes e as formas como eles afetam o corpo podem variar muito. Este estudo

fornece evidências preliminares para a segurança da administração do DPG. Portanto, para garantir a sua segurança em aplicações clínicas, estes resultados preliminares precisam ser validados e explorados através de pesquisas mais extensas.

No presente estudo, foram avaliados os efeitos citotóxico, apoptótico, antiproliferativo e antimigratório do DPG nas linhagens tumorais de astrocitoma de grau IV (NG-97) e GBM (U251, U138MG). Foi também avaliado a sobrevivência, quimioresistência e a capacidade de formação de esferas na linhagem tumoral NG-97. Os resultados dos ensaios celulares corroboraram com estudos prévios com as linhagens de celulares de GBM (U87MG, T98G, U251 e U138MG) e de melanoma (SK-MEL-28).

Além disso, foi analisado a modulação de miRs previamente conhecidos como reguladores de genes envolvidos com a via NF- κ B. Assim, foi verificada a modulação do gene PTEN, superexpresso devido a inibição de miR-22 pelo DPG. De forma interessante, o gene PTEN inibe a ativação da via NF- κ B ao desfosforilar PIP3 e, consequentemente, inibir a via PI3K/AKT, o que impede a fosforilação e inativação de inibidores de NF- κ B (I κ B), resultando em uma redução da translocação de NF- κ B para o núcleo e diminuindo a expressão de genes envolvidos na sobrevivência celular, inflamação e crescimento tumoral (MAYO et al., 2002).

Em nosso melhor conhecimento, o estudo prévio por BONAFÉ e colaboradores (2019; 2020) e este, são os primeiros a relatar o potencial antitumoral do DPG em linhagens tumorais de astrocitomas de alto grau e potencialmente em modelo in vivo. Assim, o DPG pode ser considerado um potencial composto terapêutico para estas doenças.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Foi observado redução da viabilidade celular após ação do DPG na linhagem celular de astrocitoma grau IV (NG-97) pelo ensaio MTT quando expostas a altas concentrações (15-40mM).
- ✓ Foi observado efeito sinérgico do TMZ associado ao DPG pela redução significativa da viabilidade nas células NG-97.
- ✓ O tratamento com DPG induziu a apoptose pela fragmentação do DNA e pela modulação dos genes BAX e BCL2 na linhagem NG-97.
- ✓ A morte celular após a ação do DPG foi comprovada pela citometria de fluxo utilizando as linhagens de astrocitoma grau IV (NG-97) e GBM (U251 e U138MG).
- ✓ Os ensaios de proliferação celular e *wound healing* evidenciaram um efeito antiproliferativo e anti-migratório significativos pelo DPG nas células NG-97. Tais efeitos também foram comprovados pela modulação induzida dos miRs (*miR-3620* e *miR-4443*) e inibição de seus respectivos genes-alvo (*TNC* e *CD209*).
- ✓ O ensaio de citometria de fluxo para avaliar o ciclo celular demonstrou que o DPG foi capaz de parar o ciclo celular na fase S e G2M nas células de GBM resistente (U251).
- ✓ Foi observado que o DPG promoveu 100% de redução na capacidade de formação de neuroesferas na linhagem NG-97, após 24 e 48 horas de tratamento.
- ✓ O tratamento com DPG ativou significativamente a expressão do *miR-4728* e consequentemente, inibiu a expressão de seu gene-alvo *BCL3* nas linhagens NG-97, U251 e U138MG. Em contraste, o DPG inibiu *miR-22* causando a superexpressão de seu gene-alvo *PTEN*, nas células NG-97, U251 e U138MG.
- ✓ O tratamento com DPG modulou a expressão dos genes *MMP9* e *TIMP1* nas linhagens celulares NG-97 e U251, corroborando com os efeitos antiproliferativo e antimigratório observados em estudos anteriores utilizando outras linhagens cancerígenas.
- ✓ O tratamento com DPG não apresentou resposta hepatotóxica significativa *in vivo*, indicando que o composto não desencadeia efeitos adversos graves no modelo estudado.

Em nosso melhor conhecimento, somos o primeiro grupo de pesquisa a investigar os efeitos antitumorais do DPG. Nossos resultados sugerem que o DPG tem um efeito pró-apoptótico e antiproliferativo em função da modulação de miRs e genes envolvidos com a via NF-κB em

linhagens celulares de astrocitomas de alto grau, podendo ser considerado um composto promissor para o tratamento dessas doenças.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AC CAMARGO CANCER CENTER. Next Frontiers to Cure Cancer - Integrating Science and PatientCare. São Paulo, 2013. Disponível em: < http://www.accamargo.org.br/ >. Acesso em: 04/04/2024.

AGNIHOTRI, S; BURRELL, K.E; WOLF, A; JALALI, S; HAWKINS, C; RUTKA, J.T; ZADEH, G. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeuticstrategies. *Arch Immunol Ther Exp*, v. 61, n. 1, p. 25-41, 2013.

ALIFIERIS, C., TRAFALIS, D.T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. Pharmacol Ther., v.152, p. 63-82, 2015.

ALSHIEKH, N.R.; DE LA FUENTE, M.I. Therapies for IDH-Mutant Gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* v. 23, p. 225-233, 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Brain and Spinal Cord Tumors in Adults. Atlanta, 2014. Disponível em: https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults.html. Acesso em: 04/04/2024.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures. Atlanta, 2019. https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2019.html. Acesso em: 04/04/2024.

ANATPAT. FCM-UNICAMP. Disponível em: http://anatpat.unicamp.br/neupim portal.html>. Acesso em: 04/04/2024.

ARAUJO, D.F.; HOLANDA, B.F.; NASCIMENTO, F.L.F.D.; et al. Polysaccharide-rich extract of Genipa americana leaves exerts anti-inflammatory effects modulated by platelet mediators. *J Ethnopharmacol*, v. 319, 2023.

BADKE, G.L; PANAGOPOULOS, A.T; AGUIAR, G.B; VEIGA, J.C.E. Glioblastoma multiforme emidoso: uma revisão sobre o seu tratamento com ênfase na abordagem cirúrgica. *Arq Bras Neurocir*, v. 33, n. 1, p. 45-51, 2014.

BAKER, S.D; WIRTH, M: STATEKEVICH, P; REIDEBERG, P; ALTON, K; SARTORIUS, S.E; DUGAN, M; CUTLER, D; BATRA, V; GROCHOW, L.B DONEHOWER, R.C; ROWINSKY, E.K Absorption, metabolism, and excretion of 14C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.*, v.5, p.309-317, 1999.

BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R.E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A.B.; DEWHIRST, M.W.; BIGNER, D.D.; RICH, J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, v. 444, p. 756-760, 2006.

BARCISZEWSKA; A.M; GURDA, D; GŁODOWICZ, P; NOWAK, S; NASKRĘT-BARCISZEWSKA, M.Z. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. *Plos One*, v. 10, n. 8, p. e0136669-e0136681, 2015.

BARNETT, R.; LARSON, G. A phenol-chloroform protocol for extracting DNA from ancient samples. *Methods Mol. Biol.*, v. 840, p. 13-19, 2012.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BEIER, D; ROHRL, S; PILLAI, D.R; SCHWARZ, S; KUNZ-SCHUGHART, L.A; LEUKEL, P;

PROESCHOLDT, M; BRAWANSKI, A; BOGDAHN, U; TRAMPE-KIESLICH, A; GIEBEL, B; WISCHHUSEN, J; REIFENBERGER, G; HAU, P; BEIER, C.P. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res*, v. 68, n. 14, p. 5706-5715, 2008.

BERNSTEIN, B.E; BIRNEY, E; DUNHAM; I; GREEN, E.D; GUNTER, C; SNYDER, M. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, v. 489, n. 7414, p. 57-74, 2012.

BÖGLER, O; HUANG, H.J; KLEIHUES, P; CAVENEE, W.K. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia1*, v. 15, n. 3, p. 308-327, 1995.

BONAFÉ, G.A.; BOSCHIERO, M.N.; SODRÉ, A.R.; ZIEGLER, J.V.; ROCHA, T.; ORTEGA, M.M. Natural Plant Compounds: Does Caffeine, Dipotassium Glycyrrhizinate, Curcumin, and Euphol Play Roles as Antitumoral Compounds in Glioblastoma Cell Lines?. *Front. Neurol.*, v, 12, p. 784330, 2022.

BONAFÉ, G.A; ORTEGA, M.M. Identificação e caracterização de microRNAs envolvidos com a inibição da via de sinalização NF-κB pela ação do glicirrizinato dipotássio em linhagens celulares de glioblastoma e melanoma. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde), Universidade São Francisco (USF), Bragança Paulista, SP, 2020.

BONAFÉ, G.A; SANTOS, J.S; ZIEGLER, J; UMEZAWA, K; RIBEIRO, M.L; ROCHA, T; ORTEGA, M.M. Growth inhibitory effects of dipotassium glycyrrhizinate in glioblastoma cell lines by targetingmicroRNAs through the NF-κB signaling pathway. *Front Cell Neurosci*, v. 13, p. 216-230, 2019.

BRASSESCO, M.S; ROBERTO, G.M; MORALES, A.G; OLIVEIRA, J.C; DELSIN, L. E.A; PEZUK, J.A; VALERA, E.T; CARLOTTI, C. G; REGO, E. M; DE OLIVEIRA, H.F; SCRIDELI, C.A; UMEZAWA, K; TONE, L.G. Inhibition of NF- κ B by Dehydroxymethylepoxyquinomicin Suppresses Invasion and Synergistically Potentiates Temozolomide and γ -Radiation Cytotoxicity in GlioblastomaCells. *Chemoter Res Pract*, v. 2013, p. 1-16, 2013.

BRINCKERHOFF, C.E. Cancer Stem Cells (CSCs) in melanoma: There's smoke, but is there fire? *J Cell Physiol*, v. 232, n. 10, p. 2674-2678, 2017.

CAHILL, K.E; MORSHED, R.A; YAMINI, B. Nuclear factor-κB in glioblastoma: insights into regulators and targeted therapy. *Neuro-Oncology*, v. 18, n. 3, p. 329-339, 2015.

CALABRESE, C.; POPPLETON, H.; KOCAK, M.; HOGG, T.L.; FULLER, C.; HAMNER, B.; OH, E.Y.; GABER, M.W.; FINKLESTEIN, D.; ALLEN, M.; et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, v. 11, p. 69-82, 2007.

CANH PHAM, E.; VAN, L.V.; NGUYEN, C.V.; et al. Acute and sub-acute toxicity evaluation of Merremia tridentata (L.) stem extract on mice. *Toxicon*, v. 227, 2023.

CASTAÑEDA, C.A; CASAVILCA, S; ORREGO E; CORROCHANO, P.G; DEZA, P; HEINIKI, H; CASTILO, M; LOPEZ, C.B; OJEDA, L. Glioblastoma: análisis molecular y implicancias clínicas. *RevPeru Med*, v. 32, n. 2, p. 316-325, 2015.

CEC EDITORE. Dipotássio glicirrizinato: antinfiammatorio per pellisensibili da Maruzen Pharmaceuticals-Prodotti Gianni, 2013. Disponível em: http://cec-

editore.com/component/k2/25- dipotassio-glicirrizinato/25-dipotassio-glicirrizinato>. Acesso em: 16/06/2018.

CHEN, J.; LI, Y.; YU, T.S., MCKAY, R.M.; BURNS. D.K.; KERNIE, S.G.; PARADA, L.F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, v. 488, p. 522-526, 2012.

CHUNG, M.H.; KIM, D.H.; NA, H.K.; KIM, J.H.; KIM, H.N.; HAEGEMAN, G.; SURH, Y.J. Genistein inhibits phorbol ester-induced NF-kappaB transcriptional activity and COX-2 expression by blocking the phosphorylation of p65/RelA in human mammary epithelial cells. *Mutat. Res.*, v. 768, p.74–83, 2014.

COHEN A; HOLMEN S; COLMAN H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Current neurology and neuroscience reports*, v. 13, n. 5 p. 345-357, 2013.

DEYNO, S.; ABEBE, A.; TOLA, M. A.; et al. Acute and sub-acute toxicity of Echinops kebericho decoction in rats. *BMC Complement Med Ther*, v. 20, n. 2, 2020.

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, n. 5, p. 1-49, 2012.

ELLOR, S. V.; PAGANO-YOUNG, T. A.; AVGEROPOULOS, N. G. Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. *J Law Med Ethics.*, v. 42, n. 2, p. 171–182 ,2014.

Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Cancer Jose Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. - Rio de Janeiro: INCA, 2017.

Estimativa 2020-2022: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Cancer Jose Alencar Gomesda Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. - Rio de Janeiro: INCA, 2020.

FELTRIN, A.C; ATHAYDE, M.L. Estudo comparativo de Glycyrrhiza glabra (Alcaçuz) e periandradulcis (Alcaçuz-da-terra). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - UniversidadeFederal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil 2010.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.*, v.144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FIRMINO, L.A; MIRANDA, M.P.S. Polifenóis totais e flavonoides em amostras de chá verde (Camellia sinensis) de diferentes marcas comercializadas na cidade de Salvador-BA. *Rev. Bras. Plantas Med*, v. 17, n. 3, 436-443, 2015.

FONSECA, C.O; QUÍRICO-SANTOS, T; FERNANDES, J; CARVALHO, M.G.C; GATASS, C.R. Biologia molecular dos glioblastomas: perspectivas terapêuticas do monoterpeno álcool perílico. *J BrasNeurocirurgia*, v. 14, n. 2, p. 46-54, 2003.

FRANÇA, I.S.X; SOUZA, J.A; BAPTISTA, R.S; BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Rev Bras Enferm*, v. 61, n. 2, p. 201-208 2008.

FRIEDRICH, M.; HEIMER, N.; STOEHR, C.; STEVEN, A.; WACH, S.; TAUBERT, H.; HARTMANN, A.; SELIGER, B. CREB1 is affected by the microRNAs miR-22-3p, miR-26a-5p, miR-27a-3p, and miR-221-3p and correlates with adverse clinicopathological features in renal cell carcinoma. *Sci Rep.*, v. 10, n. 1, 2020.

GABRUSIEWICZ, K; RODRIGUEZ, B; WEI, J; HASHIMOTO, Y; HEALY, L.M; MAITI, S.N; THOMAS, G; ZHOU, S; WANG, Q; ELAKKAD, A; LIEBELT, B.D; YAGHI, N.K; EZHILARASAN, R; HUANG, N; WEINBERG, J.S; PRABHU, S.S; RAO, G; SAWAYA, R; LANGFORD, L.A; BRUNER, J.M; FULLER, G.N; BAR-OR, A; LI, W; COLEN, R.R; CURRAN, M.A; BHAT, K.P; ANTEL, J.P; COOPER, L.J; SULMAN, E.P; HEIMBERGER, A.B. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight*, v. 1, n. 2, p. e8541-e8560, 2016.

GAILLARD, F. WHO classification of CNS tumors. <www.radiopaedia.org>. Acesso em: 04/04/2024.

GALARDI, S; MERCATELLI, N; FARACE, M.G; CIAFRÈ, S.A. NF-κB and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells. *Nucleic Acids Res*, v. 39, n. 9, p. 3892-3902, 2011.

GLOBOCAN. Cancer tomorrow. Disponível em: http://gco.iarc.fr/tomorrow/home. Acesso em: 04/04/2024.

GRITSCH, S.; BATCHELOR, T.T; GONZALEZ-CASTRO, L.N. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer*, v. 128, p. 47–58, 2022.

HIBASAMI, H; IWASE, H; YOSHIOKA, K; TAKAHASHI, H. Glycyrrhetic acid (a metabolic substance and aglycon of glycyrrhizin) induces apoptosis in human hepatoma, promyelotic leukemia and stomach cancer cells. *Int J Mol Med*, v. 17, n. 2, p. 215-219, 2006.

HIBASAMI, H; IWASE, H; YOSHIOKA, K; TAKAHASHI, H. Glycyrrhizin induces apoptosis in human stomach cancer KATO III and human promyelotic leukemia HL-60 cells. *Int J Mol Med*, v. 16,n. 2, p. 233-236, 2005.

HUANG, H.S; NAGANE, M; KLINGBEIL, C.K; LIN, H; NISHIKAWA, R; JI, X.D; HUANG, C.M; GILL, G.N; WILEY, H.S; CAVENEE, W.K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermalgrowth factor receptor common in human cancer sismediated by threshold levels of constitutivety rosinephosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem*, v. 272, n. 5, p. 2927–2935, 1997.

HUANG, W; ZHOU, X. Anti-histamine effects of dipotassium glycyrrhizinate on lung fibroblasts, implicating its therapeutic mechanism for pulmonary fibrosis. *J Pharm Pharmacol*, v. 74, n. 9, p. 1241-1250, 2022.

IACCARINO, I; NICOLI, D; SERRA, S; FROIO, E; PISANELLO, A; BERTI, G; GHADIRPOUR, R; MARCELLO, N; SERVADEI, F; CARINCI, F. Detection of IDH1 mutations and the status of MGMT promoter on intraoperative fresh tissue section from frameless neuronavigation needle biopsy. Analysis on 17 patients with brain glial tumor ineligible for craniotomy and tumor resection. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 24, n. 2, p. 45-50, 2011.

JHANWAR-UNIYAL, M; LABAGNARA, M; FRIEDMAN, M; KWASNICKI, A; MURALI, R. Glioblastoma: molecular pathways stem cells and therapeutic targets. *Cancers*, v. 7, n. 2, p. 538-555, 2015.

JOST, P.J; RULAND, J. Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*, v. 109, n. 7, p. 2700-2707, 2007.

KAWAHARA, Y. Human diseases caused by germline and somatic abnormalities in microRNA and microRNA-related genes. *Congenit Anom*, v. 54, n. 1, p. 12-21, 2014.

KAZDA, T; DZIACKY, A; BURKON, P; POSPISIL, P; SLAVIK, M; REHAK, Z; LAKOMY, R. Radiotherapy of glioblastoma 15 Years after the Landmark Stupp's trial: more controversies than standards?. *Radiology and oncology*, v. 52, n. 2, p. 121-128, 2018.

KERNOHAN, J.W; SAYRE, G.P. Tumors of the Central Nervous System. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC, 1952.

KLEIHUES, P.; BURGER, P. C.; SCHEITHAUER, B. W. The new WHO classification of brain tumours. Brain Pathol., v. 3, n 3, p. 255-68, 1993.

KLEIHUES, P.; LOUIS, D. N.; SCHEITHAUER, B. W.; RORKE, L. B.; REIFENBERGER, G.; BURGER, P. C.; CAVENEE, W. K. The WHO classification of tumors of the nervous system. J Neuropathol Exp Neurol., v. 61, n. 3, p. 215-25, 2002.

KHAN, R; KHAN, A.B; LATEEF, A; REHMAN, MU; TAHIR, M; ALI, F; HAMIZA, OO; SULTANA, S. Glycyrrhizic Acid suppresses the development of precancerous lesions via regulating the hyperproliferation, inflammation, angiogenesis and apoptosis in the colon of wistar rats. *Plos One*, v. 8, n. 2, p. e56020-e56041, 2013.

KHATTAR, E; KUMAR, P; LIU, C.Y; AKINCILAR, S.C; RAJU, A; LAKSHMANAN, M; MAURY, J.J; QIANG, Y; LI, S; TAN, E.Y; HUI, K.M; SHI, M; LOH, Y.H; TERGAONKAR, V. Telomerase reverse transcriptase promotes cancer cell proliferation by augmenting tRNA expression. *J Clin Invest*, v.126, n. 10, p. 4045-4060, 2016.

KIM, S; SO, H.M; ROH, H.S; KIM, J; YU, J.S; LEE, S; SEOK, S; PANG, C; BAEK, K.H; KIM, K.H. Vulpinic acid contributes to the cytotoxicity of *Pulveroboletus ravenelii* to human cancer cells by inducing apoptosis. *RSC Adv*, v. 7, p. 35297-35304, 2017.

KONG, D.; WANG, X.; WANG, X.; WANG, Z.; WANG, F. Downregulated miRNA-22-3p promotes the progression and leads to poor prognosis of hepatocellular carcinoma through targeting CDKN2C. *J Buon*, v. 26, p. 409-417, 2021.

KWON, A.Y.; JEONG, J.Y.; PARK, H.; HWANG, S.; KIM, G.; KANG, H.; HEO, J.H.; LEE, H.J.; KIM, T.H.;, AN, H.J. miR-22-3p and miR-30e-5p are associated with prognosis in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci.*, v. 23, n. 10, 2022.

LATHIA, J.D.; MACK, S.C.; MULKEARNS-HUBERT, E.E.; VALENTIM, C.L.; RICH, J.N. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*, v. 29, p. 1203-1217, 2015.

LEDUR, P.F; VILLODRE, E.S; PAULUS, R; CRUZ, L.A; FLORES, D.G; LENZ, G. Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Purinergic Signal*, v. 8, n. 1, p. 39-48, 2012.

LEE, M; HILLS, M; CONOMOS, D; STUTZ, M.D; DAGG, R.A; LAU, L.M.S; REDDEL, R.R; PICKETT, H.A. Telomere extension by telomerase and ALT generates variant repeats by mechanistically distinct processes. *Nucleic Acids Res*, v. 42, n. 3, p. 1733-1746, 2014.

LEGGE, D.N.; CHAMBERS, A.C.; PARKER, C.T.; TIMMS, P.; COLLARD, T.J.; WILLIAMS, A.C. The role of B-cell Lymphoma-3 (BCL-3) in enabling the hallmarks of cancer: implications for the treatment of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 41, p. 249-256, 2020.

LEITE, C.D.S.; BONAFÉ, G.A.; CARVALHO, J.S.; MARTINEZ, C.A.R.; ORTEGA, M.M.;

RIBEIRO, M.L. The Anti-Inflammatory Properties of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*)-Derived Compounds in Intestinal Disorders. *Int J Mol Sci.*, v. 23, n. 8, p. 4121, 2022.

LI, C.; LI, X.; WANG, H.; GUO, X.; XUE, J.; WANG, X.; NI, J. MicroRNA-22-3p and microRNA-149-5p inhibit human hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis properties by regulating methylenetetrahydrofolate reductase. *Curr Issues Mol Biol.*, v. 44, n. 2, p. 952-962, 2022.

LIN, C.W.; SHEN, S.C.; CHIEN, C.C.; YANG, L.Y.; SHIA, L.T.; CHEN, Y.C. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion/migration of glioblastoma cells through activating PKCalpha/ERK/NF-kappaB-dependent MMP-9 expression. *J. Cell. Physiol.*, v.225 n.2, p.472–481, 2010.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; WESSELING, P.; BRAT, D. J.; CREE, I. A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; HAWKINS, C.; NG, H. K.; PFISTER, S. M.; REIFENBERGER, G.; SOFFIETTI, R.; VON DEIMLING, A.; ELLISON, D.W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.*, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

LOUIS, D.N; PERRY, A; REIFENBERGER, G; DEIMLING, A.V; BRANGER, D.F; CAVENEE, W.K; OHGAKI, H; WIESTLER, O.D; KLEIHUES, P; ELLISON, D.W. The 2016 World Health Organization of Tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol*, v. 131, n. 6, p.803-820, 2016.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol., v. 114 n. 2 p. 97-109, 2007.

LUCENA, R.C.G; MELLO, R.J.V; JUNIOR, J.R.L; CAVALCANTE, G.M; RIBEIRO, M. Correlação clínico-topográfica em glioblastomas multiformes nas síndromes motoras: significadosfisiopatológicos. *Arq. Neuro-Psiquiatr*, v. 64, n. 2, p. 441-445, 2006.

MA, D.; ZHOU, X.; QIN, Y.; TIAN, Z.; LIU, H.; LI, S. MiR-22-3p Expression is down-regulated in lung adenocarcinoma. *Acta Biochem Pol.*, v. 68, n. 4, p. 667-672, 2021.

MA, X; YOSHIMOTO, K; GUAN, Y. Associations between microRNA expression and mesenchymalmarker gene expression in glioblastoma. *Neuro Oncol*, v. 14, n. 9, p. 1153-1162, 2012.

MACHADO, C.M.; IKEMORI, R.Y.; ZORZETO, T.Q. et al. Characterization of cells recovered from the xenotransplanted NG97 human-derived glioma cell line subcultured in a long-term in vitro. *BMC Cancer*, v. 8, p. 291, 2008).

MALDONADO, V.; MELENDEZ-ZAJGLA, J. Role of Bcl-3 in solid tumors. *Mol. Cancer*, v. 10, p.152, 2011.

MARCHI, J.P; TEDESCO, L; MELO, A.C; FRASSON, A.C; FRANÇA, V.F; SATO, S.W; LOVATO, E.C.W. Curcuma longa, o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. *Arq Cienc Saúde UNIPAR*, v. 20, n. 3, p, 189-194, 2016.

MARQUES, L. B.; COLOMBO, R.; VILLALOBOS, A.C.; WAGNER, A.L.; LANG, M.R.; STECLAN, C.A. Incidência de gliomas do sistema nervoso central e sua correlação com a ocupação profissional na região do Planalto Norte Catarinense. *Saúde Rev. Inter.*, 11(ed. esp.

anais), p.19-25, 2022.

MAYO, M.W.; MADRID, L.V.; WESTERHEIDE, S.D.; JONES, D.R.; YUAN, X.J.; BALDWIN, A.S.JR.; WHANG, Y.E. PTEN blocks tumor necrosis factor-induced NF-kappa Bdependent transcription by inhibiting the transactivation potential of the p65 subunit. *J Biol Chem.*, v. 277, n. 13, p. 11116-11125, 2002.

MENTZ, L. A; SCHENKEL, E.P. Plantas Medicinais: A Coerência e a Confiabilidade das Indicações Terapêuticas. *Caderno de Farmácia*, v. 5, n. 1/2, 1989.

MILELLA, M.; FALCONE, I.; CONCIATORI, F.; CESTA, I.U.; DEL CURATOLO, A.; INZERILLI, N.; NUZZO, C.M.; VACCARO, V.; VARI, S.; COGNETTI, F.; CIUFFREDA, L. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front Oncol.* v. 16, p. 5-24, 2015.

MIRANDA-FILHO, A; PIÑEROS, M; SOERJOMATARAM, I; DELTOUR, I; BRAY, F. Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence. *Neuro Oncol*, v. 19, n. 2 p. 270-280,2016.

MIRZAPUR, P; KHAZAEI, M.R; MORADI, M.T; KHAZAEI, M. Apoptosis induction in human breast cancer cell lines by synergic effect of raloxifene and resveratrol through increasing proapoptotic genes. *Life Sci*, v. 205, p. 45-53, 2018.

MOHAMMED, S.; RAVIKUMAR, V.; WARNER, E. et al. Quantifying T2-FLAIR mismatch using geographically weighted regression and predicting molecular status in lower-grade gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*, v. 43, p. 33-39, 2022.

MOREIRA, J.B; VIEIRA, P.J.C.L. Astrocitomas Difusos de Baixo Grau. Dissertação (MestradoIntegrado em Medicina) - Faculdade de Medicina Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2011.

NARITA, Y; NAGANE, M; MISHIMA, K; HUANG, H.J; FURNARI, F.B; CAVENEE, W.K. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res*, v. 62, n. 22, p. 6764–6769, 2002.

NEIDLE, S; THURSTON, D.E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, v. 5, p. 285-296, 2005.

OHBA & HIROSA. Biological Significance of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 in Gliomagenesis. *Neurol Med Chir*, v. 56, n. 4, p. 170-179, 2016.

OHGAKI, H; KLEIHUES, P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol*, v. 170, n. 5, p. 1445–1453, 2007.

ORANGI, M; PASDARAN, A; SHANEHBANDI, D; KAZEMI, T; YOUSEFI, B; HOSSEINI, B.A; BARADARAN, B. Cytotoxic and apoptotic activities of methanolic subfractions of Scrophularia oxysepala against human breast cancer cell line. *Evid Bas Compl Altern Med*, v. 2016, p. 1-10, 2016.

ORTEGA, M; BHATNAGAR, H; LIN, A.P; WANG, L; ASTER, J.C; SILL, H; AGUIAR, R.C. A microRNA-mediated regulatory loop modulates NOTCH and MYC oncogenic signals in B- and T-cell malignancies. *Leukemia*, v. 29, n. 4, p. 968-976, 2015.

OSTROM, Q. T.; COTE, D. J.; ASCHA, M.; KRUCHKO, C.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. Adult Glioma Incidence and Survival by Race or Ethnicity in the United States From 2000 to

2014. JAMA Oncol., v. 4, n. 9, p. 1254–1262, 2018.

PARMIANI, G. Melanoma Cancer Stem Cells: Markers and Functions. *Cancers*, v. 8, n. 3, p.34-38, 2016.

PARSONS, D.W; JONES, S; ZHANG, X; LIN, J.C; LEARY, R.J; ANGENENDT, P; MANKOO, P;CARTER, H; SIU, I.M; GALLIA, G.L; OLIVI, A; MCLENDON, R; RASHEED, B.A; KEIR, S; NIKOLSKAYA, T; NIKOLSKY, Y; BUSAM, D.A; TEKLEAB, H; DIAZ, L.A JR; HARTIGAN, J;SMITH, D.R; STRAUSBERG, R.L; MARIE, S.K; SHINJO, S.M; YAN, H; RIGGINS, G.J; BIGNER, D.D; KARCHIN, R; PAPADOPOULOS, N; PARMIGIANI, G; VOGELSTEIN, B; VELCULESCU, V.E; KINZLER, K.W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*,v. 321, n. 5897, p. 1807-1812, 2008.

PAZHOUHI, M.; SARIRI, R.; KHAZAEI, M.R.; MORADI, M.T, KHAZAEI, M. Synergistic effect of temozolomide and thymoquinone on human glioblastoma multiforme cell line (U87MG). *J. Cancer Res. Ther.*, v.14, n.5, p.1023-1028, 2018.

PERRY, J.; ZINMAN, L.; CHAMBERS, A.; SPITHOFF, K.; LLOYD, N.; LAPERRIERE, N. The use of prophylactic anticonvulsants in patients with brain tumours - A systematic review. *Curr. Oncol.*, v. 13, n. 6, p. 222–229, 2006.

PHILIPS, A.; HENSHAW, D.L.; LAMBURN, G.; O'CARROLL, M.J. Brain tumours: Rise in glioblastoma multiforme incidence in England 1995–2015 suggests an adverse environmental or lifestyle factor. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, v. 2018, p.7910754, 2018.

PRAGER, B.C.; BHARGAVA, S.; MAHADEV, V.; HUBERT, C.G.; RICH, J.N. Glioblastoma stem cells: Driving resilience through chaos. *Trends Cancer*, v. 6, p. 223-235, 2020.

PURKAIT, S; MALLICK, S; VIKAS, S; KUMAR, A; PATHAK, P; JHA, P; BISWAS, A; JULKA, P.K; GUPTA, D; SURI, A; UPADHYAY, A.D; SURI, V; SHARMA M.C; SARKA, C. Prognostic Stratification of GBMs Using Combinatorial Assessment of IDH1 Mutation, MGMT Promoter Methylation, and TERT Mutation Status: Experience from a Tertiary Care Center in India. *Transl Oncol*, v. 9, n. 4, p. 371-376, 2016.

RAJBHANDARI, R; MCFARLAND, B.C; PATEL, A; GERIGK, M; GRAY, G.K; FEHLING, S.C;BREDEL, M; BERBARI, N.F; KIM, H; MARKS, M.P; MEARES, G.P; SINHA, T; CHUANG, J; BENVENISTE, E.N; NOZELL, S.E. Loss of tumor suppressive microRNA-31 enhances TRADD/NF-κB signaling in glioblastoma. *Oncotarget*, v. 6, n. 19, p. 17805-17816, 2015.

REDMOND, K.J; METHA, M. Stereotactic Radiosurgery for Glioblastoma. *Cureus*, v. 7, n. 12, p. 1-16, 2015.

REN, Y.; ZHOU, X.; MEI, M. et al. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. *BMC Cancer*, v. 10, n. 27, 2010.

REYA, T; MORRISON, S.J; CLARKE, M.F; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, v. 414, p.105-111, 2001.

RICCI-VITIANI, L.; PALLINI, R.; BIFFONI, M.; TODARO, M.; INVERNICI, G.; CENCI, T.; MAIRA, G.; PARATI, E.A.; STASSI, G.; LAROCCA, L.M.; et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, v. 468, p. 824-828, 2010.

ROBBINS & COTRAN. Bases Patológicas das Doenças, 8ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROSIŃSKA, S.; GAVARD, J. Tumor Vessels Fuel the Fire in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.*, v. 22, n. 12, p. 6514, 2021.

RUI, T.; XIANG, A.; GUO, J.; TANG, N.; LIN, X.; JIN, X.; LIU, J.; ZHANG, X. Mir-4728 is a Valuable Biomarker for Diagnostic and Prognostic Assessment of HER2-Positive Breast Cancer. *Front. Mol. Biosci.*, v. 9, 2022.

SAMARGHANDIAN, S; SHABESTARI, M.M. DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line. *Indian J Urol*, v, 29, n. 3, p.177-183, 2013.

SANO, T.; LIN, H.; CHEN, X.; LANGFORD, L.A.; KOUL, D.; BONDY, M.L.; HESS, K.R.; MYERS, J.N.; HONG, Y.K.; YUNG, W.K.; STECK, P.A. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. *Cancer Res*, v. 59, p. 1820-1824, 1999.

SANTOS, J.S.; GONÇALVES CIRINO, J.P.; DE OLIVEIRA CARVALHO, P.; ORTEGA, M.M. The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review. *Front. Pharmacol.*, v.11 p.565700, 2021.

SANTOS, J.S; ORTEGA, M.M. Identificação e caracterização de variantes gênicas de base única em microRNAs envolvidos com a suscetibilidade em pacientes com glioblastoma. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde), Universidade São Francisco (USF), Bragança Paulista, SP, 2019.

SCHIFF, D.; LEE, E. Q.; NAYAK, L.; NORDEN, A. D.; REARDON, D. A.; WEN, P. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. *Neuro-Oncology.*, v. 17, n. 4, p. 488–504, 2015.

SEATON, G.; SMITH, H.; BRANCALE, A.; WESTWELL, A.D.; CLARKSON, R. Multifaceted roles for BCL3 in cancer: a proto-oncogene comes of age. *Molecular Cancer*. v. 23, n. 7, 2024.

SHARMA, V.; JOSEPH, C.; GHOSH, S.; AGARWAL, A.; MISHRA, M.K.; SEM, E. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Molecular Cancer Therapy.*, v. 6, p. 2544–2553, 2007.

SHIBATA, N; SHIMOKAWA, T; JIANG, Z; JEONG, Y; OHNO, T; KIMURA, G; YOSHIKAWA, Y; KOGA, K; MURAKAMI, M; TAKADA, K. Characteristics of intestinal absorption and disposition of glycyrrhizin in mice. *Bio Drug Disposition*, v. 21, n. 3, p. 95-101, 2000.

SILVA, V.A.O; ROSA, M.N; MIRANDA-GONÇALVES, V; COSTA, A.M; TANSINI, A; EVANGELISTA, A.F; MARTINHO, O; CARLONI, A.C; JONES, C; LIMA, J.P; PIANOWSKI, L.F; REIS, R.M. Euphol, a tetracyclic triterpene, from Euphorbia tirucalli induces autophagy and sensitizes temozolomide cytotoxicity on glioblastoma cells. *Invest New Drugs*, v. 37, n. 2, p. 223-237, 2018.

SINGH, S.K.; HAWKINS, C.; CLARKE, I.D.; SQUIRE, J.A.; BAYANI, J.; HIDE, T.; HENKELMAN, R.M.; CUSIMANO, M.D.; DIRKS, P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. v. 432, p. 396-401, 2004.

SINHA, S.; RENGANATHAN, A.; NAGENDRA, P.B.; BHAT, V.; MATHEW, B.S.; RAO, M.R.S. AEBP1 down regulation induced cell death pathway depends on PTEN status of glioma cells. *Sci Rep.*, v. 9, n. 1, 2019.

SIVASAKTHIVEL, T; XU, L; RAMASWAMY, K; GNANASEKAR, M. Glycyrrhizin induces apoptosis in prostate cancer cell lines du-145 and lncap. *Oncology Reports*, v. 20, n .6, p. 1387-1392, 2008.

SMITH, D; SHIMAMURA, T; BARBERA, S; BEJCEK, B.E. NF-kappaB controls growth of glioblastomas/astrocytomas. *Mol Cell Biochem*, v. 307, n. 2, p. 141-147, 2008.

STUPP, R; MASON, W.P; VAN DEN BENT M.J; WELLER M; FISHER B; TAPHOORN M.J. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus Concomitant andadjuvant Temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, v. 352, p. 987-996, 2005.

SUN, S.C. Non-canonical NF-KB signaling pathway. Cell Research, v. 21, p. 71-85, 2011.

TEJERO, R.; HUANG, Y.; KATSYV, I.; KLUGE, M.; LIN, J.Y.; TOME-GARCIA, J.; DAVIAUD, N.; WANG, Y.; ZHANG, B.; TSANKOVA, N.M.; et al. Gene signatures of quiescent glioblastoma cells reveal mesenchymal shift and interactions with niche microenvironment. *EbioMedecine*, v. 42, p. 252-269, 2019.

THAKKAR, J.P; DOLECEK, T.A; HORBINSKI, C; OSTROM, Q.T; LIGHTNER, D.D; SLOAN, J.S.B; VILLANO, J.L. Epidemiologic and molecular prognostic review of Glioblastoma. *CancerEpidemiol Biomarkers Prev*, v. 23, n. 2, p. 1985-1996, 2014.

TURNHAM, D.J.; SMITH, H.; CLARKSON, R.W.E. Suppression of Bcl3 Disrupts Viability of Breast Cancer Cells through Both p53-Dependent and p53-Independent Mechanisms via Loss of NF-κB Signalling. *Biomedicines*, v. 12, p. 143, 2024.

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. *A CancerJournal for Clinicians*, v. 60, n. 3, p. 166-193, 2010.

VELÁSQUEZ, C.; MANSOURI, S.; GUTIÉRREZ, O.; MAMATJAN, Y.; MOLLINEDO, P.; KARIMI, S.; SINGH, O.; TERÁN, N.; MARTINO, J.; ZADEH, G.; et al. Hypoxia can induce migration of glioblastoma cells through a methylation-dependent control of ODZ1 gene expression. *Front. Oncol.*, v. 9, p. 1036, 2019.

VENTURA, A; JACKS, T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*, v. 136, n. 4, p.586-591, 2009.

VERHAAK, R.G; HOADLEY, K.A; PURDOM, E; WANG, V; QI, Y; WILKERSON, M.D; MILLER, C.R; DING, L; GOLUB, T; MESIROV, J.P; ALEXE, G; LAWRENCE, M; O'KELLY, M; TAMAYO,P; WEIR, B.A; GABRIEL, S; WINCKLER, W; GUPTA, S; JAKKULA, L; FEILER, H.S; HODGSON, J.G; JAMES, C.D; SARKARIA, J.N; BRENNAN, C; KAHN, A; SPELLMAN, P.T; WILSON, R.K; SPEED, T.P; GRAY, J.W; MEYERSON, M; GETZ, G; PEROU, C.M; HAYES, D.N. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010.

VITALI, R; PALONE, F; CUCCHIARA, S; NEGRONI, A; CAVONE, L; COSTANZO, M; ALOI, M; DILILLO, A; STRONATI, L. Dipotassium Glycyrrhizate Inhibits HMGB1-Dependent Inflammation and Ameliorates Colitis in Mice. *Plos One*, v. 8, n. 6, p. e66527-e66537, 2013.

WANG, B.; WANG, K.; JIN, T.; XU, Q.; HE, Y.; CUI, B.; WANG, Y. NCK1-AS1 enhances glioma cell proliferation, radioresistance and chemoresistance *via* miR-22-3p/IGF1R ceRNA

pathway. Biomed Pharmacotherapy, 2020.

WANG, H; PAN, J.Q; LUO, L; NING, X.J; YE, Z.P; YU, Z; LI, W.S. NF- κ B induces miR-148a to sustain TGF- β /Smad signaling activation in glioblastoma. *Mol Cancer*, v. 14, p. 2-15, 2015.

WANG, L.; WANG, Y.; MUGIYANTO, E.; CHANG, W.; WAN, Y.Y. MiR-22 as a metabolic silencer and liver tumor suppressor. *Liver Res.*, v. 4, n. 2, p. 74-80, 2020.

WESTHOFF, M.A; ZHOU, S; NONNENMACHER, L; KARPEL-MASSLER, G; JENNEWEIN, C; SCHNEIDER, M; HALATSCH, M.E; CARRAGHER, N.O; BAUMANN, B; KRAUSE, A; SIMMET, T; BACHEM, M.G; WIRTZ, C.R; DEBATIN, K.M; Inhibition of NFκB signalingablates the invasive phenotype of glioblastoma. *Mol Cancer Res*, v. 11, n. 12, p. 1611-1623, 2013.

WORLD CANCER REPORT. World Health Organization. [S.l.]: Cap.5, p.16, 2014.

WU, H; LIU, Q; CAI, T; CHEN, Y.D; WANG, Z.F. Induction of microRNA-146a is involved in curcumin-mediated enhancement of temozolomide cytotoxicity against human glioblastoma. *Mol MedRep*, v. 12, n. 4, p. 5461-5466, 2015.

WU, J.; LUO, Y.; JIANG, Q.; et al. Coptisine from Coptis chinensis blocks NLRP3 inflammasome activation by inhibiting caspase-1. *Pharmacol Res*, v. 147, 2019.

XIA, S; LAL, B; TUNG, B; WANG, S; GOODWIN, C.R; LATERRA, J. Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. *Neuro Oncol*, v. 18, n. 4, p. 507-517, 2016.

XU, L.; YU, Y.; SANG, R.; *et al.* Protective Effects of Taraxasterol against Ethanol-Induced Liver Injury by Regulating CYP2E1/Nrf2/HO-1 and NF-κB Signaling Pathways in Mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2018

YAN, H; PARSONS, D.W; JIN, G; MCLENDON, R; RASHEED, B.A; YUAN, W.S; KOS, I; BATINIC-HABERLE, I; JONES, S; RIGGINS, G.J; FRIEDMAN, H; FRIEDMAN, A; REARDON, D; HERNDON, J; KINZLER, K.W; VELCULESCU, V.E; VOGELSTEIN, B; BIGNER, D.D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*, v. 360, n. 8, p. 765-773, 2009.

YANG, G; HAN, D; CHEN, X; ZHANG, D; WANG, L. MiR-196a exerts its oncogenic effect in glioblastoma multiforme by inhibition of IκBα both in vitro and in vivo. *Neuro Oncol*, v. 16, n. 5, p. 652–661, 2014.

YANG, Q.; JIANG, W.; ZHUANG, C.; GENG, Z.; HOU, C.; HUANG, D.; HU, L.; WANG, X. microRNA-22 downregulation of galectin-9 influences lymphocyte apoptosis and tumor cell proliferation in liver cancer. *Oncol Rep.*, v. 34, n. 4, p. 1771-1778, 2015.

YANG, T.Q; LU, X.J; WU, T.F; DING, D.D; ZHAO, Z.H; CHEN, G.L; XIE, X.S; LI, B; WEI, Y.X; GUO, L.C; ZHANG, Y; HUANG, Y.L; ZHOU, Y.X; DU, Z.W. MicroRNA-16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor-κB1/MMP9 signaling pathway. *Cancer Sci*, v. 105, n. 3, p. 265-271, 2014.

YOU, Y.; TAN, J.X.; DAI, H.S.; CHEN, H.W.; XU, X.J.; YANG, A.G.; ZHANG, Y.J.; BAI, L.H.; BIE, P. MiRNA-22 inhibits oncogene galectin-1 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, v. 7, n. 35, p. 57099–57116, 2016.

YOUNG, R. M.; JAMSHIDI, A.; DAVIS, G.; SHERMAN, J. H. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann Transl Med.*, v. 3, n. 15, p. 121, 2015.

ZANOTTO-FILHO, A; BRAGANHOL, E; SCHRODER, R; SOUZA, L.H; DALMOLIN, R.J; PASQUALI, M.A; GELAIN, D.P; BATTASTINI, A.M; MOREIRA, J.C. NFκB inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochem Pharmacol*, v. 81, n. 3, p. 412-424, 2011.

ZAPPAVIGNA, S.; COSSU, A.M.; ABATE, M.; MISSO, G.; LOMBARDI, A.; CARAGLIA, M.; FILOSA, R. A Hydroquinone-Based Derivative Elicits Apoptosis and Autophagy via Activating a ROS-Dependent Unfolded Protein Response in Human Glioblastoma. *Int J Mol Sci.*, v. 20, n. 15, p. 3836, 2019.

ZARAGOZÁ, C.; ÁLVAREZ-MON, MÁ.; ZARAGOZÁ, F.; et al. Flavonoids: Antiplatelet Effect as Inhibitors of COX-1. *Molecules*, v. 27, n. 3, 2022.

ZARAGOZÁ, C.; MONSERRAT, J.; MANTECÓN, C.; et al. Binding and antiplatelet activity of quercetin, rutin, diosmetin, and diosmin flavonoids. *Biomed Pharmacother*, v. 141, 2021.

ZEKRI, A.N.; YOUSSEF, A.S.E.; EL-DESOUKY, E.D.; AHMED, O.S.; LOTFY, M.M.; NASSAR, A.A.; BAHNASSEY, A.A. Serum microRNA panels as potential biomarkers for early detection of hepatocellular carcinoma on top of HCV infection. *Tumour Biol*, v. 37, n. 9, p. 12273–12286, 2016.

ZHAO, J.; CHEN, A.X.; GARTRELL, R.D.; SILVERMAN, A.M.; APARICIO, L.; CHU, T.; BORDBAR, D.; SHAN, D.; SAMANAMUD, J.; MAHAJAN, A.; FILIP, I.; ORENBUCH, R.; GOETZ, M.; YAMAGUCHI, J.T.; CLONEY, M.; HORBINSKI, C.; LUKAS, R.V.; RAIZER, J.; RAE, A.I.; YUAN, J.; CANOLL, P.; BRUCE, J.N.; SAENGER, Y.M.; SIMS, P.; IWAMOTO, F.M.; SONABEND, A.M.; RABADAN, R. Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *Nat Med.*, v. 25, n. 3, p. 462-469, 2019.

ZONG, H; PARADA, L.F; BAKER, S.J. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 7, n.5, 2015.

ZUO, Q.F.; CAO, L.Y.; YU, T.; GONG, L.; WANG, L.N.; ZHAO, Y.L.; XIAO, B.; ZOU, Q.M. MicroRNA-22 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting MMP14 and Snail. *Cell Death Dis.*, v. 6, n. 11, 2015.

ZULCH, K. J. Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System. 110 ed. World Health Organization: Geneva, 1979.

ANEXO I

Classificação dos tumores do Sistema nervoso central segundo a Organização Mundial da Saúde publicada em 2021, 5º edição.

Con	tinua
Astrocitomas difusos do tipo adulto	
Astrocitoma, mutante IDH	
Oligodendroglioma, IDH-mutante e 1p/19q-codeletado	
Glioblastoma, IDH-tipo selvagem	
Astrocitomas difusos de baixo grau do tipo pediátrico	
Astrocitoma difuso, alterado por MYB ou MYBL1	
Glioma angiocêntrico	
Tumor neuroepitelial polimorfo de baixo grau do jovem	
Glioma difuso de baixo grau, via MAPK alterada	
Astrocitomas de alto grau difusos do tipo pediátrico	
Astrocitoma difuso de linha média, H3 K27 alterado	
Astrocitoma hemisférico difuso, mutante H3 G34	
Astrocitoma de alto grau do tipo pediátrico difuso, tipo selvagem H3 e tipo selvagem IDH	
Astrocitoma hemisférico do tipo infantil	
Astrocitomas astrocíticos circunscritos	
Astrocitoma pilocítico	
Astrocitoma de alto grau com características pilóides	
Xantoastrocitoma pleomórfico	
Astrocitoma subependimário de células gigantes	
Astrocitoma cordoide	
Astroblastoma, MN1-alterado	
Tumores Glioneurais e Neuronais	
Ganglioglioma	
Ganglioglioma infantil desmoplásico (DIG)/astrocitoma infantil desmoplásico	
Tumor neuroepitelial disembrioplástico	
Tumor glioneuronal difuso com características semelhantes a oligodendroglioma e Aglomerados	
<u>nucleares (inclusão provisória)</u>	
Tumor glioneuronal papilar	
Tumor glioneuronal formador de roseta	
Tumor glioneuronal mixoide	
Tumor glioneuronal leptomeningeo difuso	
Gangliocitoma	
Tumor neuronal multinodular e vacuolizante	
Gangliocitoma cerebelar displasico (doença de Lhermitte-Duclos)	
<u>Neurocitoma central</u>	
Neurocitoma extraventricular	
Liponeurocitoma cerebelar	

Classificação dos tumores do Sistema nervoso central segundo a Organização Mundial da Saúde publicada em 2021, 5º edição.

Continuação

Tumores ependimários
Ependimoma supratentorial
Ependimoma supratentorial, ZFTA positivo para fusão
Ependimoma supratentorial, positivo para fusão YAP1
Ependimoma da fossa posterior
Ependimoma da fossa posterior, grupo PFA
Ependimoma da fossa posterior, grupo PFB
Ependimoma espinhal
Ependimoma espinhal, amplificado por MYCN
<u>Ependimoma mixopapilar</u>
Subependimoma
Tumores do plexo coróide
Papiloma do plexo coróide
Papiloma atípico do plexo coróide
Carcinoma do plexo coróide
Tumores embrionários
Meduloblastoma
Meduloblastomas, molecularmente definidos
Meduloblastoma, ativado por WNT
Meduloblastoma, ativado por SHH e tipo selvagem TP53
Meduloblastoma, ativado por SHH e mutante TP53
Meduloblastoma, não-WNT/não-SHH
Meduloblastomas, definidos histologicamente
Outros tumores embrionários do SNC
Tumor teratóide/rabdóide atípico
Tumor neuroepitelial cribriforme (inclusão provisória)
Tumor embrionário com rosetas multicamadas (ETMR)
Neuroblastoma do SNC, ativado por FOXR2
Tumor do SNC com duplicação em tandem interna BCOR
Tumor embrionário do SNC
Tumores da pineal
Pineocitoma
Tumor do parênquima pineal de diferenciação intermediária
<u>Pineoblastoma</u>
Tumor papilar da região pineal
Tumor mixóide desmoplásico da região pineal, mutante SMARCB1

Classificação dos tumores do Sistema nervoso central segundo a Organização Mundial da Saúde publicada em 2021, 5º edição.

Continuação

Tumores dos nervos cranianos e paraespinhais
Schwannoma e Schwannoma (intracraniano)
<u>Neurofibroma</u>
Perineurioma
Tumor da bainha do nervo híbrido
<u>Tumor maligno da bainha do nervo melanótico</u>
Tumor maligno da bainha do nervo periférico
Paraganglioma
Meningiomas
Meningioma
Tumores mesenquimais não meningoteliais
Tumores de tecidos moles
Tumores fibroblásticos e miofibroblásticos
Tumor fibroso solitário
Tumores vasculares
Hemangiomas e malformações vasculares
<u>Hemangioblastoma</u>
Tumores do músculo esquelético
Rabdomiossarcoma
diferenciação incerta
Tumor mesenquimal intracraniano, FET-CREB positivo para fusão (inclusão provisória)
Sarcoma rearranjado por CIC
Sarcoma intracraniano primário, mutante DICER1
Sarcoma de Ewing
Tumores condro-ósseos
Tumores condrogênicos
Condrossarcoma mesenquimal
Condrossarcoma
Tumores notocordais
Cordoma (incluindo cordoma pouco diferenciado)
Tumores melanocíticos
Neoplasias melanocíticas meníngeas difusas
Melanocitose meníngea
Melanomatose meníngea
Neoplasias melanocíticas meníngeas circunscritas
Melanocitoma meníngeo
Melanoma meníngeo

Classificação dos tumores do Sistema nervoso central segundo a Organização Mundial da Saúde publicada em 2021, 5º edição.

Conclusão

Tumores	hematolinfóides
Linfoma	5
Linfon	nas do SNC
Linfo	oma difuso primário de grandes células B do SNC
Linf	oma do SNC associado à imunodeficiência
Gran	nulomatose linfomatoide
Linfo	oma intravascular de grandes células B
Linfon	nas raros diversos no SNC
Linf	oma MALT da dura-máter
Outros	s linfomas de células B de baixo grau do SNC
Linf	oma anaplásico de grandes células (ALK+/ALK-)
Linfo	omas de células T e células NK/T
Tumores	histiocíticos
<u>Doença</u>	a de Erdheim-Chester
<u>Doença</u>	a de Rosai-Dorfman
<u>Xantog</u>	ranuloma juvenil
<u>Histioc</u>	itose de células de Langerhans
Sarcon	na histiocítico
Tumores	de células germinativas
Terator	na maduro
Terator	na imaturo
Terator	na com malignidade do tipo somático
<u>Germir</u>	<u>noma</u>
Carcine	oma embrionário
Tumor	do saco vitelino
Corioc	arcinoma
Tumor	misto de células germinativas
Tumores	da região selar
<u>craniof</u>	aringioma adamantinomatoso
<u>craniof</u>	aringioma papilar
pituicit	oma, tumor de células granulares da região selar e oncocitoma de células fusiformes
adenon	na hipofisário (pitNET)
blaston	na pituitário
Metástas	es para o SNC
metásta	ses para o cérebro e parênquima da medula espinhal
<u>metásta</u>	ases para as meninges
D.N.; Perr	v. A.: Wesseling, P.: Brat, D.J.: Cree, I.A.: Figarella-Branger, D.: Hawkins, C.: Ng, H.K.:

Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; Soffietti, R.; von Deimling, A.; Ellison, D.W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

ANEXO II





Bragança Paulista, 28 de setembro de 2023

Projeto de Pesquisa: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO GLICIRRIZINATO DIPOTÁSSIO EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMAS DE ALTO GRAU E MELANOMA E EM MODELOS IN VIVO"

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde Autora: Manoela Marques Ortega Colaboradores: Gabriel Alves Bonafé e Profa. Giovanna Barbarini Longato Instituição: Universidade São Francisco Protocolo: V3: 001.03.2023 IP. Ciuca: 200.225.122.34 CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014 Vigência do Projeto: 02/10/2023 - 02/10/2024 Número e Animais: 36 animais Espécie: Camundongo heterogênico Linhagem: Swiss Peso: 20 a 25gr Idade: 8 semanas Espécie: Machos Total de Animais: Relatório parcial janeiro/2024 e final após o termino da pesquisa. Procedência do Animal: Biotério/CEMIB - UNICAMP

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa – CEUA, da Universidade São Francisco analisou em reunião no dia 28/09/20213, o projeto de pesquisa, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria. Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Inico fabio Caldos prog

Prof. Lúcio Fábio Caldas Ferraz Presidente do Comitê de Ética com Uso de Animais de Experimentação





CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da Atividade Antitumoral do Glicirrizinato Dipotássio em Linhagens Celulares de Gliomas de Alto Grau e Melanoma e em Modelos In Vivo".

Protocolo V3: 001.03.2023 sob responsabilidade da pesquisadora Manoela Marques Ortega, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional e Controle a Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética o Uso de Animais (CEUA da Universidade São Francisco – USF), em reunião do dia 28/09/2023.

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde Autora: Manoela Marques Ortega Colaboradores: Gabriel Alves Bonafé e Profa. Giovanna Barbarini Longato Instituição: Universidade São Francisco Protocolo: V3: 001.03.2023 IP. Ciuca: 200.225.122.34 CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014 Vigência do Projeto: 02/10/2023 - 02/10/2024 Número e Animais: 36 animais Espécie: Camundongo heterogênico Linhagem: Swiss Peso: 20 a 25gr Idade: 8 semanas Espécie: Machos Total de Animais: Relatório parcial janeiro/2024 e final após o termino da pesquisa. Procedência do Animal: Biotério/CEMIB - UNICAMP

Liniofabio Caldos proz

Prof. Lúcio Fábio Caldas Ferraz Presidente do Comitê de Ética com Uso de Animais de Experimentação