

Tatiane Honda Moraes

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE EXTRATOS NATURAIS E
DERIVADOS EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMA HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane Aline Oliveira Silva

**Barretos, SP
2016**

Tatiane Honda Moraes

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE EXTRATOS NATURAIS E
DERIVADOS EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMA HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane Aline Oliveira Silva

**Barretos, SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

M827c Morais, Tatiane Honda.
Caracterização in vitro do potencial antineoplásico de extratos naturais e derivados em linhagens celulares de glioma humano / Tatiane Honda Morais. - Barretos, SP 2016.
156 f. : il.

Orientador: Dr. Rui Manuel Vieira dos Reis
Co-Orientador: Dr^a. Viviane Aline Oliveira Silva

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2016.

1. Glioma. 2. Fitoterapia. 3. Plantas medicinais. 4. Extratos vegetais. 5. Melastomataceae. 6. Euphorbia peplus. I. Autor. II. Silva, Viviane Aline Oliveira. III. Reis, Rui Manuel Vieira. IV. Título

CDD 616.9

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tatiane Honda Morais

Caracterização in vitro do potencial antineoplásico de extratos naturais e derivados em linhagens celulares de glioma humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 01/08/2016

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Puericultura e Pediatria - USP

Prof.^a Dra. Denise Crispim Tavares

Instituição: Universidade de Franca - UNIFRAN

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Prof.^a Dra. Céline Marques Pinheiro

Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) (MCTI/FINEP/MS/SCTIE/DECIT-01/2013 - FPXII-BIOPLAT – processo número 1302/13) e CNPq através de Auxílio à Pesquisa (processo número 405451/2014-0).

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Bolsa de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 2014/15271-2).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão do FINEP, CNPq e FAPESP.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

“Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo”.

*Dedico este trabalho a Deus, minha família,
amigos e colegas pelo carinho e apoio
incondicional durante mais essa trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rui Manuel Reis**, pela oportunidade concedida e por seus ensinamentos ao longo destes anos. Obrigada por me orientar e me apoiar mesmo diante dos meus momentos de ansiedade e aflições.

À minha co-orientadora, **Prof^a. Dr^a. Viviane Aline Oliveira Silva**, pelo apoio, incentivo, por acreditar em mim e me ensinar durante todo o mestrado. Agradeço acima de tudo a amizade e o companheirismo adquiridos durante esse período. A você fica minha eterna gratidão, carinho e respeito.

A Deus, por fortalecer em mim a fé, força, serenidade e sabedoria para que todas as minhas dificuldades e “pedras no caminho” fossem encaradas como mais um desafio que a vida me proporcionava.

Aos meus pais, **Ana Paula e Marcos**, meu imenso agradecimento pela dedicação, compreensão, paciência, amor e carinho comigo. Obrigada por me apoiarem e confortarem para que eu pudesse conquistar mais este objetivo em minha vida.

À minha irmã, **Brenda**, por sempre me incentivar, apoiar e aconselhar. Você sem dúvida foi muito importante para que eu pudesse seguir em frente. Obrigada!

Ao meu noivo, **José Ricardo**, que esteve ao meu lado sempre, me apoiando e sendo companheiro ao longo destes anos. Obrigada por todo amor, carinho, compreensão, incentivo e principalmente, por entender minhas ausências.

À **minha família** pela paciência, compreensão, apoio, incentivo e amor incondicional.

À minha equipe, especialmente à **Marcela Nunes, Larissa Russo, Ana Laura Vieira, Carla Munari, Ana Gabriela Silva, Izabela Faria e Gabriel** por todo o carinho, amizade, compreensão, paciência e suporte. Agradeço a oportunidade de ter conhecido pessoas tão

especiais, as quais pude dividir inúmeros momentos importantes da minha vida, fossem eles bons ou ruins. A vocês devo minha gratidão eterna pelos conselhos, risadas e até mesmo os “puxões de orelha” necessários para que eu pudesse continuar e encerrar mais essa etapa. Obrigada vocês foram essenciais nessa caminhada!

*Aos **colegas de trabalho e amigos** do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular que constitui ao longo do mestrado. Em especial, agradeço à **Karina Pepineli, Jéssica Montozo, Estelinha, Paula Pastrez, Vânia Sammartino, Weder Menezes, Aline Rocha, Paula Felício, Fernanda Cury, Anna Luiza, Maraísa e a Cintia** por todo carinho, força, apoio e amizade. Vocês sempre farão parte da minha vida.*

*Aos biólogistas, especialmente, à **Adriana Cruvinel, André Lengert, Carol Laus, Karina Pepineli e Renato de Oliveira** pela amizade, apoio e suporte sempre que necessário.*

*À secretária do Centro de Pesquisa, **Cintia Perin Nunes**, pelo apoio, carinho e suporte durante todo esse período.*

*À **Dra. Aline Tansini** pela prontidão em ajudar sempre que necessário com as análises de citometria de fluxo deste trabalho. Acima de tudo muito obrigada pelo carinho e amizade.*

*Aos **pesquisadores** do Centro de Pesquisa (CPOM), em especial ao **Dr. Matias Melendez** por toda disposição em ajudar sempre que necessário.*

*Ao **IEP** pelo apoio e suporte.*

*À biblioteca do IEP, em especial ao **Martins e à Milene**, pelo auxílio e suporte sempre que necessário.*

*Ao escritório de projetos (EPIT), principalmente ao **Kaio e a Joyce** por todo o suporte prestado.*

Aos membros das bancas de acompanhamento e qualificação, **Dra. Céline Marques Pinheiro** e **Dr. Carlos Alberto Scrideli** pela prontidão e auxílio, por todas as sugestões e imensa colaboração para este trabalho.

Ao **Programa de Pós-graduação** do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos pela oportunidade.

À secretaria de Pós-graduação, **Silvana Rodrigues Guitarrari, Brenda Honda Morais e Simone Neves Nogueira** pela eficiência, paciência, comprometimento e sempre estarem à disposição para auxiliar no que fosse preciso.

Aos **estatísticos** do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, em especial ao **Marco Antônio** pelo auxílio e escolha dos testes estatísticos.

À **UFSJ**, em especial à **Dra. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro** pela parceria, apoio e por nos ceder os compostos naturais deste estudo.

Ao **FINEP, CNPq, FAPEMIG** e ao **Hospital de Câncer de Barretos** pelo financiamento.

À **FAPESP** pelo financiamento deste projeto através da bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa da minha vida. Muito Obrigada!

“Tudo posso naquele que me fortalece”.

(Filipenses 4:13)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Gliomas	1
1.1.1	Epidemiologia e classificação	1
1.2	Glioblastomas	3
1.2.1	Glioblastomas primários e secundários	3
1.2.2	Tratamento de glioblastomas	4
1.2.3	Alterações moleculares no câncer	4
1.2.4	Alterações moleculares em gliomas/ glioblastoma	6
1.3	Produtos naturais como alternativa terapêutica	8
1.3.1	Família <i>Melastomataceae</i>	10
1.3.2	Família <i>Euphorbiaceae</i> e derivados	11
1.4	Abordagens utilizadas para a descoberta de compostos naturais	14
2	JUSTIFICATIVA	16
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1	Linhagens celulares estabelecidas	18
4.2	Linhagem tumoral de cultura primária estabelecida	21
4.3	Obtenção dos compostos	21
4.3.1	Extratos	21
4.3.2	Particionamento do extrato 19 e sua caracterização por RMN	22
4.3.3	Composto sintético	23

4.4	Determinação da viabilidade celular	24
4.5	Determinação da IC ₅₀	25
4.6	Curvas de diluição	25
4.6.1	Curva de diluição dos extratos naturais e suas partições	25
4.6.2	Curva de diluição do composto sintético e do quimioterápico (TMZ)	26
4.7	Determinação do índice de seletividade	26
4.8	Caracterização das principais vias sinalizadoras ativadas/inibidas pelos extratos e compostos sintéticos	27
4.8.1	Ensaio de <i>Western Blot</i>	27
4.8.2	Ensaio de fracionamento celular	29
4.9	Caracterização funcional dos tratamentos com os extratos naturais/derivado	29
4.9.1	Ensaio de ciclo celular	29
4.9.2	Ensaio de migração celular (<i>wound healing</i>)	30
4.9.3	Ensaio de migração celular (<i>transwell</i>)	30
4.9.4	Ensaio de invasão celular	31
5	Análise Estatística	32
6	Delineamento experimental	33
6.1	Aspectos éticos	34
7	RESULTADOS	35
7.1	Análise do perfil de citotoxicidade dos extratos brutos	35
7.1.1	Análise do perfil de citotoxicidade das partições do extrato bruto 19	42
7.2	Efeitos dos extratos 17, 18 e 19 na ativação/inibição de vias de sinalização intracelular em linhagens de glioma	52
7.3	Efeitos do extrato 19 e partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na ativação/inibição de vias de sinalização intracelular em linhagens de glioma	55
7.4	Caracterização biológica dos extratos brutos/partições	58

7.4.1	Ensaio de ciclo celular	58
7.4.2	Ensaio de migração celular (<i>wound healing</i>)	60
7.4.3	Ensaio de migração celular (<i>transwell</i>)	64
7.4.4	Ensaio de invasão celular (<i>transwell</i>)	65
7.5	Composto sintético - PEP005	66
7.5.1	Análise do perfil de citotoxicidade do composto sintético PEP005	66
7.6	Efeitos do PEP005 no perfil de expressão/atividade das isoformas PKCs em linhagens de glioma	72
7.7	Efeitos dos compostos, PEP005 e PMA, na ativação de proteínas PKCs por translocação celular em linhagem de glioma	76
7.8	Efeitos do composto PEP005 na ativação/inibição de vias de sinalização intracelular em linhagens de glioma	77
7.9	Caracterização biológica do composto sintético PEP005	80
7.9.1	Ensaio de ciclo celular	80
7.9.2	Ensaio de migração celular (<i>transwell</i>)	83
7.9.3	Ensaio de invasão celular (<i>transwell</i>)	84
8	DISCUSSÃO	85
8.1	Extratos e partições	85
8.2	Composto sintético PEP005	94
9	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	102
	ANEXOS	114
Anexo A -	Parecer consubstanciado do CEP	114
Anexo B -	Espectro obtido por RMN evidenciando as principais moléculas encontradas no extrato bruto	115

Anexo C -	Espectro obtido por RMN evidenciando as principais moléculas encontradas na partição B (hexânica) do extrato bruto 19	118
Anexo D -	Espectro obtido por RMN evidenciando as principais moléculas encontradas na partição C (clorofórmica) do extrato bruto 19	120
Anexo E -	Espectro obtido por RMN evidenciando as principais moléculas encontradas na partição D (aceto-etílica) do extrato bruto 19	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	As seis alterações fundamentais para o desenvolvimento tumoral.	5
Figura 2 -	Principais genes alterados em gliomas.	7
Figura 3 -	Espécies da família <i>Melastomataceae</i> utilizadas no presente estudo: <i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana, <i>Miconia chamissois</i> Naudin e <i>Miconia cuspidata</i> Naudin.	11
Figura 4 -	Espécie da família <i>Euphorbiaceae</i> : <i>Euphorbia peplus</i> .	14
Figura 5 -	Fluxograma do isolamento de compostos secundários ativos guiados por bioensaio.	15
Figura 6 -	Estrutura química do composto sintético PEP005.	24
Figura 7 -	Delineamento experimental.	33
Figura 8 -	Efeito da concentração dos extratos naturais 1, 2, 3 e 7 em linhagens comerciais de astrócito normal, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma.	36
Figura 9 -	Efeito da concentração dos extratos naturais 8, 17, 18 e 19 em linhagens comerciais de astrócito normal, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma.	37
Figura 10 -	Efeito da concentração dos extratos naturais 10, 14-I, 15-I, 16-I e 21-I em linhagens comerciais de astrócito normal, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma.	38
Figura 11 -	Valores de IC ₅₀ dos extratos naturais 1, 2, 3, 7, 8, 10, 14-I, 15-I, 16-I e 21-I e quimioterápico padrão TMZ em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma.	40
Figura 12 -	Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições A, B, C e D em linhagens comerciais de astrócito normal, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma.	43
Figura 13 -	Perfil de citotoxicidade do extrato bruto 19 e suas partições A, B, C e D em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma em relação ao quimioterápico padrão Temozolamida (TMZ).	44

Figura 14 - Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de astrócito humano NHA.	47
Figura 15 - Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de glioma humano adulto GAMG.	48
Figura 16 - Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de glioma humano adulto U251-MG.	49
Figura 17 - Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de glioma humano pediátrico SF188.	50
Figura 18 - Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de glioma humano pediátrico RES259.	51
Figura 19 - Efeito dos extratos brutos na expressão das proteínas, ERK e AKT, nas linhagens comerciais de glioma.	53
Figura 20 - Efeito dos extratos brutos na atividade da proteína H2AX nas linhagens comerciais de glioma.	54
Figura 21 - Efeito dos extratos brutos na expressão de p27 nas linhagens comerciais de glioma.	55
Figura 22 - Efeito do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na clivagem da proteína PARP nas linhagens comerciais de glioma.	56
Figura 23 - Efeito do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na expressão de p21 nas linhagens comerciais de glioma.	57
Figura 24 - Efeito do extrato bruto 19, partições B (hexânica) e C (clorofórmica) e quimioterápico TMZ na distribuição do ciclo celular na linhagem de glioma humano adulto GAMG.	58
Figura 25 - Efeito do extrato bruto 19, partições B (hexânica) e C (clorofórmica) e quimioterápico TMZ na distribuição do ciclo celular na linhagem de glioma humano adulto U251-MG.	59
Figura 26 - Efeito dos extratos brutos 17 e 18 na migração celular na linhagem celular de glioma RES259.	61

Figura 27 - Efeito dos extratos brutos 17 e 18 na migração celular na linhagem celular de glioma U251-MG.	62
Figura 28 - Efeito dos extratos brutos 17 e 18 na migração celular na linhagem celular de glioma GAMG.	63
Figura 29 - Efeito do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na migração celular em linhagens celulares de glioma GAMG e U251-MG.	64
Figura 30 - Efeito do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na invasão celular em linhagens celulares de glioma GAMG e U251-MG.	65
Figura 31 - Efeito da concentração do PEP005 na linhagem comercial de glioma humano adulto (GAMG).	66
Figura 32 - Efeito da concentração do PEP005 em linhagens comerciais de astrócito (NHA) e glioma humano pediátrico (SF188 e RES259).	67
Figura 33 - Efeito da concentração do PEP005 em linhagens comerciais de glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma.	68
Figura 34 - Efeito da concentração do quimioterápico temozolamida (TMZ) em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma.	69
Figura 35 - Comparação dos valores de IC ₅₀ do composto PEP005 em relação ao quimioterápico temozolamida em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma.	70
Figura 36 - Efeito do PEP005 e PMA no perfil de expressão das isoformas PKC α , p-PKC α / β II, PKC δ , p-PKC δ / θ , p-PKC ζ / λ , PKC ζ , p-PKC δ , p-PKD/PKC μ (Ser744/748), p-PKD/PKC μ (Ser916), PKD/PKC μ e p-PKC Pan (β II Ser660) de linhagens comerciais de glioma adulto (GAMG e U251-MG) e pediátrico (SF188 e RES259).	73
Figura 37 - Efeito do PEP005 no perfil de expressão das isoformas PKC α , p-PKC α / β II, PKC δ , p-PKC δ / θ , PKC ϵ p-PKC θ , p-PKC ζ / λ , PKC ζ , p-PKC δ , p-PKD/PKC μ (916), p-PKD/PKC μ (744/748), PKD/PKC μ e p-PKC Pan (β II Ser660) de linhagens comerciais de glioma adulto (GAMG e U251-MG) e pediátrico (SF188 e RES259).	75
Figura 38 - Efeito dos compostos, PEP005 e PMA, na indução da ativação de PKC α por translocação do citosol para a membrana celular.	76

Figura 39 - Efeito do composto PEP005 na modulação da expressão das proteínas, ERK e AKT, nas linhagens comerciais de glioma.	77
Figura 40 - Efeito do composto PEP005 na clivagem da proteína caspase-3 nas linhagens comerciais de glioma.	78
Figura 41 - Efeito do composto PEP005 na expressão da proteína H2AX nas linhagens comerciais de glioma.	79
Figura 42 - Efeito do PEP005 na expressão de p21 e p27 nas linhagens comerciais de glioma.	80
Figura 43 - Efeito do composto PEP005 e do quimioterápico TMZ na distribuição do ciclo celular em linhagem comercial de glioma humano adulto (GAMG).	81
Figura 44 - Efeito do composto PEP005 e do quimioterápico TMZ na distribuição do ciclo celular em linhagem comercial de glioma humano adulto (U251-MG).	82
Figura 45 - Efeito do composto PEP005 na migração celular em linhagens celulares de glioma GAMG e U251-MG.	83
Figura 46 - Efeito do composto PEP005 na invasão celular em linhagens celulares de glioma GAMG e U251-MG.	84
Figura 47 - Diagrama sobre os possíveis mecanismos de ação dos extratos brutos 17 e 18 nas linhagens de glioma.	93
Figura 48 - Diagrama sobre os possíveis mecanismos de ação do extrato bruto 19 e partição C nas linhagens de glioma.	93
Figura 49 - Diagrama sobre as possíveis isoformas de PKCs moduladas pelo composto PEP005 nas linhagens de glioma.	97
Figura 50 - Diagrama sobre os possíveis mecanismos de ação do composto PEP005 nas linhagens de glioma.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos gliomas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).	3
Tabela 2 -	Painel de linhagens celulares estabelecidas de glioma e astrócito normal humano.	19
Tabela 3 -	Classificação de extratos naturais originários da flora Brasileira.	22
Tabela 4 -	Compostos secundários majoritários presentes no extrato 19 e partições de plantas do gênero <i>Miconia</i> obtidos através de estudo fitoquímico.	23
Tabela 5 -	Relação de anticorpos primários utilizados nos ensaios de <i>western blot</i> .	28
Tabela 6 -	Média e desvio padrão dos valores de IC ₅₀ para os extratos naturais da flora Brasileira e quimioterápico TMZ.	41
Tabela 7 -	Índice de seletividade para os extratos naturais da flora Brasileira e quimioterápico TMZ.	42
Tabela 8 -	Média e desvio padrão dos valores de IC ₅₀ para o extrato bruto 19, partições e quimioterápico TMZ.	45
Tabela 9 -	Índice de seletividade para o extrato bruto 19, partições e quimioterápico TMZ	46
Tabela 10 -	Média e desvio padrão dos valores de IC ₅₀ para a cinética com o extrato bruto 19 e partições B (hexânica) e C (clorofórmica).	52
Tabela 11 -	Média da porcentagem de células e desvio padrão para a linhagem de glioma (GAMG) tratada com o extrato 19 e suas partições e o quimioterápico TMZ.	59
Tabela 12 -	Média da porcentagem de células e desvio padrão para a linhagem de glioma (U251-MG) tratada com o extrato 19 e suas partições e o quimioterápico TMZ.	60
Tabela 13 -	Valores de IC ₅₀ e desvio padrão do composto sintético e o quimioterápico TMZ para as linhagens de glioma.	71
Tabela 14 -	Média da porcentagem de células e desvio padrão para a linhagem de glioma (GAMG) tratada com o PEP005 e o quimioterápico TMZ.	72
Tabela 15 -	Média da porcentagem de células e desvio padrão para a linhagem de glioma (U251-MG) tratada com o PEP005 e o quimioterápico TMZ.	81

Tabela 16 - Índice de seletividade para o composto sintético e quimioterápico TMZ. 82

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
ATR	Ataxia Telangiectasia Relacionada a Rad3
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca ²⁺	Cálcio
CEP	Comitê de Etica em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECL	<i>Electrochemiluminescence ou Electrogenenerated Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EPIT	Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
GLA	<i>Gamma Linolenic Acid</i>
GLUT-1	<i>Glucose Transporter 1</i>
GSTs	Genes Supressores Tumorais
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HTS	<i>High Throughtput Screening</i>
H2AX	<i>Histone 2AX</i>
IC ₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
ID	Indeterminado

IDH	<i>Isocitrate Dehydrogenase</i>
IEP	Instituto de Ensino e Pesquisa
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de Seletividade
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MGMT	<i>O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i>
MMPs	<i>Matrix Metaloproteinases</i>
MTS	<i>[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS]</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
<i>NF1</i>	<i>Neurofibromatosis type I</i>
NHA	<i>Normal Human Astrocytes</i>
n.s.	Não Significativo
Na ₃ VO ₄	<i>Sodium Orthovanadate (Activated)</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
P/S	<i>Penicilin/ Streptomycin</i>
PSMF	<i>Protein-Sparing Modified Fast</i>
PES	<i>Phenazine Ethosulfate</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PKD/PKC μ	<i>Protein Kinase D/ Protein Kinase C μ</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SBF	<i>Fetal Bovine Serum</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>

SUS	Sistema Único de Saúde
<i>TERT</i>	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TMX	Tamoxifeno
TMZ	Temozolamida
TRADD	<i>TNF-R1 Associated Death Domain</i>
TBST	<i>Tris-buffered Saline with Tween</i>
UFSJ	Universidade Federal de São João del-Rei
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
βI	Beta I
βII	Beta II
δ	Delta
ϵ	Épsilon
η	Eta
γ	Gama
ι	Iota
λ	Lâmbida
cm^2	Centrímetro quadrado
mM	Milimolar
M	Molar
nM	Nanomolar
$\mu g/mL$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μ	Mú
θ	Theta
ζ	Zeta
%	Porcentagem
*	Asterisco
+	Mais ou Presente
-	Menos ou Ausente
\pm	Mais ou menos
<	Menor
/	Divisão
()	Parênteses
'	Apóstrofo
°C	Grau Celsius

RESUMO

Morais, T.H. Caracterização *in vitro* do potencial antineoplásico de extratos naturais e derivados em linhagens celulares de glioma humano. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2016.

JUSTIFICATIVA: Os gliomas correspondem a aproximadamente 70% dos casos de tumores cerebrais. Dentre os gliomas, o glioblastoma é o subtipo mais frequente e agressivo. A terapia padrão utilizada, a temozolamida (TMZ), ainda é essencialmente paliativa, sendo assim, se faz necessário a busca de terapias alternativas que minimizem os sintomas dos pacientes acometidos por estes tumores. A utilização de novos agentes antineoplásicos de origem natural tem revelado uma grande eficácia e oferece um amplo campo para investigação científica. Estudos têm mostrado que plantas da flora Brasileira, *Melastomataceae* e *Euphorbiaceae*, têm sido amplamente utilizadas na medicina popular como analgésicos, anti-inflamatórios, e até mesmo, como antineoplásicos. Neste contexto, este trabalho justifica-se pela busca de terapias alternativas com origem na biodiversidade Brasileira para o tratamento de gliomas, utilizando um amplo painel de linhagens que recapitulem as relações genótipo-resposta. **OBJETIVO:** Caracterizar o efeito antineoplásico *in vitro* de extratos naturais e do composto sintético PEP005 em linhagens celulares de glioma humano. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Utilizou-se um painel de 13 linhagens de glioma humano, incluindo: (7 glioma adulto, 5 glioma pediátrico, 1 linhagem primária estabelecida e 1 linhagem de astrócito normal). Neste painel de linhagens, avaliou-se: i) a citotoxicidade (IC₅₀) de 13 extratos naturais e do composto sintético PEP005, através da técnica de MTS; ii) os efeitos biológicos dos 3 extratos naturais selecionados e PEP005 na morte, migração e invasão celular para as linhagens de glioma humano, através de ensaios de *western blot*, *wound healing*, *transwell* e matrigel, respectivamente e iii) as principais vias de sinalização envolvidas nos efeitos dos extratos naturais selecionados e PEP005 por *western blot*. **RESULTADOS:** Resultados mostraram efeitos citotóxicos de 3 extratos (17, 18 e 19), obtidos de plantas da família *Melastomataceae*. Quando comparados aos demais extratos testados, os extratos 17, 18 e 19 evidenciaram uma média nos valores de IC₅₀ de 25,54, 36,27 e 35,59 µg/mL, respectivamente. Adicionalmente, as partições do extrato bruto 19 foram testadas, sendo a partição C (clorofórmica) a que apresentou maior atividade citotóxica para as

linhagens de glioma quando comparada às outras partições avaliadas, sendo a média do valor de IC₅₀ das linhagens tumorais de 19,79 µg/mL. Os extratos brutos 17, 18 e 19 mostraram ainda promover dano no DNA (H2AX) em linhagens sensíveis de glioma (GAMG e SF188) e modular a atividade da proteína reguladora do ciclo celular p27 na linhagem de glioma mais resistente aos tratamentos (RES259). A exposição ao extrato 19 e suas partições, hexânica e clorofórmica, também foi investigada em relação aos mecanismos de morte celular, revelando a clivagem da proteína PARP nas linhagens de glioma (GAMG e U251-MG). Além disso, um aumento da expressão de p21 foi observado para a partição clorofórmica mais citotóxica nas linhagens de glioma (GAMG e U251-MG). Os resultados mostraram ainda, que o extrato 19 e suas partições não foram capazes de promover a inibição do processo de migração e invasão celular, e modulação na distribuição do ciclo celular nas linhagens de glioma estudadas. Efeitos citotóxicos do PEP005 também foram vistos em linhagens de glioma, apresentando uma média dos valores de IC₅₀ de 25,65 µg/mL. Os resultados mostraram ainda, que o PEP005 parece modular as isoformas das proteínas PKCs (p-PKCα/β II, PKCα e PKD/PKCμ) em gliomas. O tratamento com o PEP005 mostrou ser um indutor na ativação de PKCα através do processo de translocação celular. O composto PEP005 parece atuar ainda, em vias de sobrevivência e proliferação, bem como na ativação da proteína de reparo do DNA H2AX, e aumento da atividade de proteínas reguladoras do ciclo celular, p21 e p27. Além disso, não houve inibição significativa dos mecanismos de migração e invasão celular nas linhagens celulares de glioma tratadas com este composto.

CONCLUSÃO: Estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando extratos naturais são importantes para explorar o seu impacto clínico. Os estudos preliminares evidenciaram que o composto PEP005 e os extratos naturais obtidos de plantas Brasileiras da família *Melastomataceae* exibiram um potencial antineoplásico *in vitro* em linhagens de glioma e uma melhor caracterização será necessária para confirmar os mecanismos de ação dos mesmos como uma nova estratégia para o tratamento de gliomas.

PALAVRAS-CHAVE: glioma; fitoterapia; plantas medicinais; extratos vegetais; *Melastomataceae*; *Euphorbia peplus*.

ABSTRACT

Morais, T.H. In vitro characterization of the antineoplastic potential of natural extracts and derivatives in human glioma cell lines. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2016.

BACKGROUND: Gliomas account for more than 70% of brain tumours cases. Among gliomas, glioblastoma is the most common and aggressive subtype. The standard therapy used, temozolomide (TMZ), is still essentially palliative, therefore it is necessary to search alternative therapies that minimize the symptoms of patients affected by these tumors. The use of new anticancer agents from natural origin has shown a high efficiency and offers a wide field for scientific research. Studies have shown that plants from Brazilian flora, *Melastomataceae* and *Euphorbiaceae* have been widely used in popular medicine as analgesic, anti-inflammatory and even, as antitumor treatment. In this context, this work is justified by the search of alternative therapies with origin in the Brazilian biodiversity to the treatment of gliomas using a wide panel of cell lines that recapitulate the genotype-response relations. **AIM:** We aimed to characterize, *in vitro*, the effect of natural extracts and PEP005 compound on human glioma cell lines. **MATERIALS AND METHODS:** We studied a panel of 13 human glioma cell lines, including: (7 adults glioma, 5 pediatric glioma, 1 primary cell line established and 1 cell line of normal astrocyte). In this panel of glioma cell lines were evaluated: i) the cytotoxicity (IC₅₀) of natural extracts and PEP005 compound to compare the effect of standard chemotherapy (TMZ) in human glioma cell lines by MTS assay; ii) the biological effects of three selected natural extracts and PEP005 synthetic in cell death, migration and invasion on glioma cell lines, by western blot, wound healing, transwell and matrigel assays, respectively; iii) the main signaling pathways involved in the effects of natural extracts and PEP005 compound by *Western blot* assay. **RESULTS:** Results showed cytotoxic effects of 3 extracts (17, 18 and 19), obtained Melastomataceae plants. When compared to other plant extracts, 17, 18 and 19 extracts showed an mean IC₅₀ value of 25.54, 36.27 and 35.59 µg/mL, respectively. Additionally, the partitions of the crude extract 19 were tested, and the C partition (chloroform) showed a cytotoxic activity higher against the glioma cell lines, when compared the other evaluated partitions, with the average IC₅₀ value of tumor cell lines of 19.79 µg/mL. The extracts 17, 18 and 19 have shown to promote

DNA damage (H2AX) in the cell lines of glioma (GAMG and SF188) more sensitive and modulation of the activity of the regulatory protein of cell cycle p27 in glioma cell lines more resistant to treatment (RES259). The extract 19 and its partitions also have been investigated in relation to PARP protein activity showed cleavage of PARP protein for the treatment with the extract as well as with its hexane and chloroform partitions on glioma cell lines (GAMG and U251-MG). Furthermore, an increase in p21 expression was observed for the Partition C (chloroform) the more cytotoxic of glioma cell lines (U251-MG and GAMG). The results show also that the extract 19 and its partitions have not been able to cause the inhibition of the migration and invasion process on glioma cell lines studied. Cytotoxic effects of PEP005 also have been seen in glioma cell lines, that showed a mean IC_{50} value of 25.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results also showed that PEP005 appears to modulate protein PKCs (p-PKC α/β II and PKC α) in gliomas. The treatment with PEP005 showed to be an inducer in PKC α activation through cell translocation process. O PEP005 compound also appears to act on the proliferation and survival pathways, as well as activation of DNA repair protein H2AX, and increased activity of cell cycle regulatory proteins, p21 and p27. Furthermore, there hasn't significant inhibition of cellular migration and cell invasion mechanisms on glioma cell lines treated with this compound. **CONCLUSIONS:** *In vitro* and *in vivo* studies using natural extracts are important to explore their clinical impact. Preliminary studies showed that PEP005 compound and natural extracts from plants Brazilian of *Melastomataceae* showed an antineoplastic potential *in vitro* on glioma cell lines and better characterization will be needed to confirm the mechanism of action of the same as a new strategy for gliomas treatment.

KEYWORDS: glioma; phytotherapy; medicine traditional; plant extracts; *Euphorbia peplus*.

1- INTRODUÇÃO

O câncer é responsável por um número significativo e crescente de pacientes no mundo, e representa a segunda causa de morte da população mundial¹. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que 8,2 milhões de mortes entre homens e mulheres ocorreram em 2012². Além disso, para o ano 2030 poderão ser esperados 21,4 milhões de casos incidentes de câncer².

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), as estimativas para o ano de 2016, válidas também para o ano de 2017, apontam a ocorrência de aproximadamente 420 mil novos casos de câncer, sendo excluídos deste índice os casos de câncer de pele não melanoma que perfazem um total de 180 mil novos casos³. Dessa forma, estas estimativas reforçam a magnitude do problema do câncer e despertam o interesse iminente no desenvolvimento de novas abordagens com ação antitumoral³.

1.1- Gliomas

1.1.1- Epidemiologia e classificação

Os tumores cerebrais representam cerca de 2% de todos os tipos de neoplasias malignas⁴. Apesar da baixa frequência, estes tumores apresentam elevada taxa de mortalidade, atingindo cerca de 70-76%. A incidência europeia de tumor primário do Sistema Nervoso Central (SNC) apresenta uma variação de 4,5-11,2 casos para cada 100.000 homens e 1,6-8,5 para cada 100.000 mulheres. Entre os tumores cerebrais, os gliomas, lesões originadas a partir das células gliais ou células precursoras, são as neoplasias de maior frequência (acima de 70%)⁵. Este tipo tumoral acomete pacientes idosos, acima dos 60 anos, mas, podem também ocorrer na infância, sendo atualmente a principal causa de morte associada a câncer nesta faixa etária^{6,7,8}. A classificação mais utilizada para os gliomas é a da OMS. De acordo com a OMS (2007)⁸, os gliomas podem ser classificados histologicamente em quatro subgrupos: **tumores astrocíticos** (astrocitoma pilocítico (grau I), xantastrocitoma pleomórfico (grau II), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III), glioblastoma (grau IV - considerado o mais agressivo), gliossarcoma (grau IV) e glioblastoma de células gigantes (grau IV)); **oligodendrogliais** (oligodendroglioma (grau II) e oligodendroglioma anaplásico (grau III)); **gliomas mistos** (oligoastrocitoma (grau II) e

oligoastrocitoma anaplásico (grau III)); e **tumores endimários** (subependimoma (grau I), mixopapilar (grau I), endimoma (grau II) e endimoma anaplásico (grau III))^{6, 7, 9, 10}. Entretanto, recentemente a OMS¹¹ realizou uma re-classificação para os gliomas, sendo estes subdivididos histologicamente em três grandes grupos: **tumores astrocíticos difusos e oligodendrogliais** (astrocitoma difuso, *IDH*-mutante (grau II), astrocitoma anaplásico, *IDH*-mutante (grau III), glioblastoma, *IDH*-tipo selvagem (grau IV), glioblastoma, *IDH*-mutante (grau IV), sendo o glioblastoma considerado o tipo tumoral mais agressivo, glioma linharmédia difuso, *H3K27M*-mutante (grau IV), oligodendrogloma, *IDH*-mutante e *1p19q* co-deletado (grau II) e oligodendrogloma anaplásico, *IDH*-mutante e *1p19q* co-deletado (grau III)); **outros astrocíticos** (astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma subependimal de células gigantes (grau I), xantoastrocitoma pleomórfico (grau II), xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico (grau III)); e **tumores endimários** (subependimoma (grau I), endimoma mixopapilar (grau I), endimoma (grau II), endimoma, fusão-positiva *RELA* (grau II ou III) e endimoma anaplásico (grau III))¹¹. A OMS ainda classifica estes tumores quanto ao grau de malignidade, as características biológicas das células tumorais (índice mitótico, atipia nuclear, proliferação vascular e necrose) e também ao comportamento clínico destes tumores. Sendo assim, neoplasias de grau I e II são consideradas de baixo grau e as de grau III e IV são de alto grau^{9, 11} (Tabela 1). Neoplasias de grau I possuem baixo potencial de proliferação e há possibilidade de cura apenas por ressecção cirúrgica. Alguns tumores de grau II evoluem ao longo do tempo para graus mais elevados. As neoplasias de grau III apresentam sinais histológicos de malignidade que podem ser: atipia nuclear e atividade mitótica significativa¹², enquanto que as neoplasias de grau IV são as de maior malignidade da doença, apresentando atipia citológica, mitoses, necrose e possuem um processo evolutivo clínico rápido¹³. Dentre os gliomas, o glioblastoma (grau IV-OMS) é o subtipo mais agressivo e também o mais frequente^{6, 14, 15, 16}. Os gliomas mais incidentes em adultos são os astrocitomas (grau II a IV-OMS), oligodendroglomas (II e III-OMS) e oligoastrocitomas (grau II e III-OMS) contrapondo os astrocitomas pilocíticos (grau I-OMS) e xantoastrocitomas pleomórficos (grau II-OMS) que acometem comumente crianças, sendo estes dois últimos os que mais conferem chances de cura cirúrgica¹⁷.

Tabela 1- Classificação dos gliomas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).

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

Fonte: (Adaptada de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4th Edition-OMS, 2007*)⁶.

1.2- Glioblastomas

1.2.1- Glioblastomas primários e secundários

O glioblastoma constitui um dos maiores desafios na oncologia. A média de sobrevida de pacientes acometidos por esta doença é de 12 a 15 meses e tem evoluído muito pouco nas últimas décadas^{7,18,19}. Uma das principais características destes tumores é a elevada heterogeneidade intratumoral, sua capacidade de infiltrar e invadir o tecido normal adjacente, e a resistência inata às distintas opções terapêuticas atuais^{20, 21,22}.

Os glioblastomas podem ser subdivididos clinicamente em dois grupos: glioblastomas primários, ou *de novo*, e glioblastomas secundários²². Os primários surgem sem nenhuma evidência clínica de lesão maligna precursora, possuem evolução acelerada e, acometem pessoas mais idosas, em torno dos 60 anos de idade²³. Os glioblastomas secundários acometem adultos jovens de aproximadamente 45 anos, surgem a partir da progressão de lesões como o astrocitoma de grau II ou astrocitoma de grau III e evoluem de forma mais lenta²⁴.

1.2.2- Tratamento de glioblastomas

Apesar do tratamento dos glioblastomas ser dependente de uma série de fatores, tais como, localização e tamanho do tumor, e idade do paciente, a grande maioria dos pacientes é rotineiramente submetida à terapia agressiva com intenção de cura ou diminuição dos sintomas e aumento da sobrevida²⁵. A opção de tratamento padrão para os glioblastomas consiste em ressecção cirúrgica, o mais ampla possível, ou parcial, seguida de um regime combinado de radioterapia e quimioterapia adjuvante com agentes alquilantes, principalmente a temozolamida (TMZ)^{7, 15, 18, 26}. Entretanto, estas alternativas de tratamento não têm sido eficazes devido a múltiplos fatores tais como: (i) caráter infiltrativo do tumor; (ii) massa tumoral composta por células com características diversas que expressam uma variedade de marcadores; (iii) alta resistência a processos radio e quimioterápicos¹⁹.

Os quimioterápicos aprovados para os glioblastomas são limitados, além da TMZ, existe a carmustina, a lomustina e o bevacizumab. Porém, na clínica, a TMZ é o fármaco padrão utilizado para estes tumores²⁷. A TMZ é um quimioterápico alquilante de DNA de fácil penetração pela barreira hemato-encefálica, muito utilizada na prática clínica para o tratamento de gliomas, inclusive o glioblastoma^{27, 28}. Uma enzima muito comumente envolvida na resistência a esse fármaco e que repara a alquilação do DNA é a proteína O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT). O MGMT se tornou um grande biomarcador de prognóstico e sobrevida para pacientes acometidos por gliomas. A metilação do promotor do gene *MGMT* está presente em cerca de 45% dos glioblastomas, o que promove a sua expressão, levando desta forma à sensibilidade a quimioterápicos alquilantes²⁹.

1.2.3- Alterações moleculares no câncer

O processo de carcinogênese ocorre devido a múltiplas etapas e fatores, envolvendo alterações nos genes que podem originar mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos. Os principais genes envolvidos nesse processo são os proto-oncogenes, oncogenes e genes supressores tumorais (GSTs)³⁰⁻³². Os proto-oncogenes representam um conjunto de genes que codificam proteínas responsáveis por regular o crescimento celular normal e/ou o processo de diferenciação e alterações como mutações, fusões gênicas ou ampliações nestes genes, levam à sua ativação e fazem com que eles se tornem oncogenes³³. Sendo

assim, os oncogenes desempenham um papel de formação do processo de carcinogênese^{33, 34}.

Os GSTs, por sua vez inibem o controle do crescimento e proliferação celular e, quando há a perda de sua expressão devido a várias alterações (mutações, hipermetilação da região promotora e deleções) levam a um descontrole destes mecanismos, transformando células normais em neoplásicas^{35, 36}.

De acordo com Hanahan & Weinberg³⁷, seis grandes alterações na fisiologia celular são necessárias para o desenvolvimento tumoral maligno: 1) auto-suficiência em sinais de crescimento; 2) sensibilidade reduzida aos fatores que inibem o crescimento celular; 3) evasão de morte celular programada; 4) potencial replicativo ilimitado; 5) angiogênese sustentada; e 6) invasão tecidual e metástase³⁷. Além destas alterações citadas, os autores incluíram posteriormente, a capacidade de reprogramação do metabolismo energético e a evasão à resposta imune³⁸.

A Figura 1 ilustra as seis grandes alterações na fisiologia celular que podem concomitar no desenvolvimento tumoral.

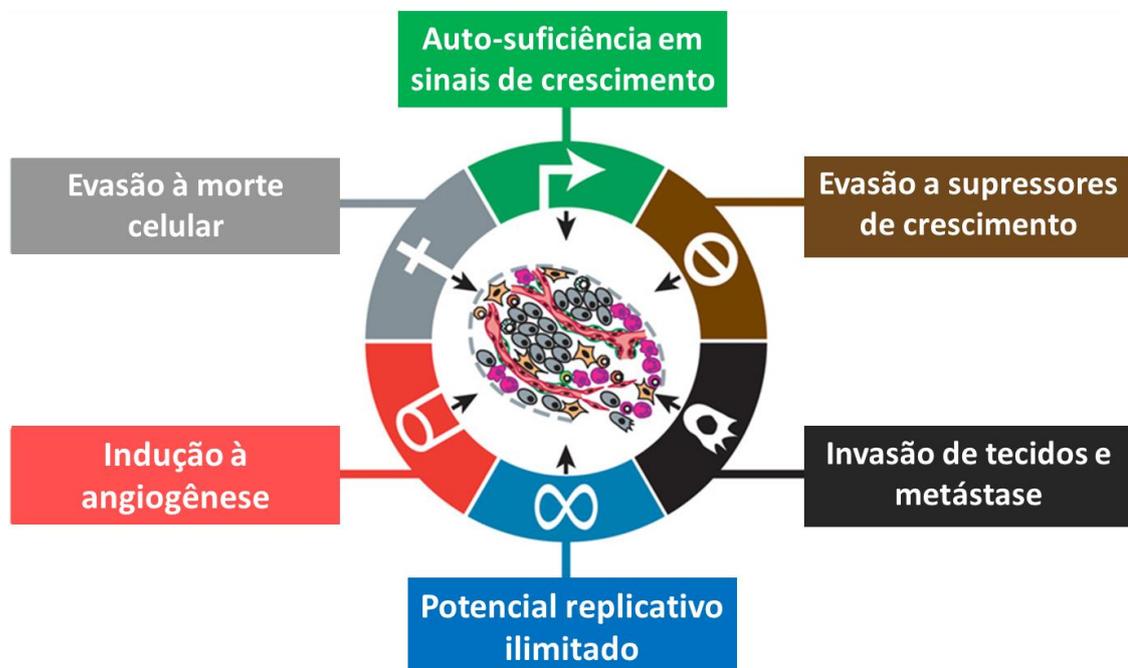


Figura 1 - As seis alterações fundamentais para o desenvolvimento tumoral. (Fonte: modificado de: Hanahan D. & Weinberg R.A., 2011³⁸).

1.2.4- Alterações moleculares em gliomas/glioblastoma

Os gliomas apresentam uma alta heterogeneidade intratumoral em sua formação^{39,40,41, 42} e diversos estudos têm surgido na tentativa de se encontrar marcadores moleculares e terapias alvo-direcionadas que auxiliem no tratamento da doença^{43, 44}. Alterações moleculares como: mutações em *IDH1* e *IDH2*, *TP53*, *BRAF*, co-deleção cromossômica em *1p19q*, deleção em *PTEN* e amplificação em *EGFR* (Receptor do fator de crescimento epidérmico) são muito encontradas nestes tumores¹⁷. As análises do material genômico têm sido cada vez mais empregadas em glioblastomas na busca de genes específicos expressos tanto em glioblastoma adulto como pediátrico²⁹. Segundo os autores Omuro & DeAngelis⁴⁴, estas análises identificaram que os glioblastomas podem ser subclassificados em quatro tipos de acordo com suas características celulares:

i) clássico: apresenta ampliações e deleções nos cromossomos 7 e 10 respectivamente, amplificação e mutações em *EGFR*, sendo as mutações de ponto e deleções VIII as mais frequentes, e deleção do locus *Ink4a/ARF*;

ii) mesenquimal: maior incidência de mutações em *NF1* (neurofibromatose 1) e aumento da expressão de *CHI3L1* e *MET*, relacionados à necrose tumoral e vias do fator nuclear kB;

iii) proneural: *PDGFRA* alterado e mutações no oncogene *IDH1* e supressor tumoral *TP53* em gliomas de baixo grau e glioblastomas do tipo secundário;

iv) neural: expressão de marcadores neuronais, perda do supressor tumoral *PTEN*, além de outras disfunções a nível molecular⁴⁴.

A Figura 2 representa os principais genes alterados nos diferentes tipos de glioma.

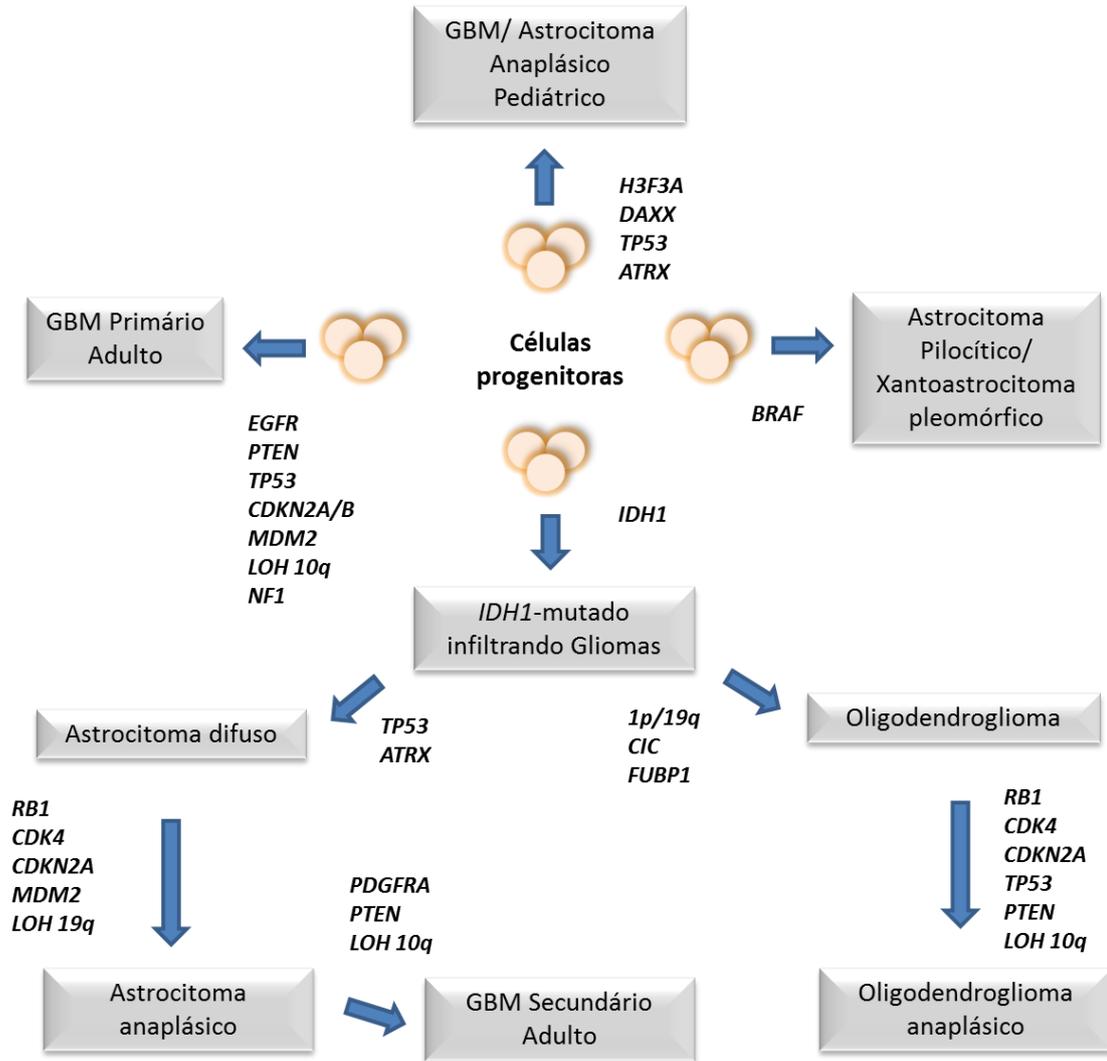


Figura 2 - Principais genes alterados em gliomas. (Fonte: modificado de Appin CL. & Brat DJ., 2014¹⁷).

Há 3 grandes grupos moleculares de mutações que caracterizam os gliomas, a presença do promotor da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*), co-deleção de 1p19q e mutação em *IDH1/2*⁴⁵. Eckel-Passow *et al.*⁴⁵ avaliaram 1087 gliomas e 11.590 controles para esses marcadores e associações entre esses grupos. As principais alterações encontradas neste estudo foram de 472 gliomas grau IV com menos de 1% triplo-positivo, 2% *TERT* e *IDH*, 7% *IDH*, 17% triplo-negativo, e de 74% somente *TERT*⁴⁵. As mutações em *TERT* foram essencialmente encontradas em gliomas de alto grau (OMS-IV) e gliomas de grau II e grau III, sendo associadas com a agressividade e baixa sobrevida⁴⁵. Além disso, mutações em ambos, *TERT* e *IDH*, tiveram também uma diminuição da sobrevida entre os grupos⁴⁵. Mutações *non-coding* em *TERT* podem ser reportadas em duas posições, G228A ou G250A, principalmente

em glioblastomas *de novo* (83%), sendo estas mutações relacionadas a alta expressão de *TERT* e atividade da telomerase⁴⁶. A telomerase é uma enzima que desempenha um papel importante na manutenção do tamanho dos telômeros e estabilidade dos cromossomos em células-tronco⁴⁶. A regulação transcricional do gene *TERT* é bastante limitada em relação à modulação da atividade da telomerase, sendo assim, o *TERT* recebe destaque como um marcador do desenvolvimento tumoral⁴⁶.

Outros estudos têm mostrado que gliomas com mutações em *IDH1/2* e co-deleção de 1p19q possuem uma maior mediana de sobrevida em relação a pacientes com mutações em *IDH* somente e sem a co-deleção de 1p19q⁴⁷.

1.3- Produtos naturais como alternativa terapêutica

Avanços durante o século XX permitiram diversas pesquisas com produtos naturais, envolvendo principalmente plantas e microrganismos na área oncológica, proporcionando assim, inúmeros achados com substâncias hoje utilizadas para o tratamento de neoplasias⁴⁸. Nas últimas décadas, a maior parte (60%) dos fármacos antineoplásicos inseridos como tratamento oncológico foram advindos de produtos naturais⁴⁸. Os quimioterápicos etoposídeo, vincristina, vimblastina, tenoposídeo e taxol foram introduzidos ao longo dos últimos vinte anos no tratamento do câncer, reforçando o interesse das indústrias farmacêuticas em produtos de origem natural⁴⁹. Estes medicamentos movimentam anualmente um mercado de cerca de 50 bilhões de dólares⁵⁰.

A etnobotânica permite a identificação de novas moléculas bioativas de diversas plantas. Nesta abordagem, a informação obtida a partir de comunidades tradicionais sobre o uso de plantas medicinais é combinado com os estudos químicos/farmacológicos realizados em laboratórios⁵¹. Apesar de o Brasil possuir uma flora invejável para o resto do mundo em termos de matéria-prima para a produção de fitofármacos, apenas cerca de 8% foi estudada⁵². Vale ressaltar também que no Brasil, embora existam pesquisas que lidam com a identificação e caracterização de biomoléculas com potencial terapêutico, nenhuma dessas moléculas, embora promissoras, passou ainda para a etapa clínica⁵². Enquanto isso, os quimioterápicos antineoplásicos consomem uma significativa parcela dos recursos destinados ao Sistema Único de Saúde (SUS)^{48,53, 54}.

Atualmente, acredita-se que menos de 2% das plantas superiores foram investigadas para a detecção de componentes com efeitos antineoplásicos e, mesmo assim, investigando somente a ação citotóxica^{53, 54}. As estratégias para encontrar novos fármacos têm sido alteradas com o passar dos anos⁵⁵. No começo dos anos 80, os programas de prospecção no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos iniciaram e, no momento, englobam uma etapa inicial de testes *in vitro* através de linhagens tumorais humanas utilizando-se de técnicas automatizadas (*High Throughput Screening* - HTS), as quais possuem resultados com inúmeras moléculas promissoras⁵⁶. As tecnologias desenvolvidas como resultado direto deste programa têm sido os pilares de muitos programas de rastreamento de fármacos anti-tumorais hoje e provavelmente continuará assim no futuro. Hoje, esta abordagem foi expandida e sugere que, além de um amplo leque de linhagens tumorais, se inclua linhagens derivadas de distintas populações e subtipos histológicos de forma a ter uma representação mais fidedigna dos tumores⁵⁶.

De Melo *et al.*⁵⁶ compilaram informações de artigos publicados entre 1980 e 2008 e descreveram um total de 84 espécies de plantas reportadas para o uso na prevenção ou tratamento do câncer no Brasil; 69,05% destas foram citadas como sendo usadas para o tratamento do câncer em geral e 30,95% para tumores específicos. As plantas citadas com maior frequência foram *Aloe vera*, *Euphorbia tirucalli* e *Tabebuia impetiginosa*. Pelo menos um estudo farmacológico, *in vivo* ou *in vitro*, foi encontrado para 35,71% das espécies⁵⁶. Além disso, os autores mostraram que plantas das famílias *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Apocynaceae* e *Asteraceae* recebem destaque e são de grande importância em estudos de etnofarmacologia destinados a ensaios experimentais⁵⁶.

Um *screening* realizado com extratos de diversas plantas Brasileiras mostrou potente atividade citotóxica em linhagens tumorais com as famílias das *Anacardiaceae*, *Annonaceae*, *Apocynaceae*, *Clusiaceae*, *Flacourtiaceae*, *Sapindaceae*, *Sapotaceae*, *Simaroubaceae* e *Zingiberaceae*. O contrário ocorreu para as famílias das *Alismataceae*, *Asteraceae*, *Bignoniaceae*, *Burseraceae*, *Magnoliaceae*, *Malpighiaceae*, *Meliaceae*, *Mimosaceae*, *Monimiaceae*, *Rubiaceae*, *Solanaceae* e *Vochysiaceae*, sem efeitos citotóxicos expressivos⁵⁷.

Segundo de Mesquista *et al.*⁵⁷ diversos compostos de espécies de plantas Brasileiras do cerrado têm sido estudados com resultados promissores. Em seu estudo, 28 de 412

extratos testados demonstraram um efeito antiproliferativo substancial, com pelo menos 85% de inibição da proliferação celular em uma ou mais linhagens celulares, tendo sido utilizados extratos obtidos a partir de diferentes partes de *Anacardiaceae*, *Annonaceae*, *Apocynaceae*, *Clusiaceae*, *Flacourtiaceae*, *Sapindaceae*, *Sapotaceae*, *Simaroubaceae* e *Zingiberaceae*. Além do mais, 50 dos 412 compostos testados são usados na medicina tradicional e 21 famílias apresentam efeito antineoplásico em linhagens celulares tumorais *in vitro*⁵⁷.

Portanto, uma maior investigação da atividade citotóxica destes extratos derivados de plantas do segundo maior bioma brasileiro (cerrado) se faz necessária, avaliando desta forma os mecanismos biológicos de ação destes extratos em linhagens tumorais.

1.3.1- Família *Melastomataceae*

O uso popular de plantas Brasileiras, em especial as espécies do cerrado brasileiro tem sido descrito para o tratamento de inúmeras doenças, tais como doenças inflamatórias, microbiais, parasitárias e até mesmo neoplasias malignas^{57, 58}. Porém, pouco se sabe sobre o efeito dos extratos isolados destas plantas⁵⁸. As *Melastomataceae* fazem parte de uma família que compõem aproximadamente 68 gêneros e 1.326 espécies de plantas espalhadas pelo território brasileiro. Elas correspondem a sexta maior família das angiospermas, possuem origem Brasileira e habitam regiões tropicais e subtropicais, sendo sua maior incidência no Sul da América^{59, 60}. Entre os gêneros mais numerosos, as *Miconias* incluem mais de 1000 espécies de plantas da família *Melastomataceae* e muitos extratos destas plantas têm sido utilizados no tratamento de diferentes patologias, inclusive o câncer^{59, 61}. Estudos realizados têm mostrado a presença de triterpenos, cumarinas, benzoquinonas, flavonóides e taninos em *Miconias*, principalmente na *Miconia albicans* (Sw.) Triana^{61, 62}. A *Miconia albicans* (Sw.) Triana é uma das *Miconias* utilizadas no presente trabalho (Figura 3), pode atingir até 3 metros de altura e sua ocorrência se dá no cerrado brasileiro. A planta é conhecida popularmente na Bahia como “canela de velho” ou “quaresmeira-de-flor-branca” devido às suas ações anti-inflamatória e analgésica. Em estudos *in vivo* realizados previamente por Vasconcelos *et al.*⁶² demonstraram-se os efeitos analgésicos obtidos a partir das partições (hexânica, cloreto de metileno e hidroalcoólica) presentes nas folhas desta planta. Para elucidar o efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato, os autores

avaliaram os principais componentes presentes na partição cloreto de metileno, o ácido ursólico e ácido oleanóico, e notaram que quando há a mistura de ambos os compostos, a atividade é baixa, sugerindo novos estudos para a investigação destas moléculas⁶².

Outro estudo *in vivo* realizado por Serpeloni *et al.*⁶³, avaliaram os efeitos genotóxicos e mutagênicos da *Miconia albicans* (Sw.) Triana e outras três espécies de *Miconia*, sendo observado que o uso de extratos brutos foi mais eficaz e quimiopreventivo quando comparados aos compostos já isolados. Serpeloni *et al.*⁶³ verificaram ainda que quando a ciclofosfamida (um agente alquilante que atua na proliferação celular) era associada aos diferentes extratos das *Miconias*, estes exibiam um efeito protetor contra ciclofosfamida. Apesar das citações sobre o possível envolvimento de espécies destas plantas como terapêutica para o câncer, não foram encontrados estudos na literatura que demonstrassem o papel antineoplásico das plantas alvo deste estudo (*Miconia albicans* (Sw.) Triana, *Miconia chamissois* Naudin e *Miconia cuspidata* Naudin) (Figura 3). Além disso, não existem evidências sobre o uso destas espécies de *Miconias* em gliomas, por isso surge a necessidade de se descobrir o potencial citotóxico destas plantas e avaliar os mecanismos de ação de seus extratos neste tipo tumoral.



Figura 3 - Espécies da família *Melastomataceae* utilizadas no presente estudo: *Miconia albicans* (Sw.) Triana, *Miconia chamissois* Naudin e *Miconia cuspidata* Naudin. (Fonte: modificado de Rezende, AR., 2012⁶⁴ e Kuhlmann, M., 2012⁶⁵).

1.3.2- Família *Euphorbiaceae* e derivados

As plantas da família *Euphorbiaceae* são responsáveis pela produção de diversos diterpenóides e em sua maioria estes estão associados a atividades farmacológicas. Dentre

os diterpenos encontra-se o ingenol mebutato (ingenol-3-angelato) utilizado para o tratamento de lesões de pele, como a queratose actínica e verrugas, e em estudos pré-clínicos para o tratamento de melanoma⁶⁶.

O PEP005 como é denominado, trata-se de um éster diterpeno ingenol-3-angelato, composto sintético derivado de uma planta conhecida cientificamente como *Euphorbia peplus* (Figura 4). O composto sintético que recebeu o nome de Picato[®] teve a aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 2012 para o uso tópico no tratamento de lesões de pele conhecidas como queratose actínica⁶⁷.

Este composto tem revelado um grande potencial antineoplásico modulando a atividade de proteínas quinases C (PKCs), uma classe de mais de dez isoformas da família das serina/treonina quinases que são distintas quanto à sua estrutura, domínio e substrato. As izoenzimas (PKCs) são subclassificadas em três grandes grupos de acordo com a interação com o cofator cálcio (Ca^{2+}) ou diacilglicerol: (i) clássicas ou convencionais: compostas pelas PKCs α , β I, β II e γ , que são ativadas pelo Ca^{2+} e diacilglicerol; (ii) PKCs novas δ , ϵ , η e θ dependentes do diacilglicerol para a ativação e independentes do Ca^{2+} e (iii) PKCs atípicas λ , μ e ζ que independem dos dois cofatores. Há uma outra grande classe, também importante e que independe de cálcio e diacilglicerol, que incluem as isoformas PKD/PKC μ , dependentes de um pseudosubstrato como cofator^{68,69}.

As isoformas PKCs estão relacionadas a diferentes funções celulares, dentre elas proliferação, diferenciação, apoptose, invasão, senescência, angiogênese tumoral, resistência a fármacos. Embora algumas PKCs tenham funções específicas, como por exemplo, regular a sobrevivência celular (PKC δ), deve existir um equilíbrio entre as isoformas. Algumas PKCs, como as PKC α e PKC β , desempenham um papel anti-apoptótico e a supressão destas acaba por induzir a apoptose quando estas proteínas estão associadas com a superexpressão da PKC δ (pró-apoptótica). Porém, a superexpressão independente da PKC δ não é capaz de induzir a apoptose. Estudos relatam que o PEP005 modula estas 3 PKCs (PKC α , PKC β e PKC δ) atuando como fator anti-proliferativo e pró-apoptótico^{68,70,71}.

De acordo com Serova *et al.*⁶⁸, estudos *in vitro* com linhagens tumorais de cólon tratadas com o PEP005 resultaram na ativação da PKC δ e redução da expressão da PKC α levando as células à apoptose. Além disso, os autores mencionam que o PEP005 induziu a diminuição de células na fase S do ciclo celular de maneira dose-e-tempo dependente.

Mascia *et al.*⁷¹ apontam ainda que outra potencial forma terapêutica do PEP005 é a inibição da PKC β , a qual atua diretamente no bloqueio da pigmentação da pele, se tornando uma grande área de interesse para os dermatologistas.

Estudos *in vivo* de Hampson *et al.*⁷² mostram que o PEP005 induziu apoptose em 78% das 33 linhagens celulares e células de blastos de pacientes com leucemia mielóide aguda utilizadas. Consideravelmente, o composto ainda reduziu a massa tumoral em diferentes modelos de camundongo testados, mostrando-se uma terapia potencial para o tratamento de leucemia. Em um estudo anterior, os autores mostraram que as linhagens de leucemia que eram responsivas ao PEP005 necessitavam da ativação e expressão da PKC δ ⁷³. Por isso, Hampson *et al.*⁷³ avaliaram também a expressão da proteína PKC δ através de *western-blot*, comparando as linhagens celulares dos pacientes responsivos ao tratamento com o PEP005 e as linhagens dos pacientes não-responsivos, e verificaram que houve ativação da PKC δ em ambos os grupos, porém devido à ativação de ambos, não foi possível diferenciar pacientes responsivos de não responsivos, como se esperava.

Em gliomas, as PKCs desempenham um importante papel na proliferação e apoptose. Além disso, a modulação destas proteínas tem se mostrado um importante preditor da doença⁷⁴. Estudos evidenciam ainda, que os gliomas malignos expressam maiores níveis de ativação de PKC α e menores de PKC δ quando comparados aos astrocitomas de baixo grau⁷⁴. Desta forma, a busca de novos compostos que modulem as diferentes isoformas das PKCs, como o composto PEP005, torna-se um campo promissor para novas pesquisas direcionadas ao tratamento de gliomas.



Euphorbia peplus

Figura 4 - Espécie da família *Euphorbiaceae*: *Euphorbia peplus*. (Fonte: modificado de http://www.aphotoflora.com/d_euphorbia_peplus_petty_spurge.html). Disponível em: 23/07/2015.

1.4- Abordagens utilizadas para a descoberta de compostos naturais

Cerca de 80% da população mundial faz uso de produtos fitoterápicos para o tratamento de doenças⁷⁵. Pesquisas têm demonstrado um vasto número de fármacos obtidos através de produtos naturais e seus compostos secundários⁷⁵⁻⁷⁸. Devido a este fato, estudos de rastreamento de plantas e compostos bioativos têm sido utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos^{78,79}.

Os métodos empregados para a descoberta destes compostos ativos dependem dos objetivos a serem estudados posteriormente^{79, 80}. Porém, a técnica mais utilizada no rastreamento de compostos, os quais não são conhecidas suas propriedades ainda, tem sido o fracionamento guiado por bioensaio⁷⁹. Após o isolamento da substância pura, técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia de massa são empregadas na tentativa de se descobrir a molécula isolada⁷⁹.

Um dos primeiros passos para se estudar plantas é saber que estas podem sofrer influência pela idade, modo de coleta e condições climáticas do ambiente, por isso cuidados devem ser tomados para a re-coleta das espécies evitando-se a alteração de seus metabólitos⁷⁹.

Há diversos métodos de extração de compostos das plantas, um deles é através de adição de solventes líquidos, sendo este método conhecido como extração de solvente sólido-líquido⁷⁹. Além deste, há o processo de maceração que é bastante simples, e envolve manter a planta imersa em solvente adequado à temperatura ambiente, podendo estar sob

agitação mecânica⁷⁹. A percolação é similar ao processo de maceração, mas não envolve solventes quentes. Já a destilação a vapor utiliza um equipamento que destila óleos voláteis imiscíveis com água.

Quando a polaridade e a solubilidade dos compostos já são conhecidas, a extração é realizada através de uma sequência de solventes⁷⁹. Os solventes são adicionados e os diferentes compostos são retirados de acordo com a polaridade (baixa, média ou alta)⁷⁹. O extrato bruto pode ser fracionado através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), seguida de bioensaios para a extração das frações ativas^{79,81}.

A Figura 5 mostra de maneira esquemática, o isolamento de compostos ativos guiado por bioensaio.

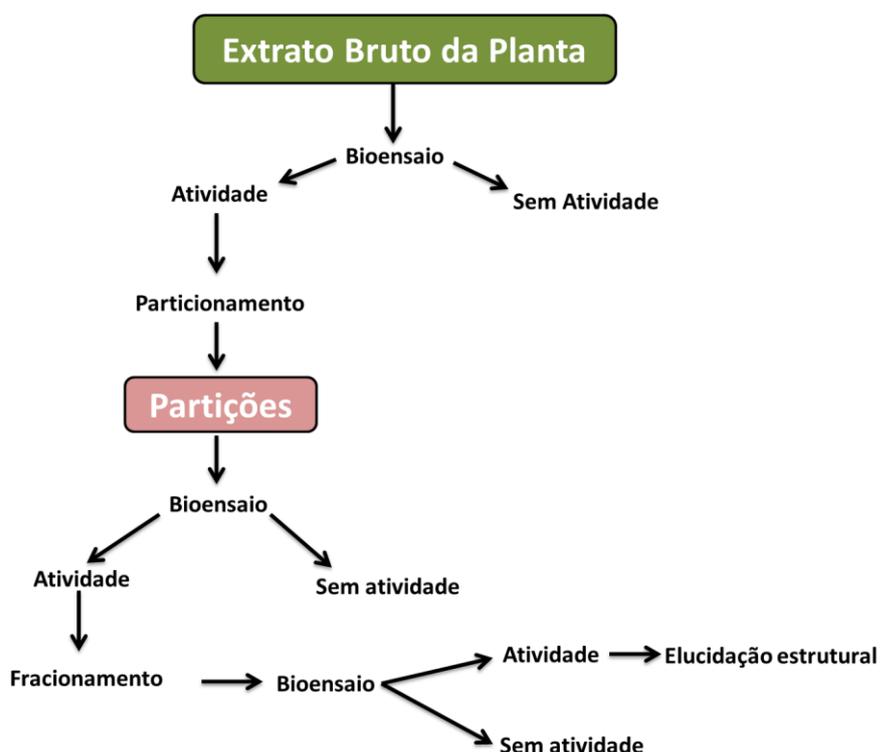


Figura 5 - Fluxograma do isolamento de compostos secundários ativos guiados por bioensaio. (Fonte: modificado de Sharma & Gupta, 2015⁷⁹).

2- JUSTIFICATIVA

Os gliomas apresentam elevada taxa de mortalidade e são caracterizados pela presença de heterogeneidade intratumoral e resistência inata às opções terapêuticas atuais, sendo a terapia padrão essencialmente paliativa. Dessa forma, a busca por novas terapias alternativas que auxiliem no tratamento destes tumores se faz necessária. Uma vez que a utilização de agentes antineoplásicos de origem natural tem revelado uma grande eficácia e oferece um amplo campo para investigação científica, este trabalho justifica-se pela busca de terapias alternativas com origem na biodiversidade brasileira para o tratamento de gliomas, utilizando um amplo painel de linhagens que recapitem as relações genótipo-resposta.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Caracterizar o efeito antineoplásico *in vitro* de extratos naturais e do composto PEP005 em linhagens celulares de glioma humano.

3.2- Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade (IC_{50}) dos extratos naturais e do composto PEP005 em linhagens de glioma humano;

- Avaliar os efeitos biológicos dos extratos naturais selecionados e do composto PEP005 na morte, migração e invasão celular em linhagens de glioma humano;

- Caracterizar as principais vias de sinalização envolvidas nos efeitos dos extratos naturais selecionados e do composto PEP005.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Linhagens celulares estabelecidas

Neste trabalho foi utilizado um painel de 12 linhagens tumorais estabelecidas de glioma (6 adultos e 5 pediátricas), além de 1 linhagem de astrócito normal comercial (NHA-ATCC (LGC Promochem Middlesex, UK)) disponíveis no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos. Estas linhagens foram obtidas comercialmente a partir da coleção de culturas celulares Européia (*European Collection of Cell Cultures-ECACC*, Salisbury, United Kingdom) e colaborações do Centro de Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (Tabela 2). De uma forma geral, as células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium-Sigma*) suplementado com 10% SBF (soro bovino fetal - *Fetal Bovine Serum-Sigma*) e 1% de P/S (Penicilin/Streptomycin - Life Technologies) em frascos de cultura de 25 ou 75cm², de polietileno ou em placas de cultura, na densidade média de 1x10⁶/mL, à 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingirem confluência. Após confluência, as células foram tripsinizadas (solução tripsina 0,05%/EDTA 0,53 mM - *Triple Express*, Life Technologies), plaqueadas e mantidas nas condições acima descritas para os estudos de resposta terapêutica e caracterização biológica. A autenticação das linhagens foi realizada pelo laboratório de Diagnóstico no Hospital Câncer de Barretos (São Paulo, Brasil). A análise foi realizada pelo perfil de *short tandem repeat* (STR) do DNA. A identidade de todas as linhagens foi confirmada por genotipagem⁸².

Tabela 2- Painel de linhagens celulares estabelecidas de glioma e astrócito normal humano.

Linhagens celulares	Tipo histológico	Grau (OMS)	Descrição	Sexo	Idade	Principais mutações	Obtenção das linhagens
NHA	Astrócito Normal	-	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido	-	Bax, D.A. <i>et al.</i> 2009 ⁸³
GAMG	Glioblastoma	IV	Adulto	Feminino	42	<i>TP53 e TERT</i>	DSMZ ⁸²
U251-MG	Glioblastoma	IV	Adulto			<i>CDKN2A/B, EGFR, TP53, PTEN e TERT</i>	Costa B.M. <i>et al.</i> 2010 ⁸⁴
SW1088	Astrocitoma anaplásico	III	Adulto	Masculino	72	<i>CDKN2A/B, KLHL9, Interferon αII, FNa8, BRAF, PTEN, TP53 e TERT</i>	ATCC ⁸²
U87-MG	Glioblastoma	IV	Adulto	Masculino	44	<i>CDKN2A/B, PTEN e TERT</i>	ATCC ⁸²
A172	Glioblastoma	IV	Adulto	Masculino	53	<i>CDKN2A e PTEN</i>	ECACC ⁸²
T-98G	Glioblastoma	IV	Adulto	Masculino	61	<i>CDKN2C e PTEN</i>	ECACC ⁸²
SW1783	Astrocitoma anaplásico	III	Adulto	Masculino	68	<i>PDGFRA e TERT</i>	ATCC ⁸²
RES186	Astrocitoma Pilocítico	I	Pediátrico	Feminino	3	<i>TERT</i>	Bax, D.A. <i>et al.</i> 2009 ⁸³

(Continua na próxima página...)

Tabela 2 (continuação)- Painel de linhagens celulares estabelecidas de glioma e astrócito normal humano.

Linhagens celulares	Tipo histológico	Grau (OMS)	Descrição	Sexo	Idade	Principais mutações	Obtenção das linhagens
SF188	Glioblastoma	IV	Pediátrico	Masculino	8	-	Bax, D.A. <i>et al.</i> 2009 ⁸³
RES259	Astrocitoma difuso	II	Pediátrico	Feminino	4	<i>TERT</i>	Bax, D.A. <i>et al.</i> 2009 ⁸³
KNS42	Glioblastoma	IV	Pediátrico	Masculino	16	<i>TP53, RB1, H3F3A e TERT</i>	Bax, D.A. <i>et al.</i> 2009 ⁸³
UW479	Astrocitoma anaplásico	III	Pediátrico	Feminino	13	-	Bax, D.A. <i>et al.</i> 2009 ⁸³

*ATCC-Coleção de Tipos de Cultura Americana, DSMZ-Coleção Alemã de Microrganismos e Cultura Celular e ECACC- Coleção Europeia de Culturas Celulares Autenticadas.

4.2- Linhagem tumoral de cultura primária estabelecida

Neste estudo utilizou-se também, uma linhagem denominada HCB151, obtida a partir de um tecido tumoral remanescente de um paciente do Hospital de Câncer de Barretos, sexo masculino, 65 anos de idade e com diagnóstico de glioblastoma, a qual foi estabelecida previamente, como descrito pelo grupo⁸⁵. As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium-Sigma*) suplementado com 10% SBF (soro bovino fetal - *Fetal Bovine Serum-Sigma*) e 1% de P/S (Penicilin/Streptomycin - Life Technologies) em frascos de cultura de 25 ou 75cm², de polietileno ou em placas de cultura, na densidade média de 1x10⁶/mL, à 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingirem confluência. Após confluência, as células foram tripsinizadas (solução tripsina 0,05%/EDTA 0,53 mM - *Triple Express*, Life Technologies), plaqueadas e mantidas nas condições acima descritas para os estudos de resposta terapêutica e caracterização biológica. O perfil mutacional da linhagem apresentou alterações apenas em *TP53*. A identificação da cultura primária e a confirmação adicional de que a mesma e o tecido normal congelado eram provenientes do mesmo paciente foi também realizada por análise de perfil STR⁸⁵.

4.3- Obtenção dos compostos

4.3.1- Extratos

Para este trabalho foram disponibilizados 13 extratos brutos derivados de plantas da flora Brasileira adquiridos através de uma parceria com a professora Dra. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro da Universidade Federal de São-João-del-Rei, Campus Centro-Oeste Dona Lindu-MG. Estes extratos foram coletados no Parque do Sabiá localizado em Uberlândia-MG, Latitude: -18°54'24.53" e Longitude: -48°13'53.79", e encontram-se depositados em Herbário Fiel Depositário da Universidade Federal de Uberlândia. Os extratos (17, 18 e 19) selecionados para uma avaliação mais ampla neste trabalho, também encontram-se disponíveis no Herbário Fiel Depositário da Universidade Federal de Uberlândia sob o número de depósito: HUFU 56558, HUFU 44998 e HUFU 59592, respectivamente. A Tabela 3 evidencia o nome popular, a espécie e a família dos extratos das plantas que foram avaliados neste projeto. Os extratos brutos foram obtidos a partir das folhas de suas respectivas plantas.

Tabela 3- Classificação de extratos naturais originários da flora Brasileira.

Identificação dos Extratos	Nome Popular	Nome Científico	Família
1	Pau pombo	<i>Tapirira guianensis</i>	<i>Fabaceae</i>
2	Gonçalo-Alves	<i>Astronium fraxinifolium</i>	<i>Anacardiaceae</i>
3	Pimenta-de-Macaco	<i>Xylopia aromática</i>	<i>Annonaceae</i>
7	Araticum	<i>Annona crassiflora</i>	<i>Annonaceae</i>
8	Negramina	<i>Siparuna guianensis</i>	<i>Siparunaceae</i>
10	-	<i>Acacia alata</i>	<i>Fabaceae</i>
14-I	Pata-de-vaca	<i>Bauhinia variegata</i>	<i>Fabaceae</i>
15-I	Pata-de-vaca branca	<i>Bauhinia variegata cândida</i>	<i>Fabaceae</i>
16-I	Pata-de-viado	<i>Bauhinia unguolata</i>	<i>Fabaceae</i>
17	Pixirica-da-mata	<i>Miconia cuspidata</i>	<i>Melastomataceae</i>
18	Canela de velho	<i>Miconia albicans</i>	<i>Melastomataceae</i>
19	Pixirica-açu	<i>Miconia chamissois</i>	<i>Melastomataceae</i>
21-I	Barbatimão	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	<i>Fabaceae</i>

4.3.2- Particionamento do extrato 19 e sua caracterização por RMN

O extrato 19, cujos resultados do *screening* inicial deste trabalho evidenciaram um potencial antineoplásico foi selecionado e particionado pela equipe da Prof^a. Dr^a. Rosy I. M. A. Ribeiro para obtenção de componentes mais puros. Desta forma foram obtidas as seguintes partições deste extrato: A (hidroalcolica), B (hexânica), C (clorofórmica) e D (aceto-etílica). Logo após, o extrato bruto assim como as partições foram avaliadas em estudo qualitativo isto é, quanto à presença ou ausência das principais classes de compostos secundários existentes. Na Tabela 4, evidenciamos as classes de compostos secundários majoritários obtidas através do estudo fitoquímico desenvolvido pela equipe da Dr^a. Rosy I. M. A. Ribeiro.

Tabela 4- Compostos secundários majoritários presentes no extrato 19 e partições de plantas do gênero *Miconia* obtidos através de estudo fitoquímico.

Extrato/ Partições	Classe de Compostos Secundários					
	Esteróides/ Triterpenóides	Flavonóides	Saponinas	Taninos	Alcalóides	Cumarinas
19 EB	+	+	+	+	+	+
19 A	-	+	+	+	-	+
19 B	+	+	-	+	+	-
19 C	-	+	+	+	+	+
19 D	-	+	-	+	-	+

(19) *Miconia chamissois*; **(EB)** Extrato Bruto **(A)** Partição hidroalcolica; **(B)** Partição hexânica; **(C)** Partição clorofórmica; **(D)** Partição aceto- etílica; **(+)** presente; **(-)** ausente.

As partições e o extrato 19 foram avaliados ainda, através de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) pelo Prof. Dr. Wanderson Romão e sua equipe de alunos (Fernanda Endringer Pinto e Bruno Gomes de Oliveira) do Laboratório de Petroleômica e Química Forense da Universidade Federal do Espírito Santo, em parceria estabelecida com a Prof^a. Dr^a. Rosy I. M. A. Ribeiro. Os espectros obtidos por RMN com as principais moléculas encontradas tanto nas partições (B, C e D) quanto no extrato 19 e confirmadas por similaridade em banco de dados, podem ser observados nos Anexos B, C, D e E do presente estudo.

4.3.3- Composto sintético

Para este trabalho foi também adquirido um composto sintético denominado, ingenol-3-angelato ou PEP005^{69, 70}, derivado da planta *Euphorbia peplus*, obtido comercialmente pela empresa AdipoGen. A estrutura química do composto sintético PEP005 é evidenciada na Figura 6.

correspondendo a 100% de sobrevivência. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e experimentais e, as análises de viabilidade celular foram calculadas através do programa GraphPad PRISM versão 5.

4.5- Determinação da IC₅₀

A determinação da IC₅₀ (concentração inibitória de 50% das células) foi realizada por análise de regressão não-linear através do *software* GraphPad PRISM versão 5 a partir dos resultados de viabilidade obtidos no item 4.4. O NCI (Instituto Nacional do Câncer Americano) determina que extratos brutos promissores para estudos de purificação subsequentes e ensaios de citotoxicidade possuam valores de IC₅₀ <30µg/mL e para os estudos de citotoxicidade deste trabalho adotou-se este mesmo critério previamente estabelecido⁸⁶.

4.6- Curvas de diluição

4.6.1- Curva de diluição dos extratos naturais e suas partições

Para a análise de citotoxicidade e determinação dos valores de IC₅₀ nas linhagens celulares de glioma com os extratos brutos foram utilizadas 7 concentrações iniciais dos extratos naturais, em DMSO, variando de 1,5 µg/mL a 300 µg/mL e o veículo DMSO, o qual não ultrapassou 1% de concentração final no poço para o tratamento (regra 1% DMSO), sendo: 12, 25, 50, 100, 200 e 300 µg/mL para os extratos 1, 2, 3 e 7; 3, 5, 10, 50, 100, 200 e 300 µg/mL para os extratos 10, 14-I, 15-I, 16-I e 21-I; 1,5, 3, 5, 10, 50, 100 e 200 µg/mL para os extratos 8, 17, 18 e 19. As doses utilizadas para a determinação dos valores de IC₅₀ foram obtidas a partir de critérios estabelecidos pelo NCI (Instituto Nacional do Câncer Americano). A curva de diluição inicialmente utilizada foi escalonada a partir de 0,15 µg/mL devido à sensibilidade de algumas linhagens. Para o preparo das soluções de trabalho que variaram de 0,15 µg/mL a 1,5 µg/mL utilizou-se o estoque 2 de 5 mg/mL (diluição 1:10 do estoque 1 em DMSO). Porém, para o preparo das soluções de trabalho que variaram de 3µg/mL a 300µg/mL utilizou-se o estoque 1 (50 mg/mL). Para a análise de citotoxicidade e determinação dos valores de IC₅₀ nas linhagens celulares de glioma com as partições do extrato 19 foram utilizadas 6 concentrações iniciais de 1,5 µg/mL a 100 µg/mL (1,5, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e o veículo DMSO (regra 1%). O extrato 19 foi utilizado como controle

interno dos experimentos em relação às partições durante a avaliação de citotoxicidade celular.

4.6.2- Curva de diluição do composto sintético e do quimioterápico (TMZ)

Para a análise de citotoxicidade e determinação dos valores de IC_{50} nas linhagens de glioma com o composto PEP005 foram utilizadas 7 concentrações iniciais e o veículo DMSO, o qual não ultrapassou 1% de concentração final no poço para o tratamento (regra 1% DMSO), cujas diluições variaram conforme a resposta das linhagens durante os ensaios, sensibilidade ou resistência ao fármaco. O estoque 1 (11,6 mM) foi diluído 1000 X para a obtenção do estoque 2 (11,6 μ M) e preparo das soluções de trabalho da curva 1 do PEP005, sendo 7 concentrações utilizadas para a curva (0,001, 0,002, 0,0043, 0,0086, 0,021, 0,032 e 0,043 μ g/mL) e o veículo DMSO (regra 1%). O estoque 2 (11,6 mM) foi obtido diretamente da solução estoque 1 (11,6 mM) para o preparo das soluções de trabalho da curva 2 do PEP005. As 7 concentrações utilizadas para a curva foram (1,08, 2,15, 4,31, 8,62, 21,55, 32,32 e 43,10 μ g/mL) e o veículo DMSO (regra 1%). Para a curva 3 do PEP005, utilizou-se uma curva gerada a partir da curva 1 e 2 que variou de (0,002, 0,043, 0,21, 0,43, 2,15, 4,31 e 8,62 μ g/mL) e o veículo DMSO (regra 1%). Para a análise de citotoxicidade e determinação dos valores de IC_{50} do quimioterápico TMZ nas linhagens celulares de glioma foram utilizadas 7 concentrações iniciais de 1,21 a 48,54 μ g/mL (1,21, 2,43, 4,85, 9,70, 24,27, 36,40, 48,54 μ g/mL) e o veículo DMSO (regra 1%). Para o preparo da curva de trabalho utilizou-se a solução estoque (103 mM).

4.7-Determinação do índice de seletividade

Os extratos brutos, partições, composto sintético PEP005 e o quimioterápico TMZ foram avaliados através do índice de seletividade (IS) que pode ser obtido pela divisão do valor de IC_{50} de uma linhagem celular não tumoral por uma linhagem tumoral. Esta análise permite identificar a seletividade dos compostos testados e o potencial uso destes em estudos clínicos. Neste estudo, o IS foi obtido a partir da seguinte fórmula: IC_{50} da linhagem não tumoral (NHA) / IC_{50} das linhagens tumorais. Para esta análise adotou-se como significativo, um valor de IS maior ou igual a 2,0, bem como descrito previamente pelo NCI (Instituto Nacional do Câncer Americano)⁸⁶.

4.8- Caracterização das principais vias sinalizadoras ativadas/inibidas pelos extratos e compostos sintéticos

4.8.1- Ensaio de *western blot*

Para a análise das vias de sinalização, as linhagens celulares foram cultivadas em placas de 6 poços e posteriormente, tratadas por 24 horas com os respectivos valores de IC₅₀ para os extratos 17, 18 e 19, partições B e C (extrato 19) e composto sintético (PEP005). Para a avaliação da modulação das proteínas kinase C (PKCs), as linhagens foram tratadas com o PEP005 (30 minutos, 1 hora e 24 horas) e com o composto PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) (30 minutos e 1 hora)^{70, 87}. Em seguida, as células foram homogeneizadas em tampão contendo 50mM Tris pH 7.6–8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 10mM NaF, 10mM NaPirofosfato, 1% NP-40, suplementadas com um coquetel de inibidores de protease (1mM DTT, 1µg/mL leupeptina hemissulfato, 1µg/mL aprotinina, 1mM PSMF, 1mM EDTA) por 1 hora, seguido por centrifugação a 13.000g à 4°C por 15 minutos. A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o reagente Bradford (Bio-Rad), de acordo com instruções do fabricante. Logo após, 20ug do extrato total de proteínas de cada amostra foi separado por SDS-PAGE 10% e transferido para membranas de nitrocelulose (Hybond-C™ Extra, Amersham Biosciences). As membranas foram então bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBST e incubadas com os anticorpos primários para proteínas totais e fosforiladas. Os anticorpos primários utilizados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5- Relação de anticorpos primários utilizados nos ensaios de *western blot*.

Anticorpo Primário	Isotipo	Clone	Fabricante
anti-PARP clivada (Asp214)	<i>Rabbit mAb</i>	(D64E10)	<i>Cell signalling</i>
anti-caspase 3 clivada (Asp175)	<i>Rabbit mAb</i>	(5A1E)	<i>Cell signalling</i>
anti-p44/42 MAPK (ERK1/2)	<i>Rabbit mAb</i>	(137F5)	<i>Cell signalling</i>
anti-AKT (Thr308)	<i>Rabbit mAb</i>	(C31E5)	<i>Cell signalling</i>
anti-p-H2AX histona (Ser139)	<i>Rabbit mAb</i>	(20E3)	<i>Cell signalling</i>
anti-p21 Waf1/Cip1	<i>Rabbit mAb</i>	(12D1)	<i>Cell signalling</i>
anti-p27 kip1	<i>Rabbit mAb</i>	(D69C12)	<i>Cell signalling</i>
anti-p-PKC α / β II	<i>Rabbit mAb</i>	(Thr638/641)	<i>Cell signalling</i>
anti-p-PKC δ	<i>Rabbit mAb</i>	(Thr505)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC α #2056	<i>Rabbit mAb</i>	-	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC δ	<i>Rabbit mAb</i>	(D10E2)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC δ / θ	<i>Rabbit mAb</i>	(Ser643/676)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC θ	<i>Rabbit mAb</i>	(Thr538)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC ζ	<i>Rabbit mAb</i>	(C24E6)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC ζ / λ	<i>Rabbit mAb</i>	(Thr410/403)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC δ	<i>Rabbit mAb</i>	(D10E2)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC ξ	<i>Rabbit mAb</i>	(22B10)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKC Pan	<i>Rabbit mAb</i>	(β II Ser660)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKD/PKC μ (Ser916)	<i>Rabbit mAb</i>	(Ser916)	<i>Cell signalling</i>
anti-PKD/PKC μ (Ser744/748)	<i>Rabbit mAb</i>	(Ser744/748)	<i>Cell signalling</i>
α -tubulina	<i>Mouse mAb</i>	(DM1A)	<i>Cell signalling</i>

Todos os anticorpos foram diluídos em TBST + BSA 5% e utilizados a uma diluição de 1:1000, exceto o anti-p-ERK, p-AKT e p-H2AX que foram utilizados a uma diluição 1:500. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-*mouse* ou anti-*rabbit*) e a membrana foi revelada pelo método de quimioluminescência *ECL* (GE). A detecção do sinal quimioluminescente foi realizada no sistema de foto documentação *Image Quant LAS 4000 mini* (GE) e posteriormente as bandas foram analisadas e quantificadas utilizando o *software Image J*, obtendo o índice de densidade óptica de cada anticorpo utilizado neste projeto. O *software* Microsoft Excel foi

utilizado para as normalizações de expressão das proteínas em porcentagem do controle (α -tubulina). A expressão da α -tubulina foi utilizada como controle interno de normalização para proteínas totais, como: AKT, ERK, p27, p21, PARP, Caspase-3, PKC α , PKC δ , PKC ϵ , PKC ζ , PKD/PKC μ e as fosforiladas p-PKC θ , p-PKC ζ/λ , p-PKC δ/θ e p-PKC Pan (β II Ser660) que não possuem proteínas totais para a sua normalização. As demais proteínas foram normalizadas em função de sua proteína total, como: p-PKC α/β II em função de PKC α , p-PKC δ em função de PKC δ e p-PKD/PKC μ (Ser916) e p-PKD/PKC μ (Ser744/748) em função de PKD/PKC μ . Após as normalizações de expressão das proteínas em porcentagem do controle, os gráficos foram gerados através do *software* GraphPad Prism denotando a porcentagem de expressão relativa de proteínas. O experimento foi realizado uma única vez, sendo necessária a realização de sua duplicata biológica.

4.8.2- Ensaio de fracionamento celular

A linhagem celular U251-MG foi semeada e cultivada em placas de 6 poços, até atingir a confluência de aproximadamente 90%. As células foram então tratadas por 1 hora com o valor de IC₅₀ para o PEP005 e uma concentração final de 0,1 μ M do composto PMA (solução estoque de 1,62mM)⁸⁷. Subsequentemente, as frações celulares foram obtidas através do kit *ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction (Calbiochem)* de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação e transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada conforme o item 4.7.1, descrito anteriormente. As proteínas foram então incubadas com o anticorpo primário de interesse, anti-PKC α Rabbit mAb (Cell signalling), e com os respectivos anticorpos como referência das frações do experimento, anti-TRADD (7G8) Rabbit mAb (*Cell signalling*), anti-Laminina B1 (ab97775) (*Abcam*) e anti-glucose transporter GLUT1 (Ab15309) (*Abcam*). O experimento foi realizado uma única vez, sendo necessária a realização de sua duplicata biológica.

4.9- Caracterização funcional dos tratamentos com os extratos naturais/derivado

4.9.1- Ensaio de ciclo celular

Para a avaliação do ciclo celular, as linhagens celulares de glioma foram semeadas e cultivadas em placas de 6 poços, até atingirem a confluência de aproximadamente 90% em estufa a 37°C e 5% CO₂ em atmosfera úmida. Em seguida, as células foram tratadas por 24

horas com os valores de IC₅₀ para o extrato 19, suas partições (B e C) e para os compostos, PEP005 e TMZ. Posteriormente, as células tratadas foram submetidas à marcação com iodeto de propídio (PI-viabilidade celular) (FITC) utilizando o *Cell Cycle Kit (BD Biosciences)*, conforme as recomendações do fabricante. A aquisição dos dados foi realizada através do citômetro de fluxo *BD Accuri™ C6 (BD Biosciences)* e analisada com o *software BD Accuri® C6 (BD Biosciences)*. Os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e réplicas biológicas.

4.9.2- Ensaio de migração celular (*wound healing*)

A propriedade de migração celular das linhagens celulares de glioma foi avaliada através do ensaio de *wound healing* (cicatrização de ferida). Em placas de 6 poços, as linhagens de glioma foram semeadas e cultivadas até atingirem a confluência de aproximadamente 90%. Com auxílio de uma ponteira de 200µL foram realizadas duas ranhuras paralelas na monocamada celular. As células foram então incubadas com a concentração equivalente à respectiva IC₅₀ dos extratos 17 e 18. Em seguida, as áreas correspondentes às ranhuras foram fotografadas por microscopia (*Nikon Eclipse 50i*) em tempos apropriados (0, 24, 48 e 72 horas) e em 4 diferentes pontos, sendo as distâncias das medidas obtidas em *pixels* pelo *software* do microscópio (*Nikon Eclipse 50i*). A distância de migração celular foi calculada utilizando os 4 pontos de referência em cada intervalo de tempo a partir da seguinte fórmula: distância de migração relativa (%) = 100 (A-B)/a-b, onde A/a é a largura da célula da ferida antes da incubação e B/b é a largura da ferida de células após a incubação; A/B refere-se à condição tratada, a/b refere-se à condição do controle (DMSO)⁸⁸. Após os cálculos de porcentagem de migração, o *software* GraphPad Prism foi utilizado para gerar os gráficos. O experimento foi realizado uma única vez, sendo necessária a realização de sua triplicata biológica.

4.9.3- Ensaio de migração celular (*transwell*)

A propriedade de migração celular das linhagens celulares tratadas com o valor de IC₅₀ para o extrato 19, suas partições (B e C) e para o composto sintético PEP005 foi também avaliada, através da capacidade de migrar para a membrana do inserto (*transwell*) utilizando o *Kit Cell Culture Inserts (Falcon)*. O meio DMEM suplementado com 10% de soro foi

utilizado como quimio-atrativo no compartimento inferior dos poços da placa de 24 poços. As células foram tripsinizadas e semeadas a uma densidade de 1×10^5 aos compartimentos superiores dos poços juntamente ao tratamento (valor de IC_{50}) com os extratos, partições e composto sintético de interesse e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. As células que tiveram a capacidade de migrar e alcançar a membrana do inserto foram fixadas com metanol 100% a -20°C e coradas com Hematoxilina/Eosina. As células foram visualizadas e fotografadas por microscopia (*Nikon Eclipse 50i*), sendo posteriormente quantificadas através do *software* ImageJ e normalizadas em *Microsoft Excel*. Após a normalização da porcentagem de células tratadas em relação ao controle (DMSO), os gráficos foram gerados a partir do *software* GraphPad Prism. Os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e biológicas.

4.9.4- Ensaio de invasão celular

A propriedade de invasão das linhagens celulares tratadas com o valor de IC_{50} para o extrato 19 e suas partições (B e C) e do composto sintético PEP005 foi avaliada pelo ensaio de matrigel, através da capacidade de transmigrar uma matriz extracelular utilizando o *Biocoat Matrigel Invasion Chamber (BD biosciences)*. O matrigel foi hidratado por 2 horas com meio de cultura DMEM sem suplementação com soro. Posteriormente, no compartimento inferior dos poços da placa foi colocado o meio DMEM suplementado com 10% de soro utilizado como quimio-atrativo. As células foram tripsinizadas e semeadas a uma densidade de 1×10^5 aos compartimentos superiores dos poços juntamente ao tratamento (valor de IC_{50}) com os extratos, partições e composto sintético de interesse e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as células que não degradaram o matrigel (matriz extracelular) foram removidas com um cotonete tipo *swab* e as células invasoras ou seja, que degradaram o matrigel e alcançaram a membrana do inserto foram fixadas com metanol 100% a -20°C e coradas com Hematoxilina/Eosina. As células foram visualizadas e fotografadas por microscopia (*Nikon Eclipse 50i*), sendo posteriormente quantificadas através do *software* ImageJ e normalizadas em *Microsoft Excel*. Após a normalização da porcentagem de células tratadas que invadiram a membrana em relação ao controle 1% (DMSO), os gráficos foram gerados a partir do *software* GraphPad Prism. Os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e biológicas.

5- Análise estatística

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade celular foram expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerado 100% de viabilidade). A concentração IC_{50} foi calculada por análise de regressão não linear utilizando o *software* GraphPad Prism[®]. ANOVA seguida de pós-teste de *Tukey* foram utilizados para comparar os grupos tratados entre si nos ensaios de citotoxicidade, migração e invasão celular por *transwell*. Os resultados dos ensaios de ciclo celular foram expressos através do teste não-paramétrico de *Kruskal Wallis* seguido de pós-teste de *Dunn*, estabelecendo uma comparação entre os grupos. O GraphPad Prism[®] foi utilizado para todas as análises estatísticas supracitadas e um valor de $p < 0,05$ foi adotado como uma diferença estatisticamente significativa.

6- Delineamento Experimental

Na Figura 7 estão sumarizadas as estratégias experimentais utilizadas neste projeto.

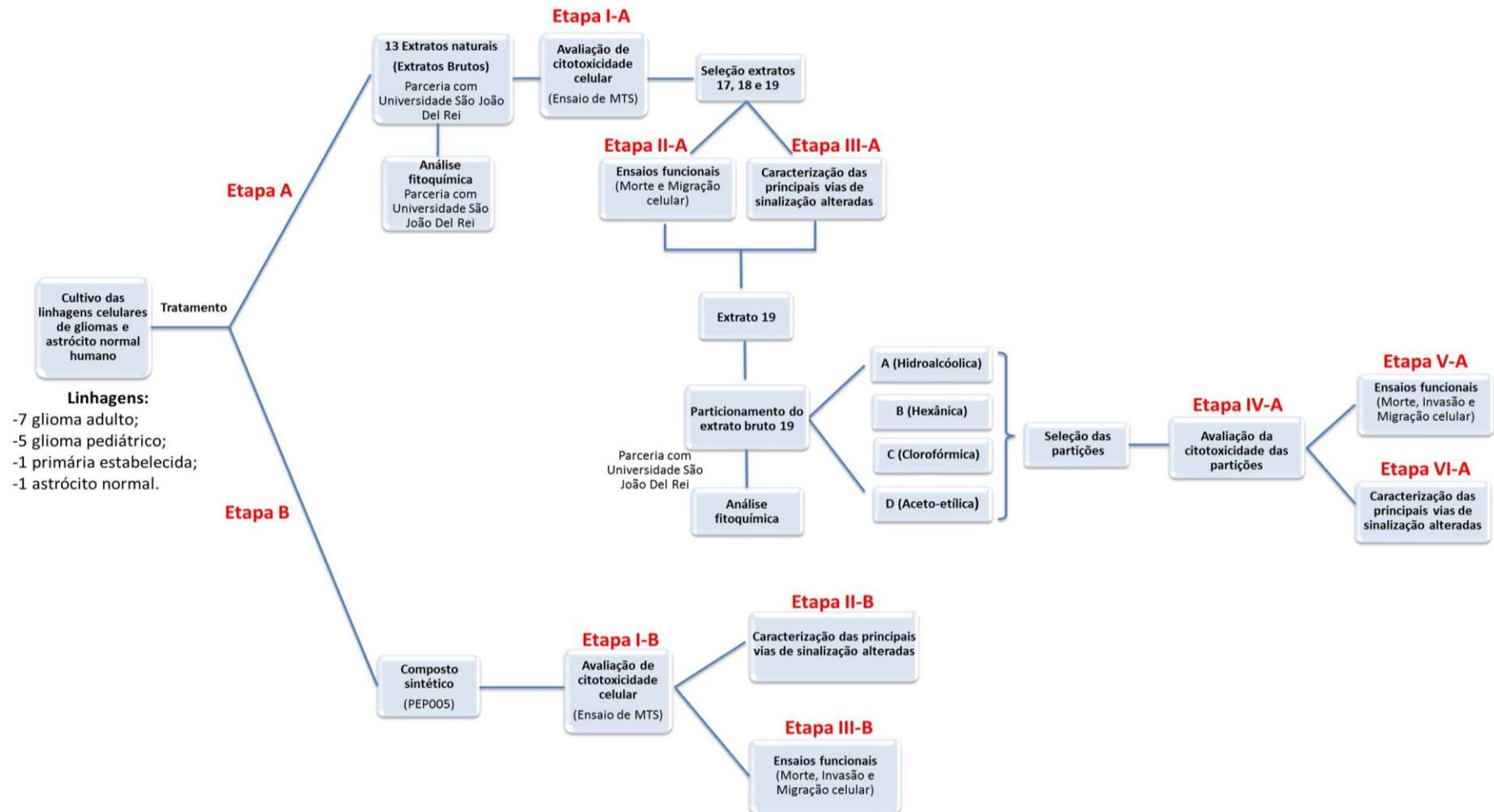


Figura 7- Delineamento experimental.

6.1- Aspectos éticos

Este projeto trata-se de um segmento de dois projetos previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII. O projeto intitulado: *“Estabelecimento, caracterização molecular e estudo de resposta terapêutica de culturas celulares primárias de tumores cerebrais”* recebeu aprovação do CEP sob o número 491/2011 para a utilização das linhagens tumorais primárias já estabelecidas no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos-Fundação Pio XII-Barretos/SP e para o uso de linhagens comerciais de gliomas possui a aprovação do atual projeto: 836/2014, o qual é intitulado: *“Caracterização *in vitro* do potencial antineoplásico de extratos naturais e derivados em linhagens celulares de glioma humano”*. Os extratos naturais em questão foram concedidos através da autorização do Conselho de Patrimônio Genético cedido pelo CNPq sob coordenação da professora e pesquisadora Dr^a. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro e sob número de processo: 010465/2014-6, cujo projeto é intitulado: *“Caracterização fitoquímica de extratos vegetais e sua ação sobre metaloproteinases”*.

7- RESULTADOS

7.1- Análise do perfil de citotoxicidade dos extratos brutos

A citotoxicidade dos extratos brutos *in vitro* foi avaliada a partir da viabilidade celular de 5 linhagens comerciais, 2 de glioma adulto (GAMG e U251-MG), 2 de glioma pediátrico (SF188 e RES259) e 1 linhagem de astrócito normal humano (NHA), além de 1 linhagem de glioblastoma previamente estabelecida pelo grupo (HCB151)⁸⁵. Inicialmente realizou-se um *screening* a partir de 13 extratos brutos da flora Brasileira o qual demonstrou que as linhagens de glioma apresentaram um perfil heterogêneo de resposta citotóxica aos extratos brutos após 72h de tratamento (Figura 8, 9 e 10). A maioria dos extratos avaliados exibiu uma resposta dose-dependente nas linhagens de glioma.

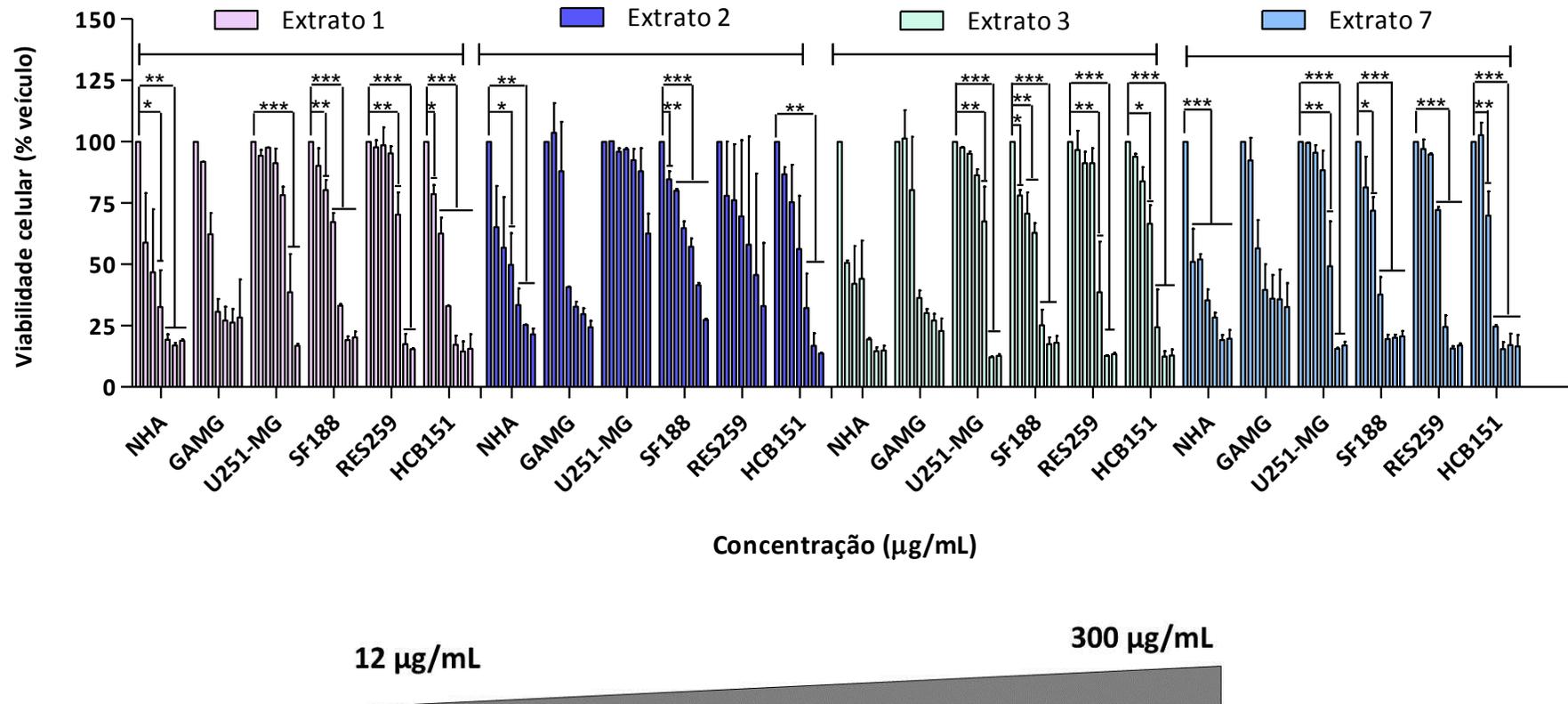


Figura 8- Efeito da concentração dos extratos naturais 1, 2, 3 e 7 em linhagens comerciais de astrócito normal, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre controle e grupos experimentais.

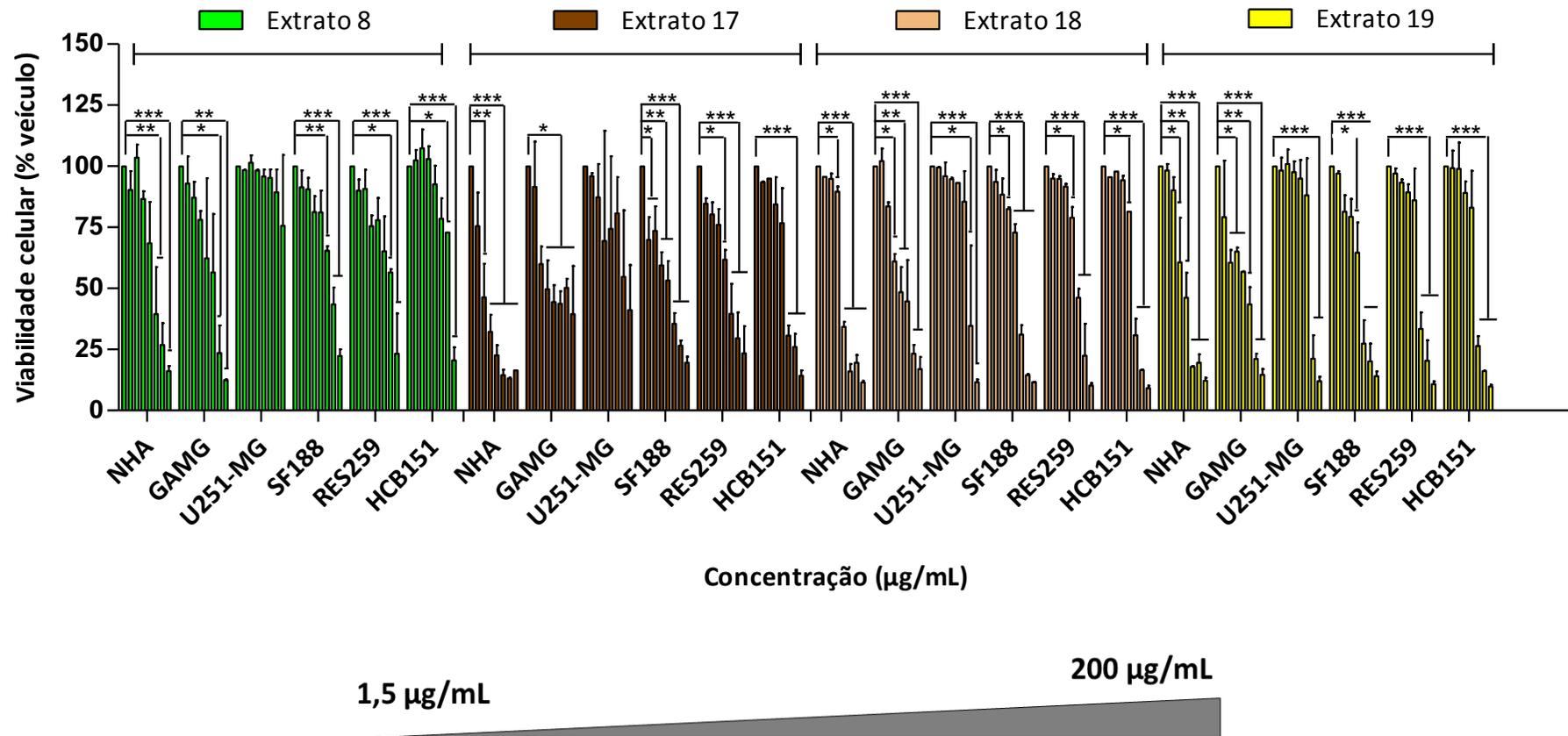


Figura 9- Efeito da concentração dos extratos naturais 8, 17, 18 e 19 em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre controle e grupos experimentais.

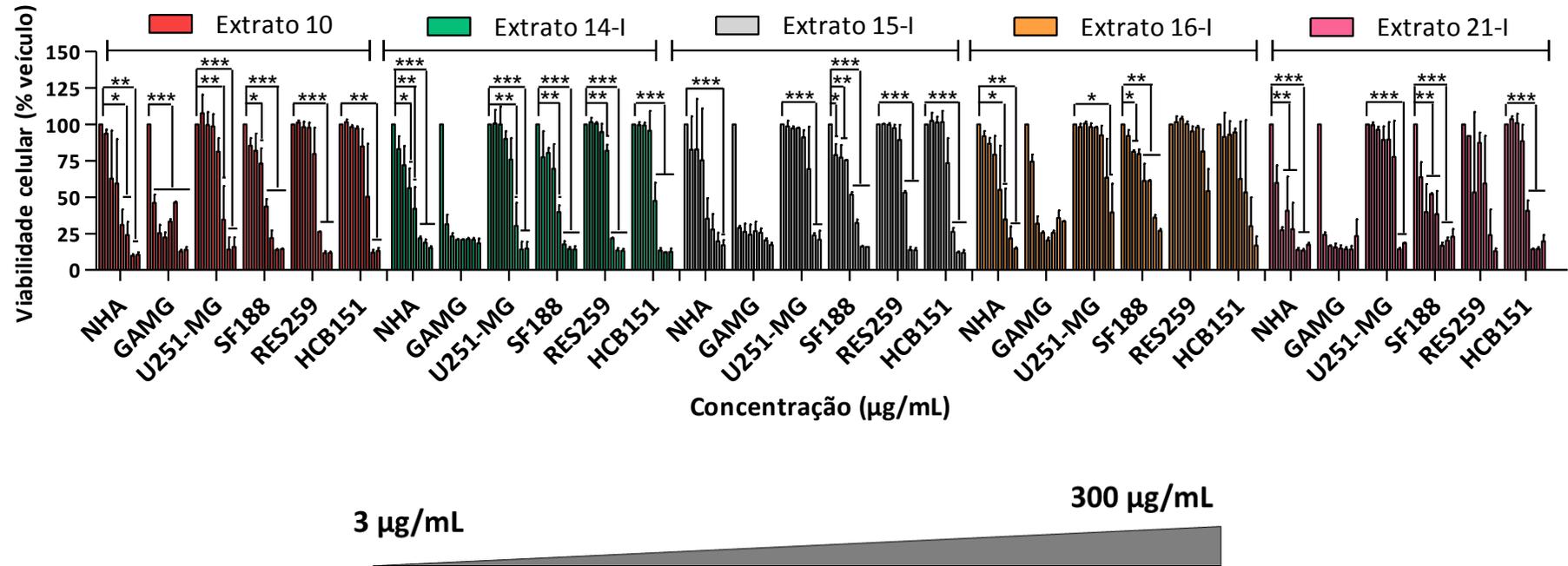


Figura 10- Efeito da concentração dos extratos naturais 10, 14-I, 15-I, 16-I e 21-I em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre controle e grupos experimentais.

A partir das curvas obtidas para a avaliação do efeito da concentração dos extratos, calculou-se a média dos valores de $IC_{50} \pm$ desvio padrão conforme (Figura 11 e Tabela 6). A média dos valores de IC_{50} dos extratos 1, 2, 3, 7, 8, 10, 14-I, 15-I, 16-I, 17, 18, 19 e 21-I para as linhagens podem ser evidenciados na Tabela 6. Entre os 13 extratos avaliados, os extratos 17, 18 e 19, promoveram maior citotoxicidade. Dessa forma, para uma avaliação mais ampla deste trabalho, os 3 extratos (17, 18 e 19) foram selecionados por possuírem valores de IC_{50} próximos aos critérios do NCI, o qual preconiza valores de $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ para que compostos sejam avaliados como promissores e utilizados para futuros ensaios de purificação⁸⁶. Além disso, foi realizada uma análise comparativa entre os extratos avaliados e o quimioterápico padrão TMZ, que apresentou uma IC_{50} média para as linhagens tumorais de 26,54, sendo esta próxima à média encontrada para os extratos 17, 18 e 19 (Figura 11 e Tabela 6).

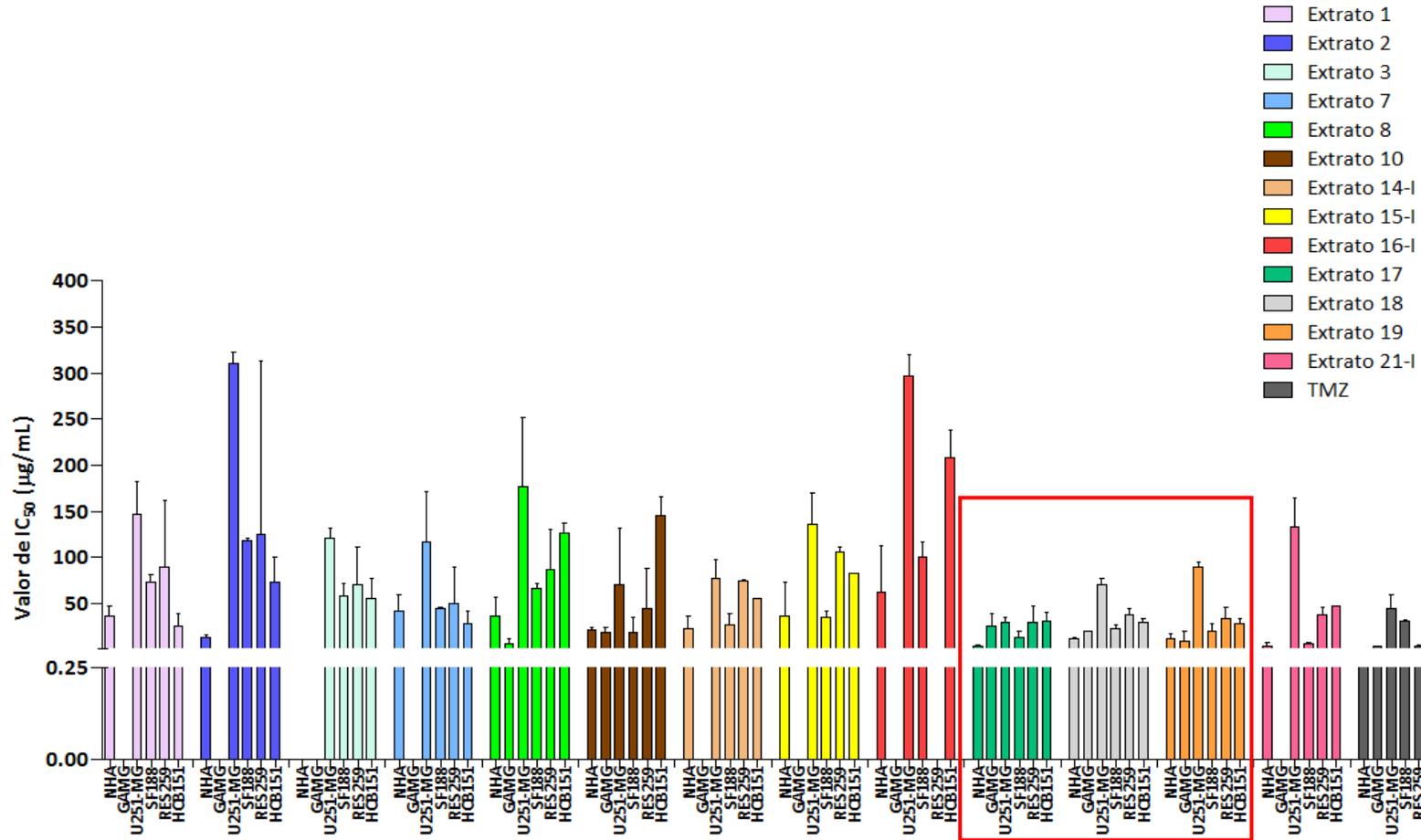


Figura 11- Valores de IC_{50} dos extratos naturais 1, 2, 3, 7, 8, 10, 14-I, 15-I, 16-I, 17, 18, 19 e 21-I e quimioterápico padrão TMZ em linhagens comerciais de astrócito normal, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma. A IC_{50} foi calculada por análise de regressão não linear a partir dos resultados de viabilidade celular avaliados após 72 horas utilizando o *software* Graphpad Prism. Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata.

Tabela 6- Média e desvio padrão dos valores de IC₅₀ para os extratos naturais da flora Brasileira e quimioterápico TMZ.

Extratos/ Quimio- terápico	Média dos valores de IC ₅₀ (µg/mL) ± desvio padrão						Média das linhagens tumorais
	NHA	GAMG	U251-MG	SF188	RES259	HCB151	
1	36,38±11,3	ID	146,1±35,8	72,72±8,3	89,92±71,5	25,93±12,9	83,66
2	13,4±2,3	ID	ID	118,5±1,7	124,7±188,1	72,85±26,9	105,35
3	ID	ID	120,6±10,9	57,45±13,7	70,93±40	54,78±22	75,94
7	41,30±18,21	ID	117,2±53,5	43,75±1,4	50,40±39	28,69±13,4	59,98
8	36,19±20,1	6,66±4,3	176,5±74,88	66,20±5,3	86,80±43,5	125,7±10,9	92,37
10	21,46±1,9	18,83±4,67	70,52±61	18,45±16,9	44,15±43,9	145,7±19,7	59,53
14-I	22,84±14,05	ID	77,68±20,1	26,55±12,4	74,76±1,5	55,30±0	58,57
15-I	35,68±37,1	ID	136,4±33,6	34,31±8	106,3±5,2	81,95±0	89,74
16-I	62,67±50,2	ID	296,9±23,2	100,5±16,6	ID	208,1±30,1	201,83
17	2,9±1,4	25,7±12,9	28,9±5,5	13,6±5,7	29,3±17,4	30,2±10,6	25,54
18	12,05±1,1	19,94±0,4	70,21±7,4	23,08±3,6	38,07±5,7	30,05±3,9	36,27
19	12,11±5,3	8,37±11,8	89,85±5	19,28±8,3	33,04±12,0	27,43±6,2	35,59
21-I	3,73±3,7	ID	132,5±32,5	6,56±0,6	37,04±8,4	47,52±0	55,90
TMZ	1,28±26,26	7,06±31,84	39,78±23,67	30,74±27,91	16,93±27,55	38,22±26,02	26,54

ID-utilizado para valores de IC₅₀ indeterminados.

A partir dos valores de IC₅₀ obtidos foi possível avaliar ainda, o IS (Índice de Seletividade) tanto para os extratos brutos quanto para o quimioterápico TMZ das linhagens tumorais em relação à linhagem de astrócito normal (NHA), como evidenciado na Tabela 7. Um valor de IS maior ou igual a 2,0 foi adotado como critério de seletividade para os extratos/quimioterápico avaliados⁸⁶. Entretanto, os resultados evidenciaram que apenas a linhagem GAMG apresentou um IS de 5,4 para o extrato 8 em relação à linhagem de astrócito normal (Tabela 7).

Tabela 7- Índice de seletividade para os extratos naturais da flora Brasileira e quimioterápico TMZ.

Extratos/Quimioterápico	Linhagens				
	GAMG	U251-MG	SF188	RES259	HCB151
1	<i>ID</i>	0,2	0,5	0,4	1,4
2	<i>ID</i>	<i>ID</i>	0,1	0,1	0,2
3	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>
7	<i>ID</i>	0,4	0,9	0,8	1,4
8	5,4	0,2	0,5	0,4	0,3
10	1,1	0,3	1,2	0,5	0,1
14-I	<i>ID</i>	0,3	0,9	0,3	0,4
15-I	<i>ID</i>	0,3	1,0	0,3	0,4
16-I	<i>ID</i>	0,2	0,6	<i>ID</i>	0,3
17	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
18	0,6	0,2	0,5	0,3	0,4
19	1,4	0,1	0,6	0,4	0,4
21-I	<i>ID</i>	0,03	0,6	0,1	0,1
TMZ	0,2	0,03	0,0	0,1	0,03

ID-utilizado para valores indeterminados.

7.1.1- Análise do perfil de citotoxicidade das partições do extrato bruto 19

Para identificar os compostos secundários responsáveis pela bioatividade do extrato 19 em linhagens de glioma, a citotoxicidade celular promovida por este foi comparada com as 4 partições obtidas a partir do seu particionamento: A (hidroalcolica), B (hexânica), C (clorofórmica) e D (aceto-etílica). Os resultados evidenciaram que assim como o extrato bruto, as partições também apresentaram um efeito dose-dependente (Figura 12).

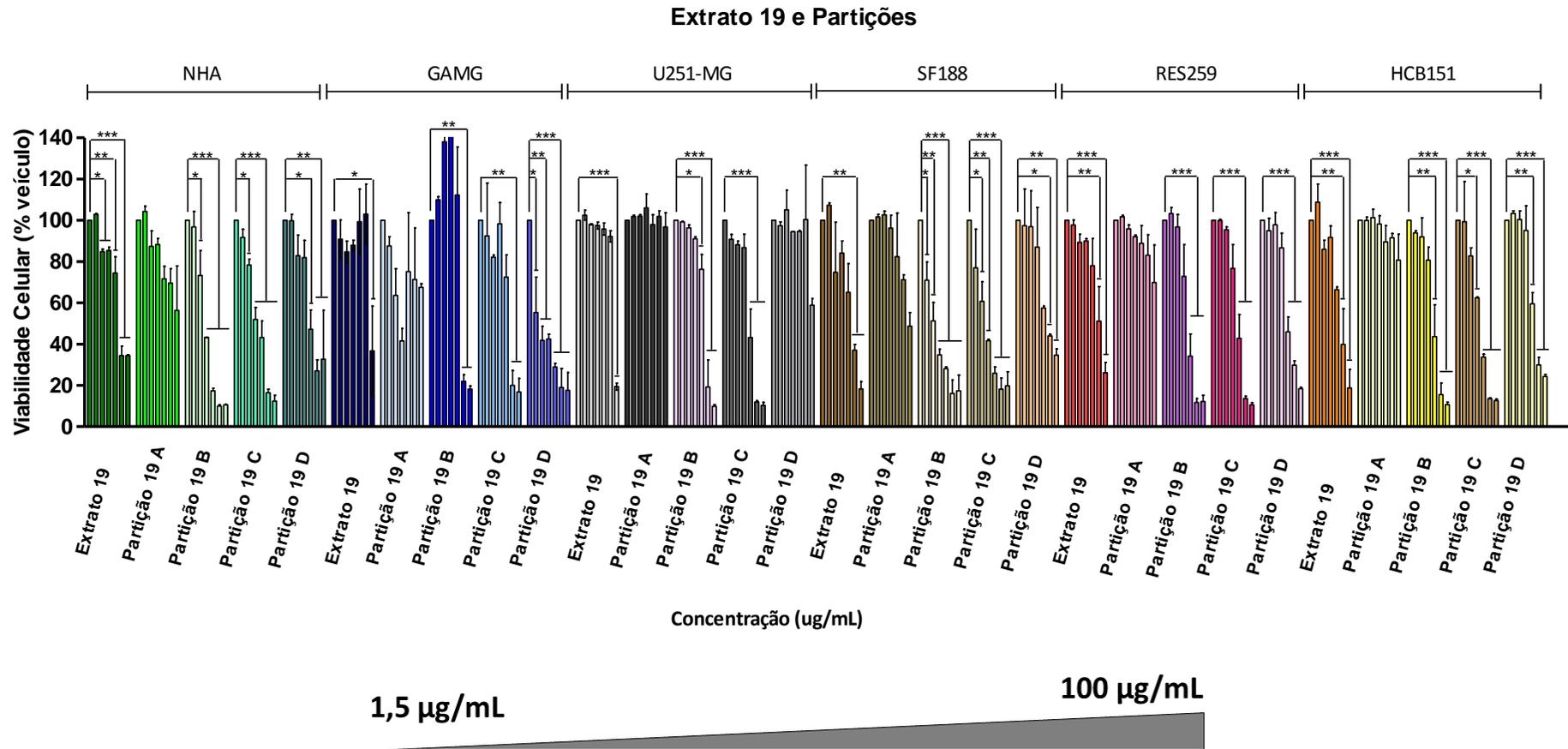


Figura 12- Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições A, B, C e D em linhagens comerciais de astrócito normal, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais.

A média dos valores de IC_{50} das linhagens tumorais foi calculada para o extrato bruto (utilizado como controle interno dos experimentos) e suas partições (Tabela 8). O resultado revelou que em sua maioria, as linhagens de glioma apresentaram uma maior resposta citotóxica para as partições quando comparadas ao extrato bruto. Entre as partições, a partição C (clorofórmica) foi mais citotóxica que as partições B (hexânica) e D (aceto-etílica) após 72h de tratamento, sendo as médias de IC_{50} de 19,79, 23,47 e 41,66 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Entretanto, para a partição A (hidroalcolólica) os ensaios revelaram valores de IC_{50} indeterminados para as concentrações utilizadas em todas as linhagens avaliadas (Figura 13 e Tabela 8).

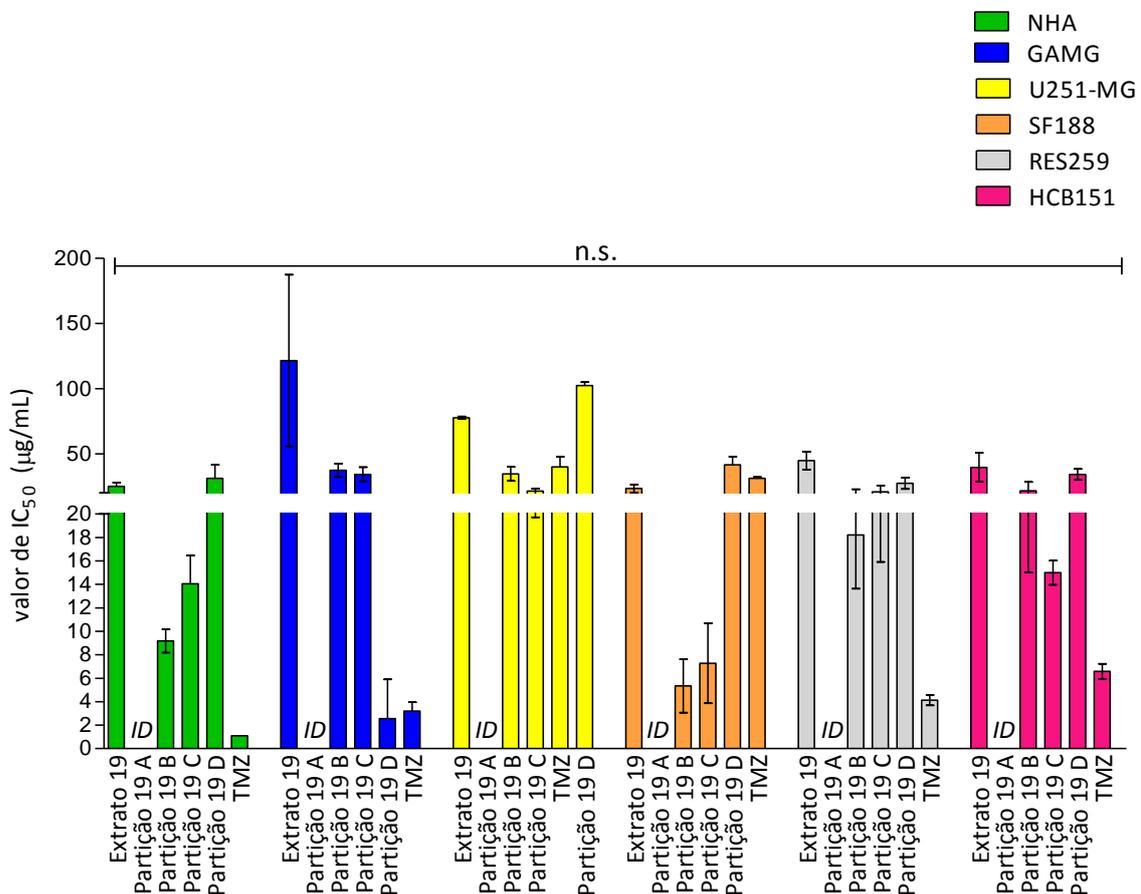


Figura 13- Perfil de citotoxicidade do extrato bruto 19 e suas partições A, B, C e D em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma em relação ao quimioterápico padrão Temozolamida (TMZ). A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). A IC_{50} foi calculada por análise de regressão não

linear utilizando o *software* Graphpad Prism. Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Para valores de p diferentes de $p < 0,05$ foi utilizada a sigla n.s. (não significativo). *ID* foi utilizado para valores de IC_{50} indeterminados.

Uma análise comparativa foi também realizada com o quimioterápico, TMZ, que apresentou uma IC_{50} média para as linhagens tumorais de 26,54, sendo esta uma média próxima aos valores encontrados para o extrato 19 e suas partições (Figura 13 e Tabela 8). Entretanto, os resultados evidenciaram não ser estatisticamente significantes quando comparamos os valores de IC_{50} obtidos para o extrato bruto 19 às suas partições e também para o quimioterápico TMZ (Figura 13).

Tabela 8- Média e desvio padrão dos valores de IC_{50} para o extrato bruto 19, partições e quimioterápico TMZ.

Média dos valores de IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm desvio padrão							
Partição/ Quimio- terápico	NHA	GAMG	U251-MG	SF188	RES259	HCB151	Média das linhagens tumorais
Extrato 19	12,11 \pm 5,35	8,37 \pm 11,81	89,85 \pm 5,09	19,28 \pm 8,28	33,04 \pm 12,08	27,43 \pm 6,20	35,59
Partição 19 A	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>
Partição 19 B	9,17 \pm 0,99	37,39 \pm 5,22	34,66 \pm 5,45	5,35 \pm 2,27	18,22 \pm 4,58	21,76 \pm 6,74	23,47
Partição 19 C	14,06 \pm 2,41	34,31 \pm 5,50	21,54 \pm 1,80	7,28 \pm 3,40	20,83 \pm 4,91	15,00 \pm 1,00	19,79
Partição 19 D	31,22 \pm 10,40	2,57 \pm 3,34	102,4 \pm 2,61	41,69 \pm 6,06	27,40 \pm 4,25	34,26 \pm 4,20	41,66
TMZ	1,28 \pm 26,26	7,06 \pm 31,84	39,78 \pm 23,67	30,74 \pm 27,91	16,93 \pm 27,55	38,22 \pm 26,02	26,54

ID-utilizado para valores de IC_{50} indeterminados.

Na tabela 9 é possível evidenciar ainda, os resultados obtidos do IS das partições do extrato 19 comparado aos valores obtidos para a TMZ. A análise realizada mostrou um perfil de seletividade apenas para a partição D, que mostrou ser 12,1 mais seletiva para a

linhagem GAMG quando comparada à linhagem de astrócito normal (NHA). Entretanto, não houve este mesmo perfil para as demais linhagens avaliadas (Tabela 9).

Tabela 9- Índice de seletividade para o extrato bruto 19, partições e quimioterápico TMZ.

Partições/Quimioterápico	Linhagens				
	GAMG	U251-MG	SF188	RES259	HCB151
Extrato 19	1,4	0,1	0,6	0,4	0,4
Partição 19 A	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>	<i>ID</i>
Partição 19 B	0,2	0,3	1,7	0,5	0,4
Partição 19 C	0,4	0,7	1,9	0,7	0,9
Partição 19 D	12,1	0,3	0,7	1,1	0,9
TMZ	0,2	0,03	0,04	0,1	0,03

ID-utilizado para valores indeterminados.

Foi realizada também uma cinética da viabilidade celular nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas com o intuito de identificar o período de maior citotoxicidade para as linhagens de gliomas tratadas, com o extrato e suas partições (B (hexânica) e C (clorofórmica)). O resultado mostrou que para a maioria das linhagens de glioma houve um perfil de resposta citotóxica dose-e-tempo-dependente a partir de 24 horas de tratamento tanto para o extrato quanto para as partições (Figura 14, 15, 16, 17 e 18 e Tabela 10).

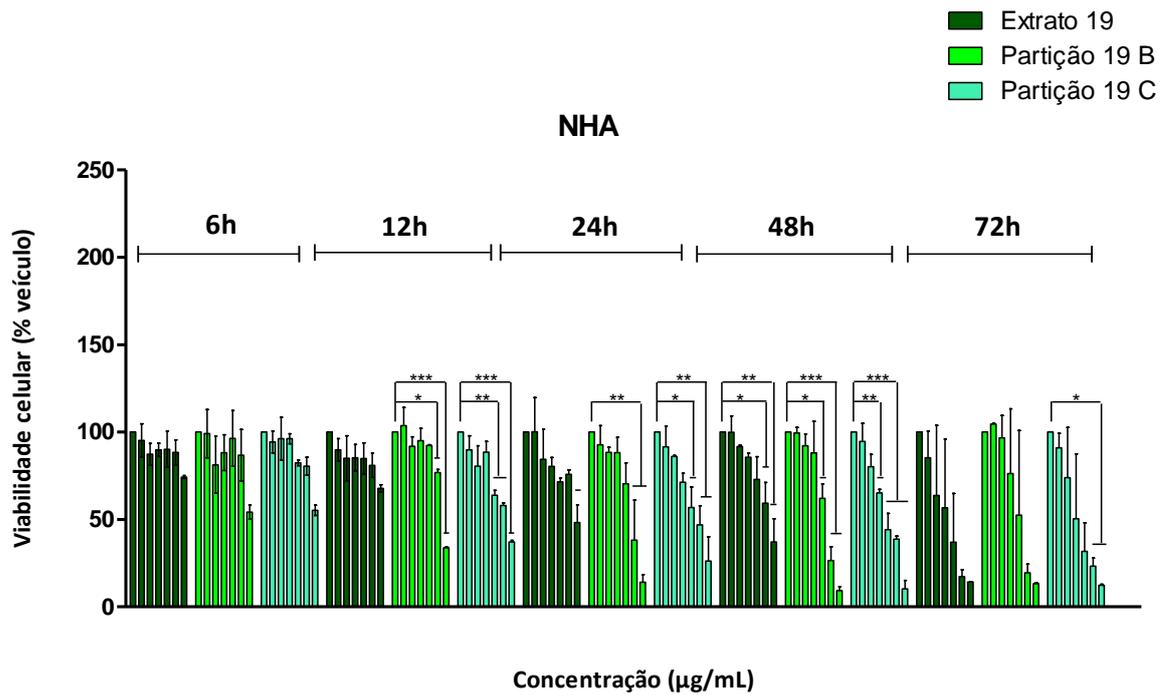


Figura 14- Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de astrócito humano NHA. A viabilidade celular foi avaliada após 6, 12, 24, 48 e 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais.

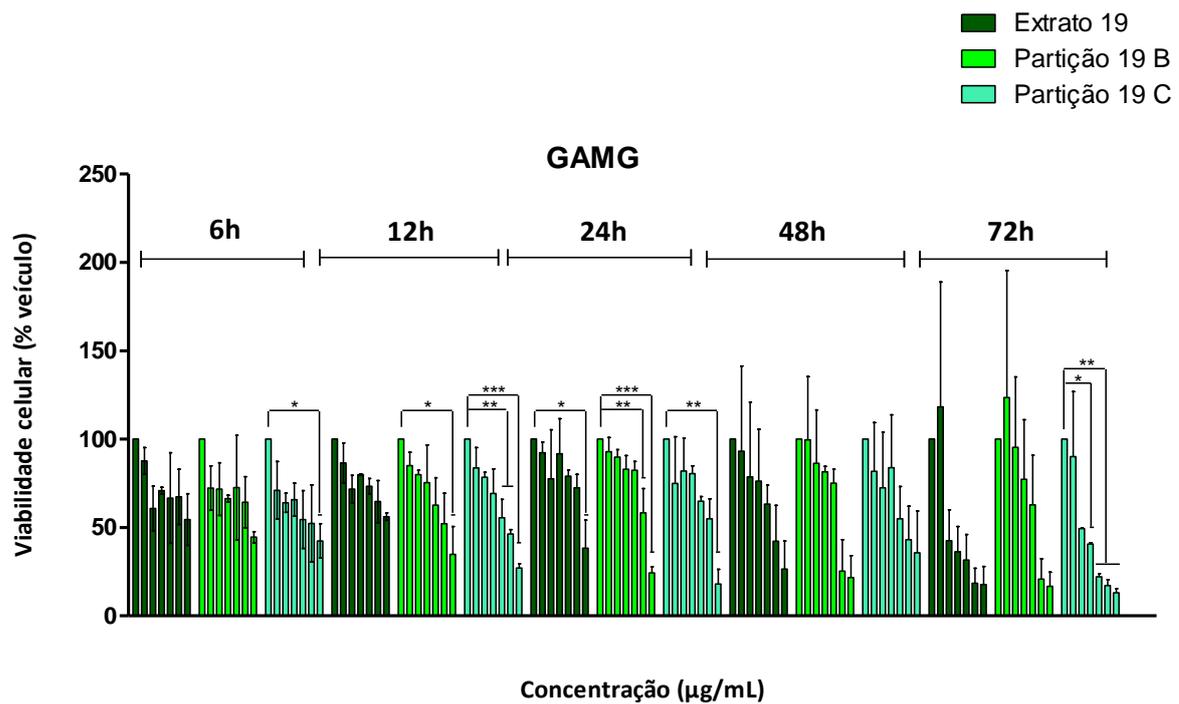


Figura 15- Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de glioma humano adulto GAMG. A viabilidade celular foi avaliada após 6, 12, 24, 48 e 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais.

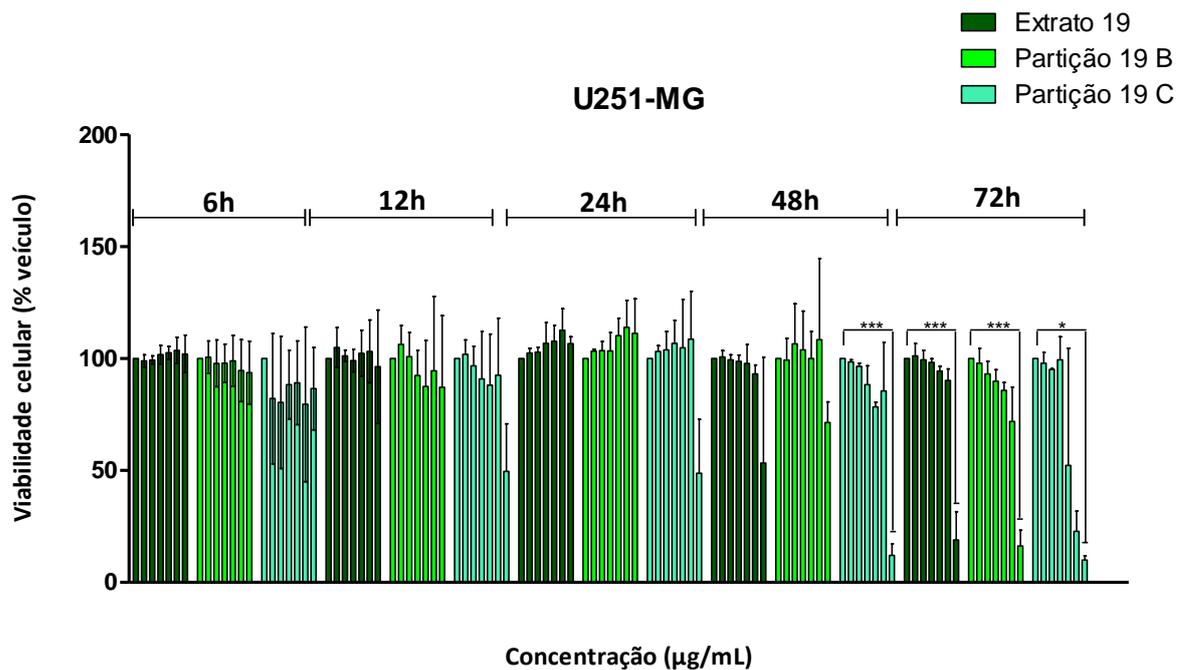


Figura 16- Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de glioma humano adulto U251-MG. A viabilidade celular foi avaliada após 6, 12, 24, 48 e 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais.

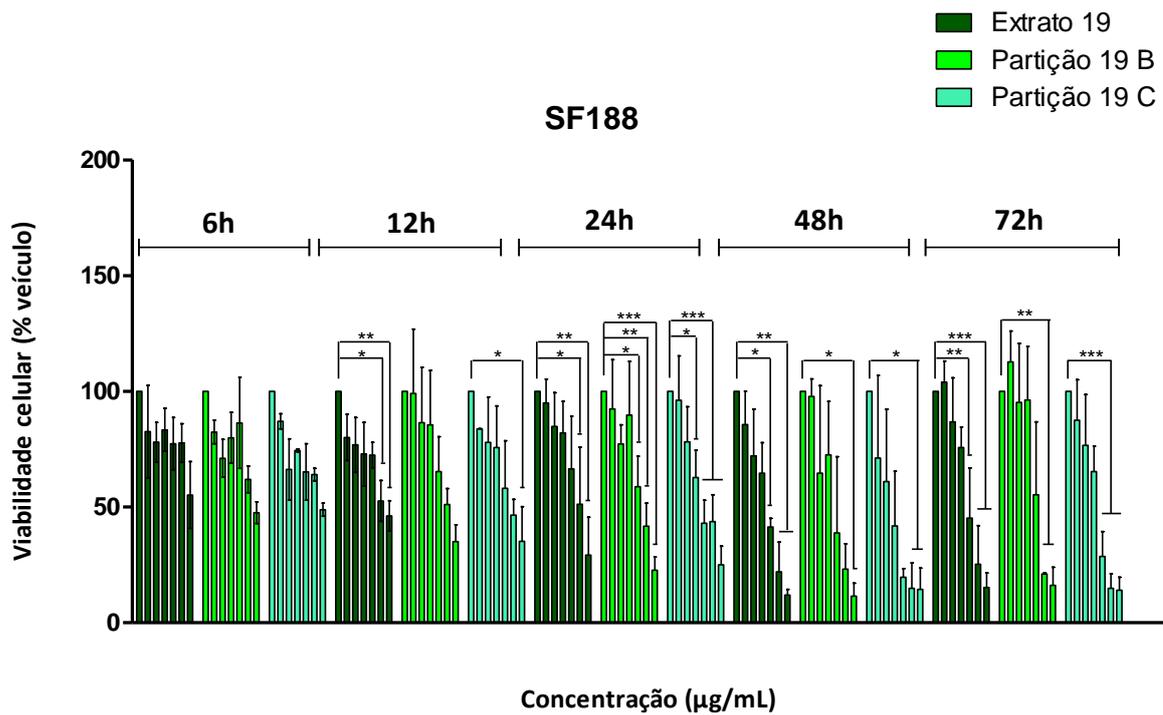


Figura 17- Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de glioma humano pediátrico SF188. A viabilidade celular foi avaliada após 6, 12, 24, 48 e 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais.

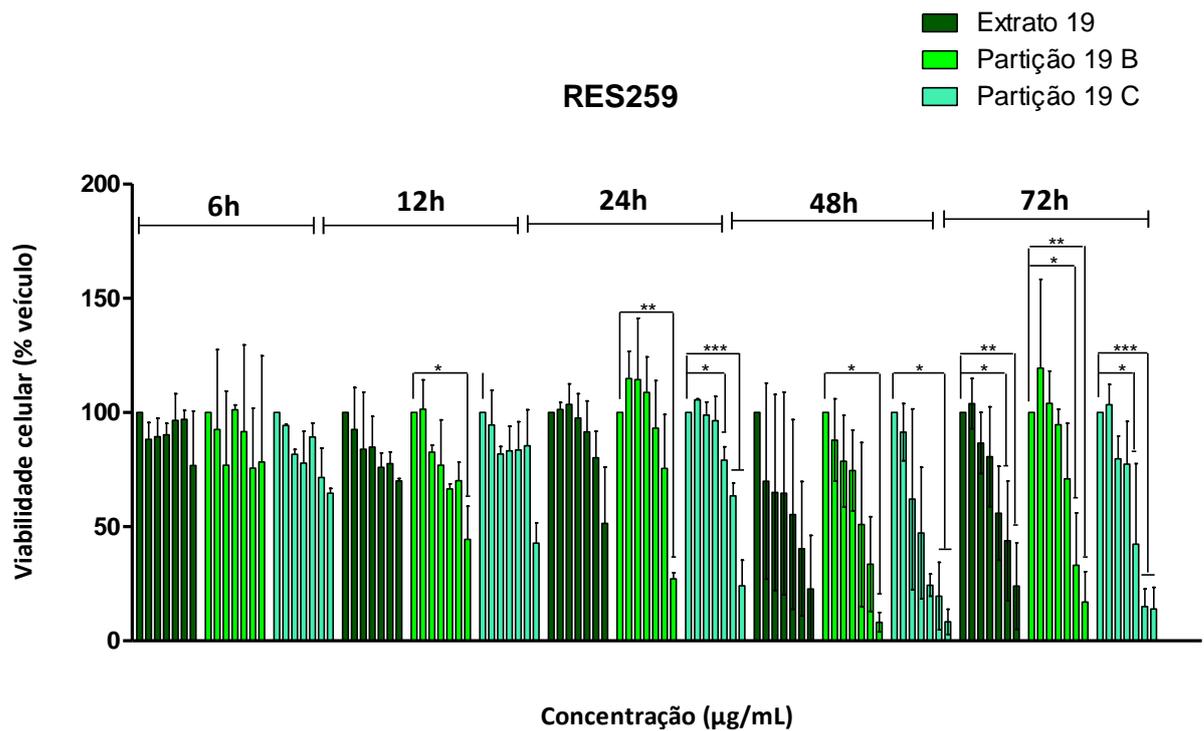


Figura 18- Efeito da concentração do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) em linhagem comercial de glioma humano pediátrico RES259. A viabilidade celular foi avaliada após 6, 12, 24, 48 e 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais.

Tabela 10- Média e desvio padrão dos valores de IC₅₀ para a cinética com o extrato bruto 19 e partições B (hexânica) e C (clorofórmica).

Média dos valores de IC ₅₀ (µg/mL) ± desvio padrão						
Linhagens	Composto/ Partições	6h	12h	24h	48h	72h
NHA	Extrato bruto 19	ID	ID	ID	64,94±23,29	11,58±32,70
	Partição B	ID	77,66±24,02	37,64±32,21	30,55±37,02	24,41±38,33
	Partição C	ID	61,39±21,98	35,13±26,58	20,93±32,62	12,33±34,31
GAMG	Extrato bruto 19	ID	ID	89,29±20,33	35,98±26,61	8,12±40,52
	Partição B	ID	49,20±21,85	55,95±26,24	34,78±32,96	28,64±40,35
	Partição C	51,52±18,43	32,17±24,64	40,11±26,13	39,14±23,52	6,89±35,07
SF188	Extrato bruto 19	ID	91,88±17,86	56,87±24,38	15,42±32,78	18,25±36,91
	Partição B	ID	51,88±24,84	26,54±31,35	16,46±34,98	33,83±37,13
	Partição C	ID	41,58±22,61	22,35±30,20	6,34±32,81	18,31±37,00
RES259	Extrato bruto 19	ID	ID	ID	20,45±24,31	33,68±34,40
	Partição B	ID	93,91±19,89	66,21±30,07	22,89±32,60	40,92±36,99
	Partição C	ID	ID	64,72±25,95	9,16±35,78	17,87±41,25
U251-MG	Extrato bruto 19	ID	ID	ID	ID	75,83±29,82
	Partição B	ID	ID	ID	ID	63,18±29,28
	Partição C	ID	ID	ID	69,03±30,89	28,15±39,32

ID-utilizado para valores de IC₅₀ indeterminados.

7.2- Efeitos dos extratos 17, 18 e 19 na ativação/inibição de vias de sinalização intracelular em linhagens de glioma

Para caracterizar o efeito dos extratos 17, 18 e 19 nas vias de sinalização de sobrevivência/proliferação, morte, dano no DNA e ciclo celular, as linhagens de glioma foram avaliadas pelo ensaio de *western-blot* após 24 horas de tratamento utilizando seus respectivos valores de IC₅₀. Para isso, foram utilizadas duas linhagens definidas como

sensíveis (GAMG e SF188) e duas resistentes (U251-MG e RES259), selecionadas a partir de seus valores de IC_{50} .

Inicialmente foram avaliadas as vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e proliferação celular. Para isso, o perfil de expressão das proteínas AKT e ERK foi avaliado após 24 horas de tratamento com os extratos 17, 18 e 19, como mostra a Figura 19. Os resultados revelaram um perfil heterogêneo de resposta à AKT e ERK para as linhagens de glioma. Os tratamentos com os extratos brutos 17, 18 e 19 não promoveram alterações evidentes em AKT (Figura 19). Por outro lado, o aumento da atividade da proteína ERK foi evidenciado, apenas para a linhagem de glioma pediátrico RES259 após o tratamento com o extrato 17 (Figura 19).

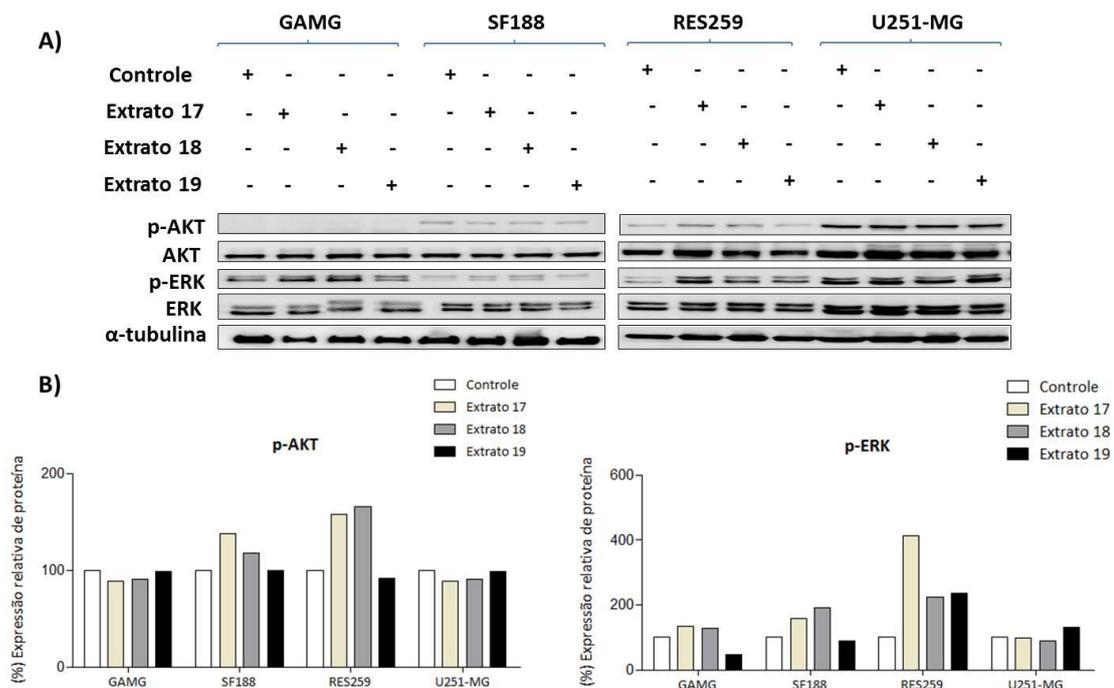


Figura 19- Efeito dos extratos brutos na expressão das proteínas, ERK e AKT, nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares GAMG, SF188, RES259 e U251-MG foram incubadas com o valor de IC_{50} referente aos extratos 17, 18 e 19 por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). As proteínas ERK e AKT foram analisadas por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis da atividade das proteínas ERK e AKT. As proteínas foram quantificadas pelo programa ImageJ.

O perfil de ativação da proteína de reparo ao dano no DNA, H2AX, também foi avaliado em gliomas. Os resultados obtidos sugerem que os tratamentos com os três extratos promovem um aumento na atividade de H2AX para as linhagens de glioma (GAMG e SF188), mais sensíveis aos extratos. No entanto, para as linhagens mais resistentes aos tratamentos, (RES259 e U251-MG), os resultados iniciais sugerem uma diminuição da fosforilação de H2AX como mostra a Figura 20.

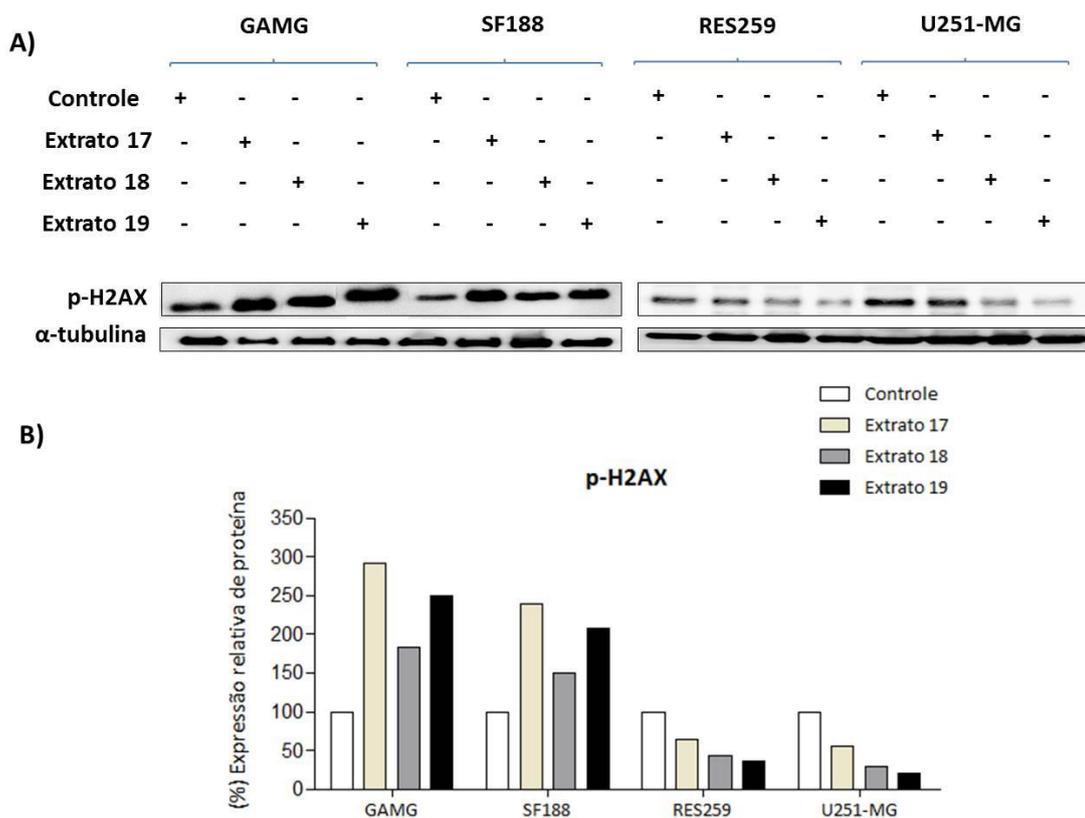


Figura 20- Efeito dos extratos brutos na atividade da proteína H2AX nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares GAMG, SF188, RES259 e U251-MG foram incubadas com o valor de IC_{50} referente aos extratos 17, 18 e 19 por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). A proteína p-H2AX foi analisada por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis da atividade da proteína H2AX. A proteína foi quantificada pelo programa ImageJ.

O efeito dos extratos brutos 17, 18 e 19 foi também investigado na modulação do ciclo celular a partir da expressão da proteína reguladora p27. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram um aumento da expressão de p27 apenas na linhagem de glioma RES259 quando tratada com todos os extratos testados. Nas demais linhagens testadas

(GAMG, SF188 e U251-MG) não foram observadas alterações desta proteína (Figura 21).

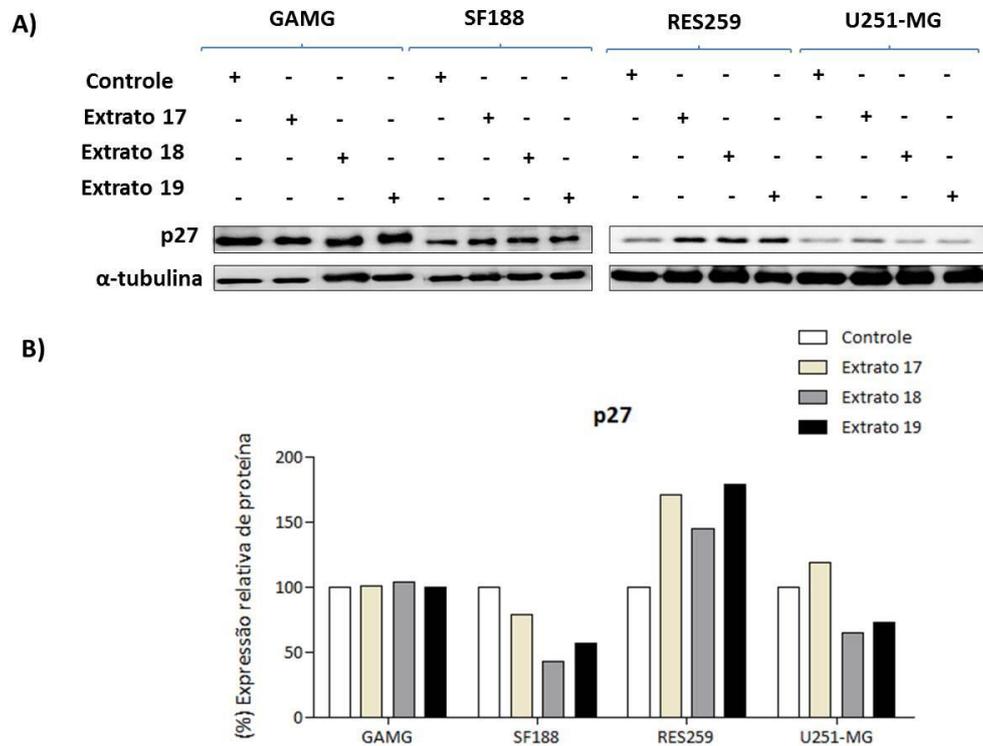


Figura 21- Efeito dos extratos brutos na expressão de p27 nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares GAMG, SF188, RES259 e U251-MG foram incubadas com o valor de IC_{50} referente aos extratos 17, 18 e 19 por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). A proteína p27 foi analisada por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis de expressão da atividade da proteína p27. A proteína foi quantificada pelo programa ImageJ.

Os resultados iniciais demonstram que os extratos 17, 18 e 19 possuem um potencial antineoplásico alterando vias importantes relacionadas ao processo de carcinogênese. No entanto, mais ensaios deverão ser realizados para confirmar o mecanismo de ação destes extratos em gliomas.

7.3- Efeitos do extrato 19 e partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na ativação/inibição de vias de sinalização intracelular em linhagens de glioma

Para melhor caracterizar o efeito dos compostos secundários que compõe o extrato bruto 19, avaliamos o efeito das suas partições de maior potencial citotóxico, B e C, nas vias

de sinalização de morte e ciclo celular. As linhagens de glioma previamente selecionadas pelo perfil de sensibilidade (GAMG e SF188) e de resistência (U251-MG e RES259) ao extrato bruto e as partições foram previamente tratadas por 24 horas. As linhagens de glioma foram avaliadas quanto à clivagem de PARP, proteína relacionada à morte celular, e expressão da proteína reguladora do ciclo celular, p27, como observado na Figura 22 e 23. Na Figura 22, os resultados obtidos mostram um aumento da clivagem de PARP para as linhagens mais resistentes (RES259 e U251-MG) tratadas com o extrato 19 e suas partições. Entretanto, para as linhagens sensíveis (GAMG e SF188), os resultados não são conclusivos, uma vez que os controles na presença do veículo (DMSO) também apresentaram a clivagem desta proteína.

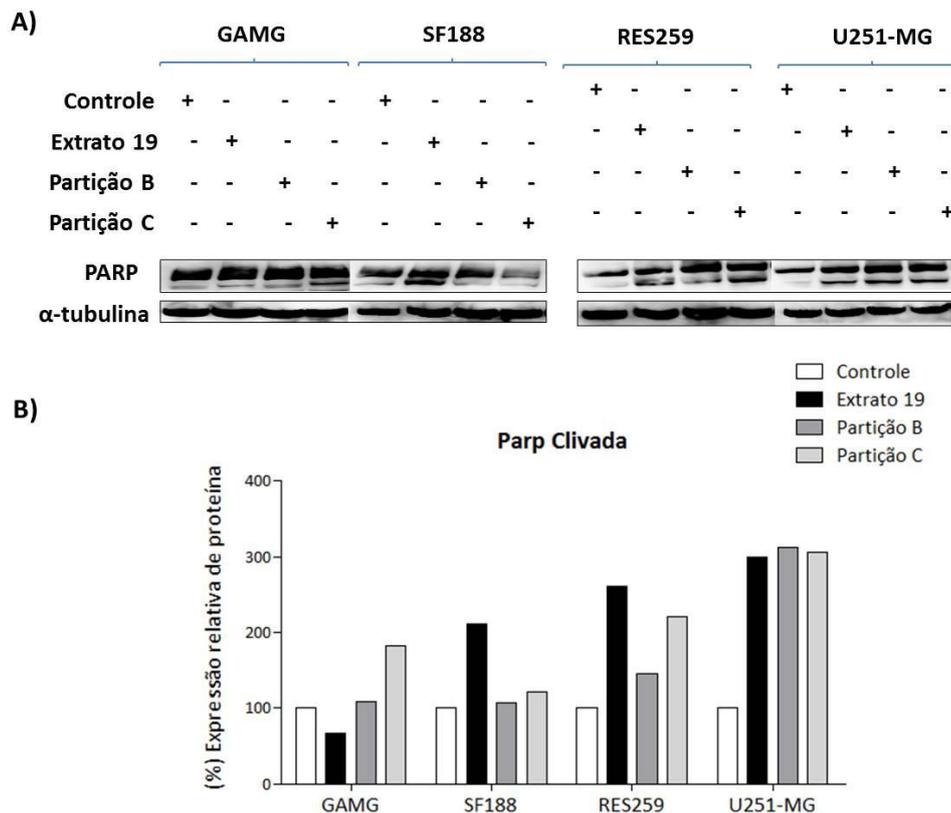


Figura 22- Efeito do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na clivagem da proteína PARP nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares GAMG, SF188, RES259 e U251-MG foram incubadas com o valor de IC_{50} referente ao extrato 19 e suas respectivas partições, B e C, por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). A proteína PARP foi analisada por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis de expressão da proteína PARP clivada. A proteína foi quantificada pelo programa ImageJ.

O extrato 19 e suas partições foram avaliados ainda, em relação à modulação do ciclo celular através da expressão da proteína reguladora p21. Para esta caracterização, apenas uma linhagem sensível (GAMG) e outra resistente (U251-MG) foram utilizadas. Os resultados mostram que houve um aumento da expressão desta proteína para as linhagens GAMG e U251-MG, tratadas com a partição C (clorofórmica), mais citotóxica quando comparada às outras partições avaliadas neste estudo (Figura 23). Ressalta-se que o aumento desta expressão foi mais pronunciado na linhagem mais sensível, GAMG.

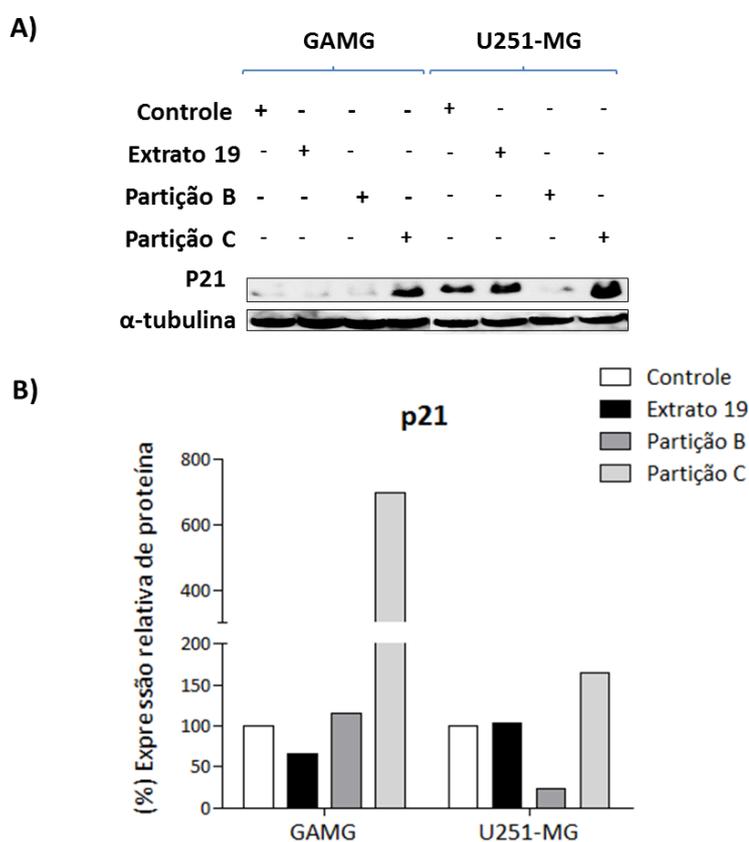


Figura 23- Efeito do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na expressão de p21 nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares GAMG e U251-MG foram incubadas com o valor de IC_{50} referente ao extrato 19 e suas respectivas partições, B e C, por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). A proteína p21 foi analisada por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis de expressão da atividade da proteína p21. A proteína foi quantificada pelo programa ImageJ.

7.4- Caracterização biológica dos extratos brutos/partições

7.4.1- Ensaio de ciclo celular

O efeito do extrato 19 e suas partições B e C foi também avaliado na modulação das fases do ciclo celular em 2 linhagens de glioma (GAMG e U251-MG) após 24 horas de tratamento. As linhagens foram tratadas com o extrato 19 e suas partições (valores de IC_{50}) e com o quioterápico de referência, TMZ. O efeito dos tratamentos na distribuição do ciclo celular foi determinado através da contagem de material genético celular (DNA) utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os tratamentos com o extrato 19, suas partições e TMZ não promoveram alterações na distribuição do ciclo celular durante o período avaliado para as linhagens GAMG e U251-MG (Figuras 24 e 25 e Tabelas 11 e 12).

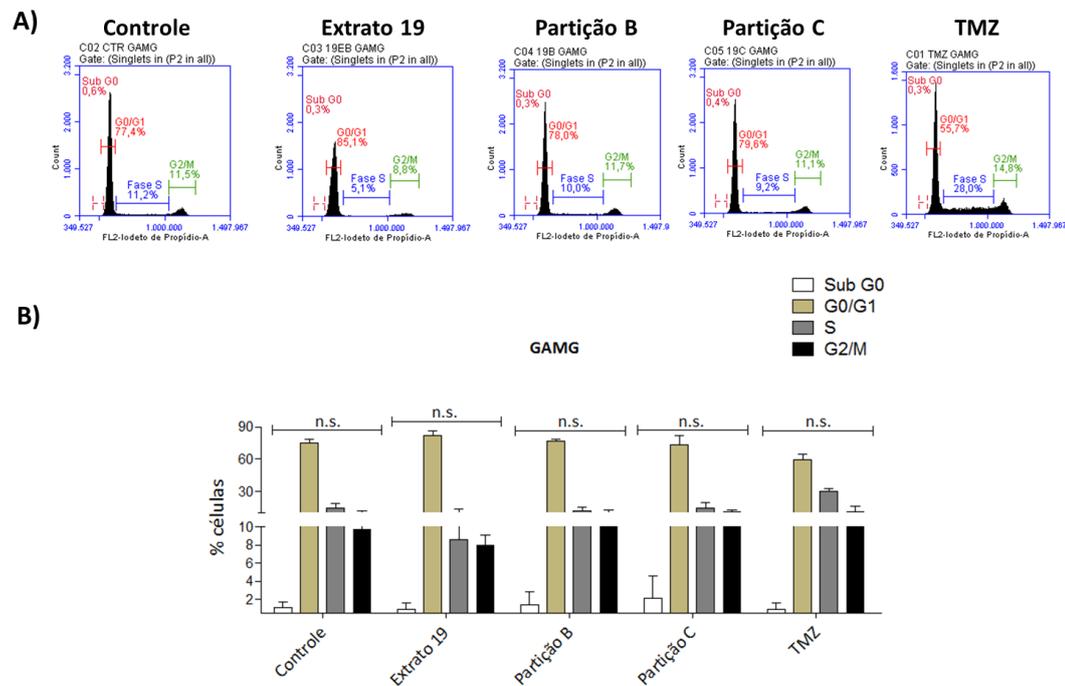


Figura 24- Efeito do extrato bruto 19, partições B (hexânica) e C (clorofórmica) e quimioterápico TMZ na distribuição do ciclo celular na linhagem de glioma humano adulto GAMG. **A)** A linhagem GAMG foi incubada com os valores de IC_{50} para o extrato 19 e suas partições B e C, e com o quimioterápico TMZ por 24 horas. As células foram fixadas, marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. **B)** Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata e evidenciam a porcentagem de células \pm desvio padrão nas fases Sub G0, G0/G1, S e G2/M. Para valores de p diferentes de 0,05 foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

Tabela 11- Média da porcentagem de células e desvio padrão para a linhagem de glioma (GAMG) tratada com o extrato 19 e suas partições e o quimioterápico TMZ.

Média da porcentagem de células \pm desvio padrão						
GAMG	Fases do ciclo celular	Controle	Extrato 19	Partição B	Partição C	TMZ
		G0/G1	75,00 \pm 3,39	81,95 \pm 4,45	76,55 \pm 2,05	73,00 \pm 9,33
	S	14,40 \pm 4,52	8,60 \pm 4,95	12,25 \pm 3,18	14,80 \pm 5,23	29,85 \pm 2,61
	G2/M	9,75 \pm 2,47	8,00 \pm 1,13	10,05 \pm 2,33	10,60 \pm 1,98	11,15 \pm 5,16
	Sub G0	1,05 \pm 0,63	0,85 \pm 0,77	1,35 \pm 1,48	2,15 \pm 2,47	0,85 \pm 0,77

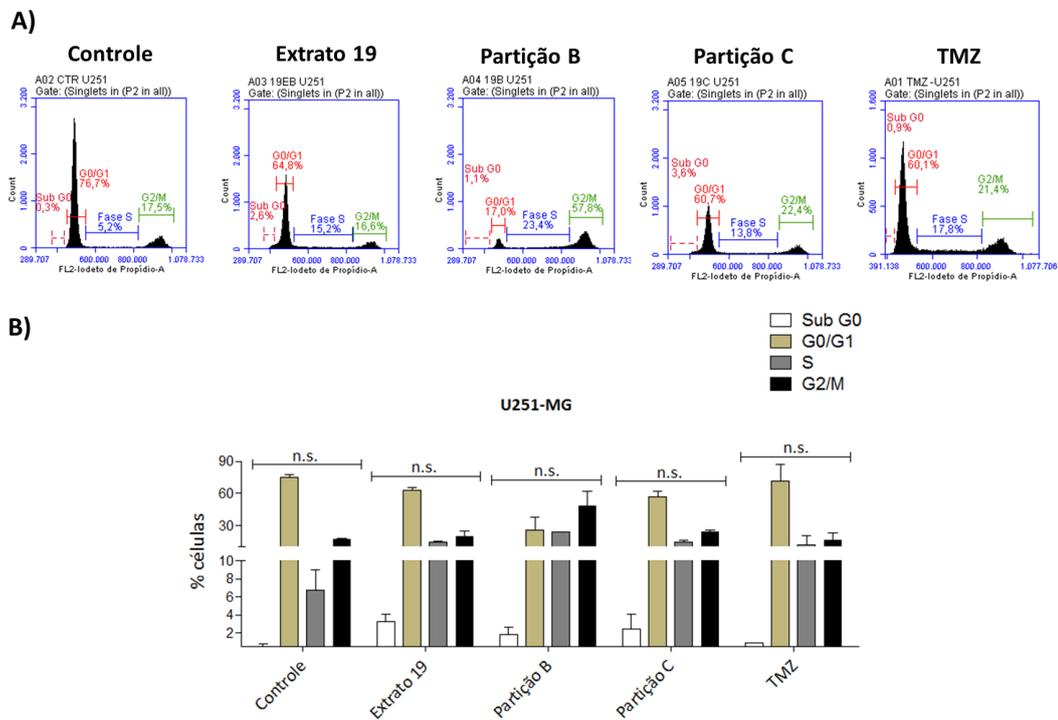


Figura 25- Efeito do extrato bruto 19, partições B (hexânica) e C (clorofórmica) e quimioterápico TMZ na distribuição do ciclo celular na linhagem de glioma humano adulto U251-MG. **A)** A linhagem U251-MG foi incubada com os valores de IC₅₀ referentes ao extrato 19 e suas respectivas partições, B e C, e o quimioterápico TMZ por 24 horas. As células foram fixadas, marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. **B)** Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata e evidenciam a porcentagem de células \pm desvio padrão nas fases Sub G0, G0/G1, S e G2/M. Para valores de p diferentes de 0,05 foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

Tabela 12- Média da porcentagem de células e desvio padrão para a linhagem de glioma (U251-MG) tratada com o extrato 19 e suas partições e o quimioterápico TMZ.

Média da porcentagem de células \pm desvio padrão						
	Fases do ciclo celular	Controle	Extrato 19	Partição B	Partição C	TMZ
U251-MG	G0/G1	75,40 \pm 1,83	62,85 \pm 2,75	25,70 \pm 12,30	56,70 \pm 5,65	71,20 \pm 15,70
	S	6,75 \pm 2,19	14,35 \pm 1,20	23,55 \pm 0,21	14,70 \pm 1,27	11,70 \pm 8,62
	G2/M	16,85 \pm 0,91	20,05 \pm 4,87	48,15 \pm 13,65	23,75 \pm 1,90	16,30 \pm 7,21
	Sub G0	0,50 \pm 0,28	3,20 \pm 0,84	1,75 \pm 0,91	2,45 \pm 1,62	0,85 \pm 0,07

7.4.2- Ensaio de migração celular (*wound healing*)

A análise preliminar do efeito dos extratos brutos (17 e 18) no processo de migração celular foi avaliada em 3 linhagens de glioma (RES259, GAMG e U251-MG). Aparentemente, o tratamento com os extratos promoveu uma atenuação na migração celular ao longo do tempo na linhagem U251-MG, enquanto que para as linhagens RES259 e GAMG, os resultados são inconclusivos (Figuras 26, 27 e 28). As imagens referentes ao tempo de 72 horas foram excluídas devido ao fato das monocamadas das linhagens terem sofrido descolamento durante o ensaio. Dessa forma, mais estudos deverão ser realizados para consolidar os resultados obtidos.

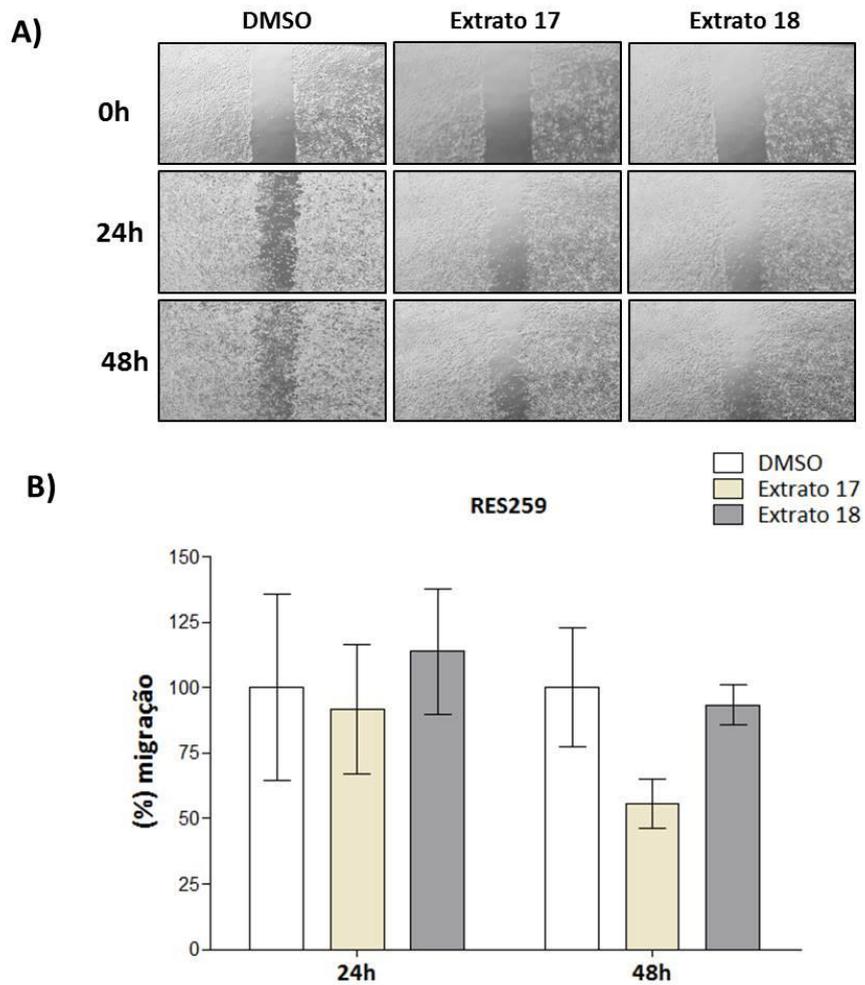


Figura 26- Efeito dos extratos 17 e 18 na migração celular na linhagem celular de glioma RES259. **A)** A migração celular foi avaliada com o ensaio *wound healing* após o tratamento com os extratos 17 e 18. Um zero padronizado (ferida) foi aplicado à monocamada e imagens digitalizadas foram tomadas em vários pontos de tempo (0, 24 e 48 horas) e o programa ImageJ foi utilizado para determinar a distância de migração. **B)** Os dados foram expressos pela porcentagem de migração das ranhuras em relação ao controle (0 hora). Os gráficos evidenciam apenas um experimento realizado.

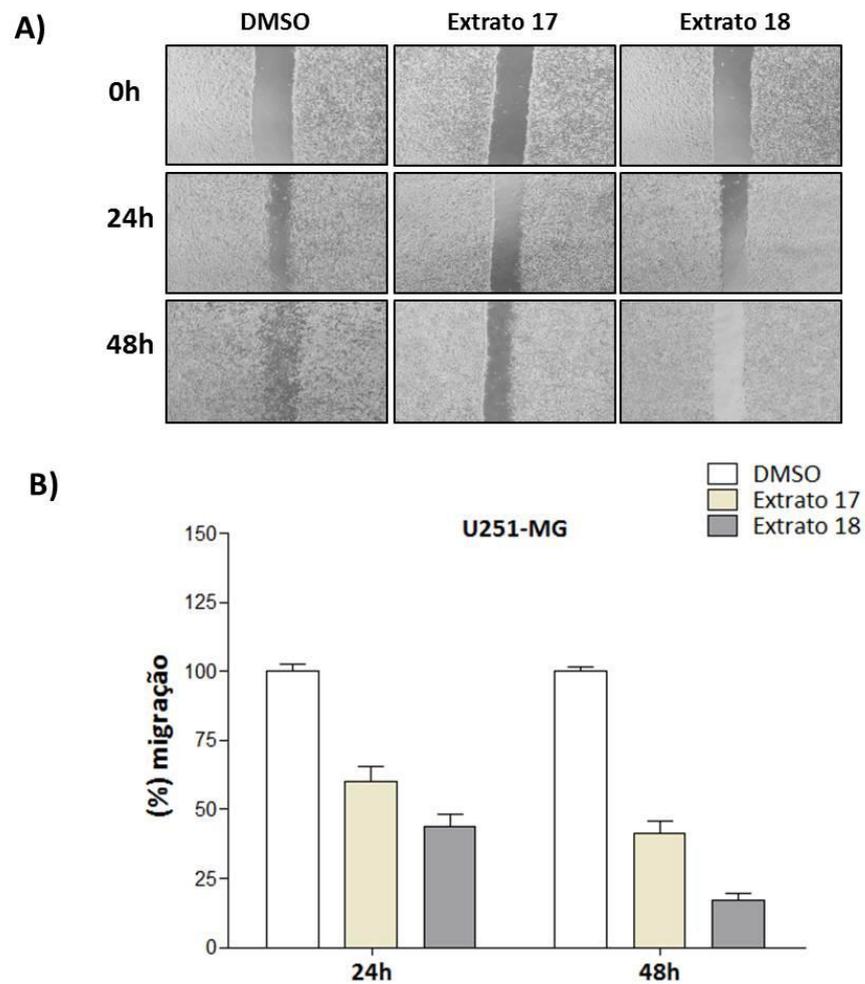


Figura 27- Efeito dos extratos 17 e 18 na migração celular na linhagem celular de glioma U251-MG. **A)** A migração celular foi avaliada com o ensaio *wound healing* após o tratamento com os extratos 17 e 18. Um zero padronizado (ferida) foi aplicado à monocamada e imagens digitalizadas foram tomadas em vários pontos de tempo (0, 24 e 48 horas) e o programa ImageJ foi utilizado para determinar a distância de migração. **B)** Os dados foram expressos pela porcentagem de migração das ranhuras em relação ao controle (0 hora). Os gráficos evidenciam apenas um experimento realizado.

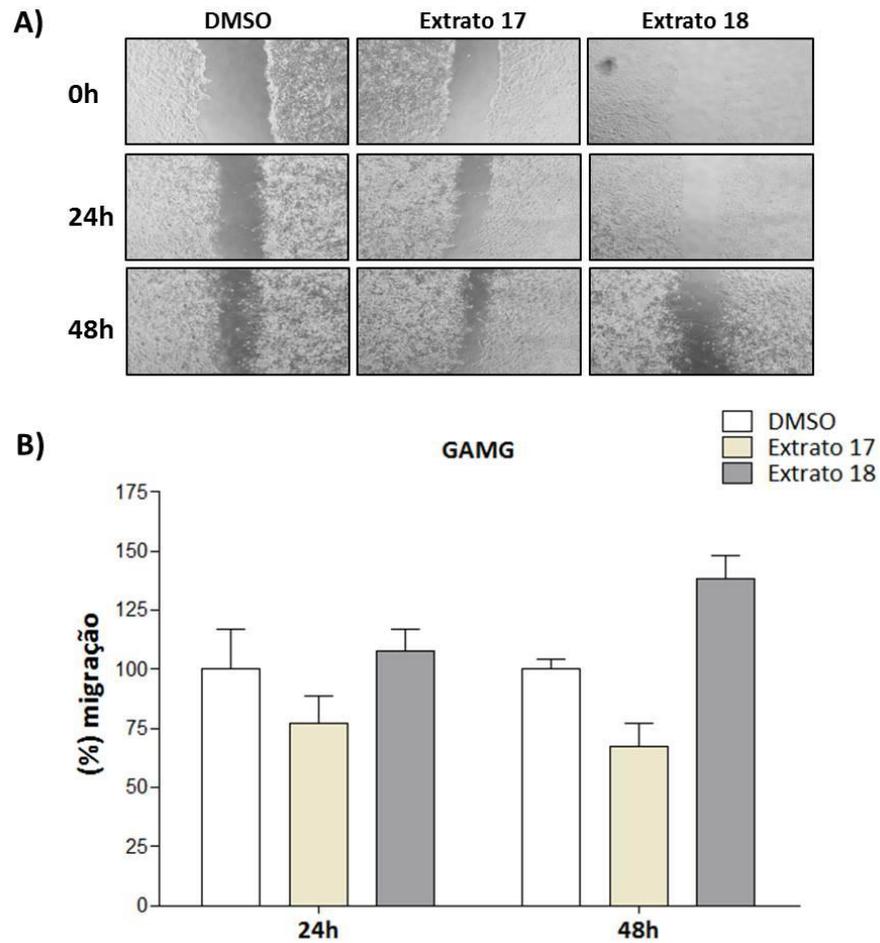


Figura 28- Efeito dos extratos 17 e 18 na migração celular na linhagem celular de glioma GAMG. **A)** A migração celular foi avaliada com o ensaio *wound healing* após o tratamento com os extratos 17 e 18. Um zero padronizado (ferida) foi aplicado à monocamada e imagens digitalizadas foram tomadas em vários pontos de tempo (0, 24 e 48 horas) e o programa ImageJ foi utilizado para determinar a distância de migração. **B)** Os dados foram expressos pela porcentagem de migração das ranhuras em relação ao controle (0 hora). Os gráficos evidenciam apenas um experimento realizado.

7.4.3- Ensaio de migração celular (*transwell*)

O efeito do extrato 19 e suas partições, B e C, foi comparado no processo de migração celular nas linhagens celulares, GAMG e U251-MG, após 24 horas de tratamento. As linhagens foram tratadas com os respectivos valores de IC_{50} do extrato e suas partições. Os gráficos obtidos a partir dos experimentos (Figura 29) demonstram que os tratamentos não foram capazes de inibir significativamente o processo de migração celular, durante o período avaliado nas linhagens de glioma testadas. Estes resultados foram obtidos a partir de experimentos realizados em duplicata experimental e biológica.

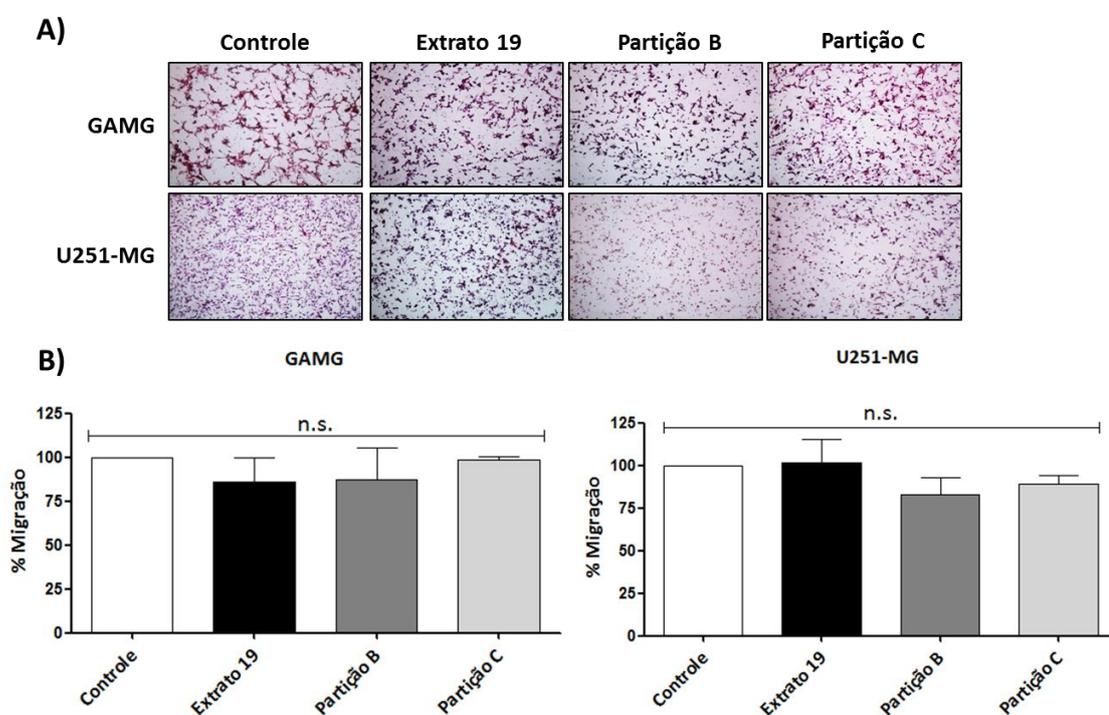


Figura 29- Efeito do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na migração celular em linhagens celulares de glioma GAMG e U251-MG. As linhagens foram plaqueadas em meio isento de soro e tratadas com os respectivos valores de IC_{50} em cada inserto (*transwell*). A quantidade de células foi determinada após 24 horas de tratamento e expressa pela porcentagem de migração de cada membrana tratada em relação ao controle (DMSO). **A)** Figuras representativas do ensaio de migração celular para as células tratadas e controle (DMSO) e **B)** gráficos representando a porcentagem de migração celular. Os ensaios são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. Para valores de p diferentes de 0,05 foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

7.4.4- Ensaio de invasão celular (*transwell*)

O mecanismo de invasão celular foi investigado para os tratamentos com o extrato 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) nas linhagens de glioma GAMG e U251-MG. As células foram tratadas utilizando-se os respectivos valores de IC_{50} tanto para o extrato 19 quanto para suas partições, durante 24 horas. Os resultados obtidos mostram que os três tratamentos não inibiram de maneira estatisticamente significativa, o processo de invasão celular para as linhagens GAMG e U251-MG (Figura 30). Estes resultados foram obtidos a partir de experimentos realizados em duplicata experimental e biológica.

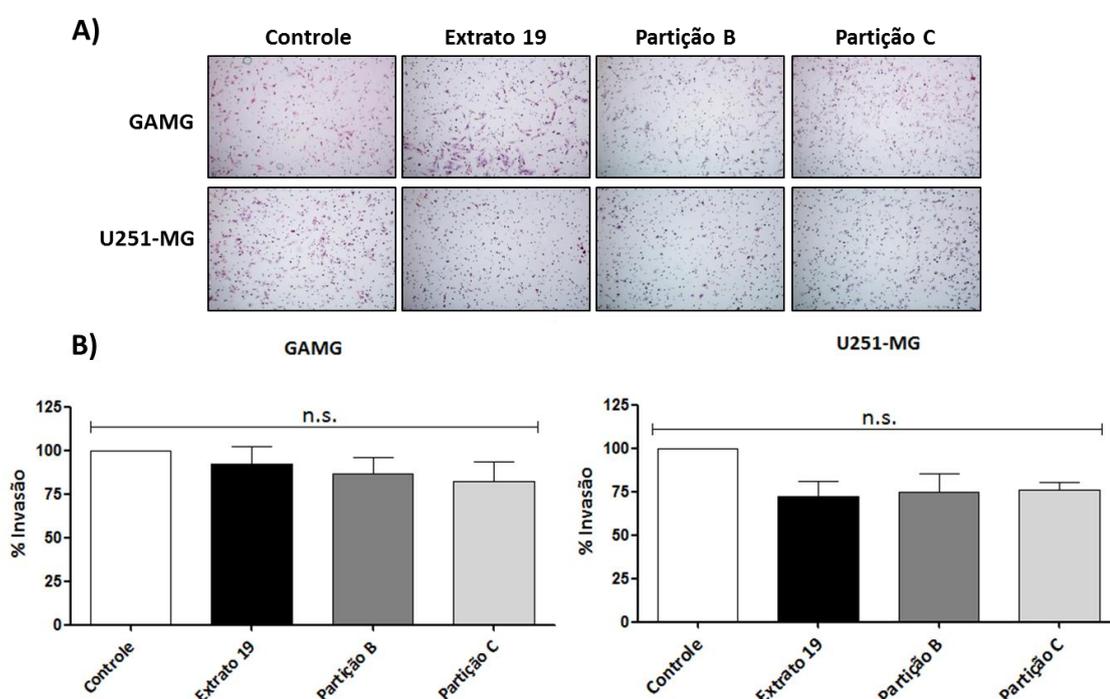


Figura 30- Efeito do extrato bruto 19 e suas partições B (hexânica) e C (clorofórmica) na invasão celular em linhagens celulares de glioma GAMG e U251-MG. As linhagens foram plaqueadas em meio isento de soro e tratadas com os respectivos valores de IC_{50} em cada inserto contendo matrigel. A quantidade de células foi determinada após 24 horas de tratamento e expressa pela porcentagem de invasão de cada membrana tratada em relação ao controle (DMSO). **A)** Figuras representativas do ensaio de invasão celular para as células tratadas e controle (DMSO) e **B)** gráficos representando a porcentagem de invasão celular. Os ensaios são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. Para valores de p diferentes de 0,05 foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

7.5-Composto sintético - PEP005

7.5.1- Análise do perfil de citotoxicidade do composto sintético PEP005

A avaliação da citotoxicidade do composto sintético, PEP005, foi realizado em 12 linhagens estabelecidas de glioma (GAMG, U251-MG, SW1088, U87-MG, A172, T-98G, SW1783, UW479, RES186, SF188, RES259 e KNS42), 1 linhagem de astrócito normal (NHA) e 1 linhagem primária previamente estabelecida em nosso laboratório (HCB151). Ressalta-se que de acordo com a sensibilidade das linhagens celulares ao composto PEP005, diferentes curvas de citotoxicidade foram utilizadas para determinação dos valores de IC₅₀ como nas figuras abaixo. O tratamento com o composto PEP005 e o quimioterápico, TMZ, demonstrou em sua maioria uma resposta dose-dependente para as linhagens após 72 horas (Figuras 31, 32, 33 e 34 e Tabela 13).

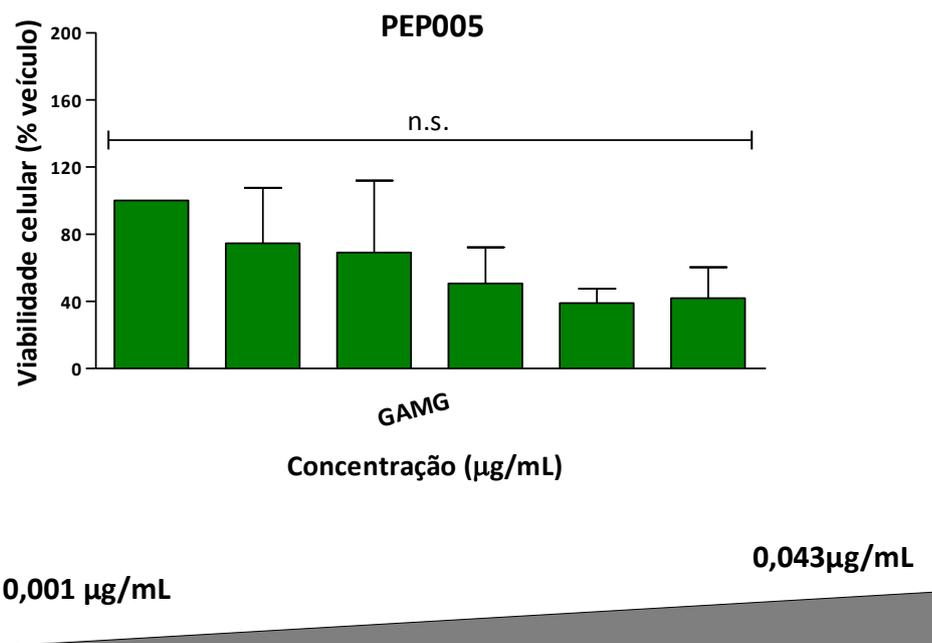


Figura 31- Efeito da concentração do PEP005 na linhagem comercial de glioma humano adulto (GAMG). A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados foram expressos por porcentagem média e desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais. Para valores de p diferentes de $p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$ foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

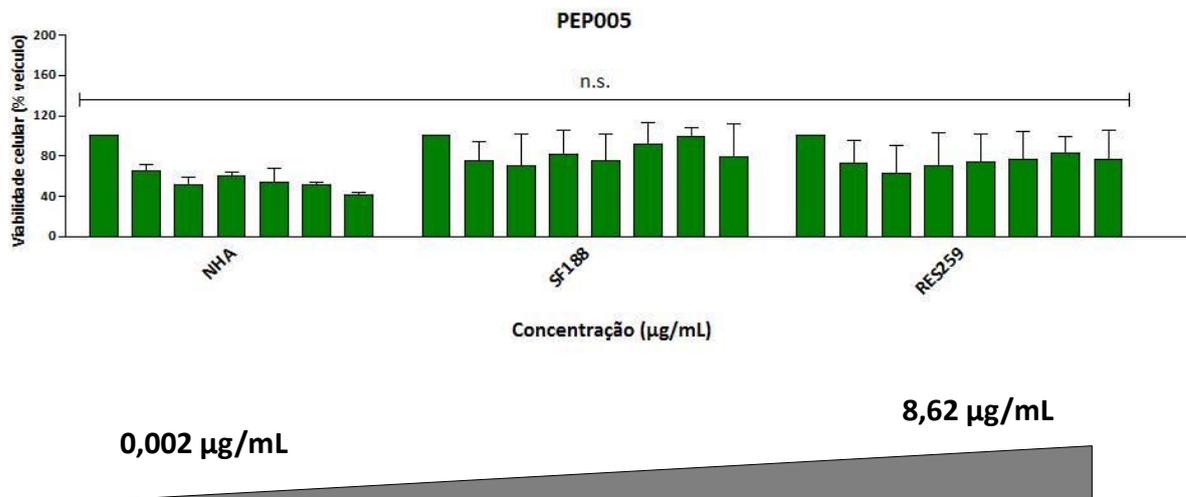


Figura 32- Efeito da concentração do PEP005 em linhagens comerciais de astrócito (NHA) e glioma humano pediátrico (SF188 e RES259). A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados foram expressos por porcentagem média e desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais. Para valores de p diferentes de $p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$ foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

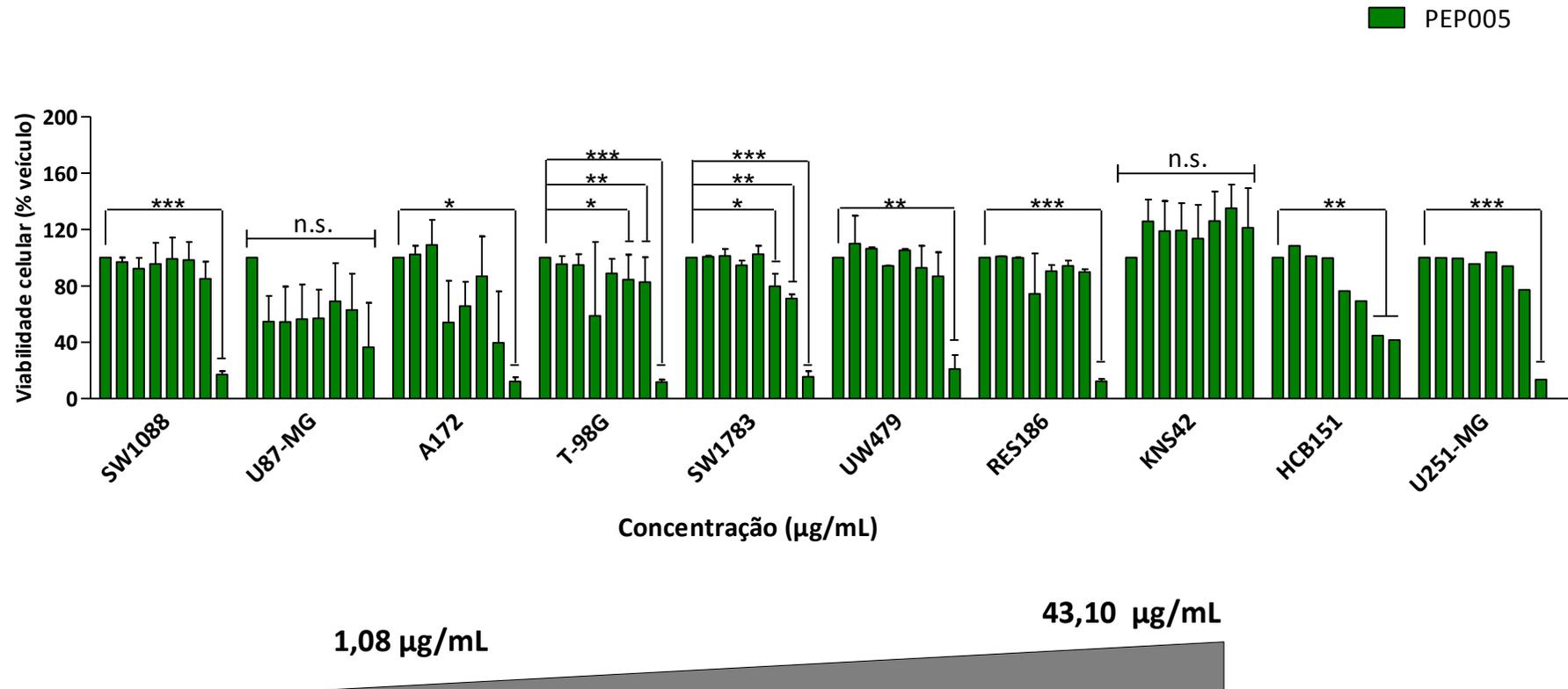


Figura 33- Efeito da concentração do PEP005 em linhagens comerciais de glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados foram expressos por porcentagem média e desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais. Para valores de p diferentes de $p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$ foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

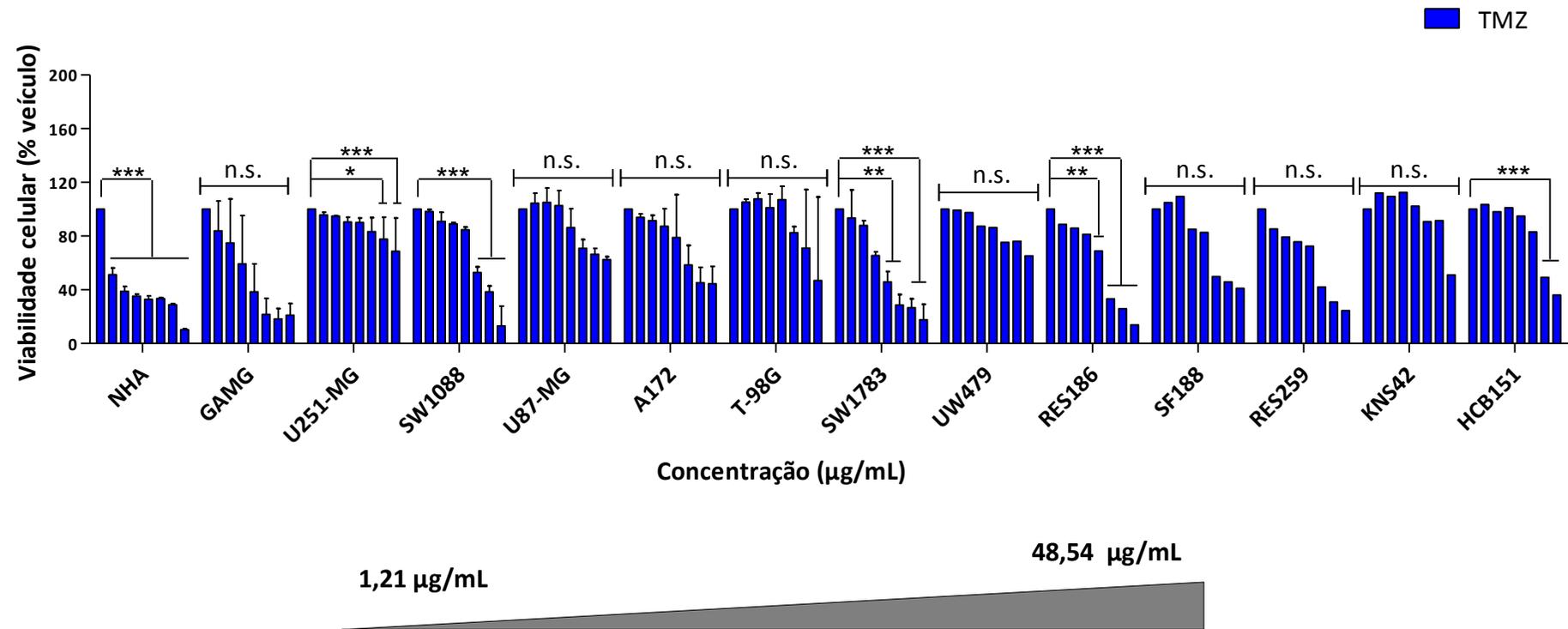


Figura 34- Efeito da concentração do quimioterápico temozolamida (TMZ) em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados foram expressos por porcentagem média e desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos (*, ** e ***) indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$, respectivamente) entre o controle e grupos experimentais. Para valores de p diferentes de $p < 0,05$, $p < 0,005$ e $p < 0,0001$ foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

A média dos valores de IC₅₀ das linhagens tumorais para o composto sintético (25,65 µg/mL) foi próxima quando comparada ao quimioterápico, TMZ (29,35 µg/mL), evidenciando um potencial citotóxico do PEP005 nessas linhagens (Figura 35 e Tabela 13).

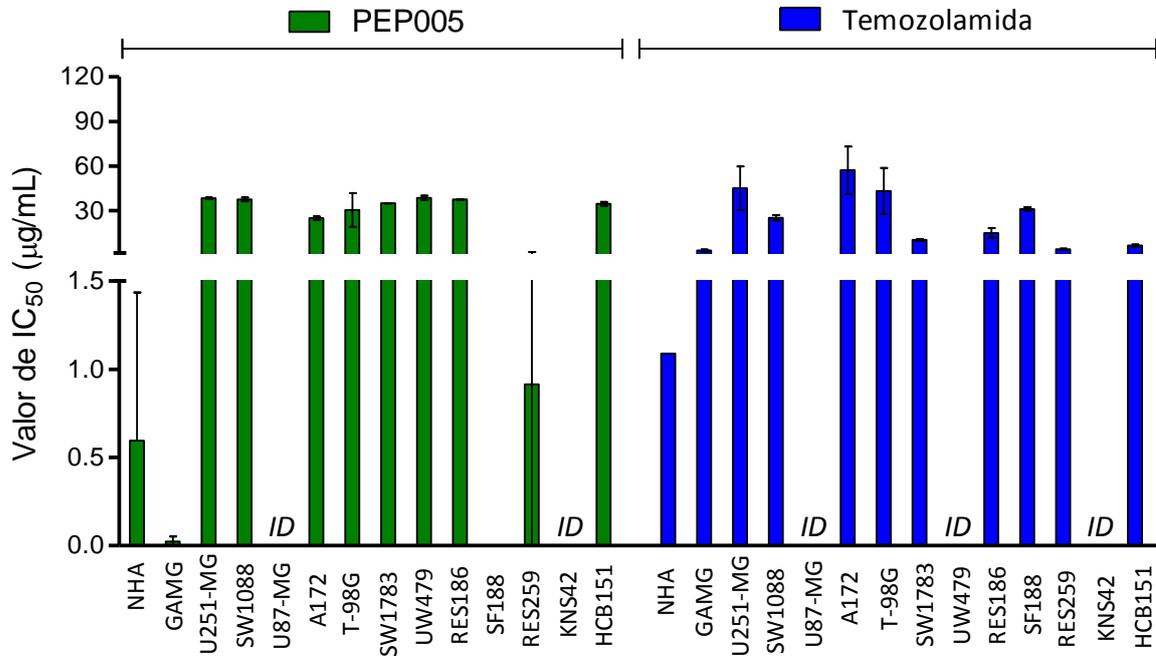


Figura 35- Comparação dos valores de IC₅₀ do composto PEP005 em relação ao quimioterápico temozolamida em linhagens comerciais de astrócito, glioma humano adulto, pediátrico e linhagem primária estabelecida de glioblastoma. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados foram expressos por porcentagem média e desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). A concentração IC₅₀ foi calculada por análise de regressão não linear utilizando o *software* Graphpad Prism. Os dados representam a média de pelo menos três ensaios independentes realizados em triplicata.

Tabela 13- Valores de IC₅₀ e desvio padrão do composto sintético e o quimioterápico TMZ para as linhagens de glioma.

Linhagens celulares	Média dos valores de IC ₅₀ (µg/mL) ± desvio padrão	
	Fármacos	
	PEP005	TMZ
NHA	1,19±19,05	1,28±26,16
GAMG	0,0074±23,30	7,06±31,84
U251-MG	36,23±30,17	39,78±23,67
SW1088	37,60±29,08	24,38±32,18
U87-MG	<i>ID</i>	<i>ID</i>
A172	22,44±34,39	34,68±22,38
T98-G	41,01±29,32	47,21±21,82
SW1783	35,47±29,67	10,32±32,91
UW479	38,26±28,76	<i>ID</i>
RES186	37,60±29,73	14,88±32,96
SF188	0,002±11,26	30,74±27,91
RES259	1,83±10,82	16,93±27,55
KNS42	<i>ID</i>	<i>ID</i>
HCB151	31,79±26,45	38,22±26,02

ID-utilizado para valores de IC₅₀ indeterminados.

Os resultados obtidos a partir dos valores de IC₅₀ das linhagens tumorais permitiram avaliar o IS do composto sintético PEP005 em relação à linhagem de astrócito normal, e também comparar os valores obtidos para o quimioterápico TMZ. Entretanto, foi evidenciado que apenas as linhagens GAMG e SF188 apresentaram uma maior seletividade para o PEP005 em relação à linhagem NHA, sendo os valores de IS de 160,8 e 595,0, respectivamente.

Tabela 14- Índice de seletividade para o composto sintético e quimioterápico TMZ.

Linhagens	Fármacos	
	PEP005	TMZ
GAMG	160,8	0,2
U251-MG	0,03	0,03
SW1088	0,03	0,1
U87-MG	ID	ID
A172	0,1	0,04
T98-G	0,03	0,03
SW1783	0,03	0,1
UW479	0,03	ID
RES186	0,03	0,1
SF188	595,0	0,04
RES259	0,7	0,08
KNS42	ID	ID
HCB151	0,04	0,03

ID-utilizado para valores indeterminados.

7.6-Efeitos do PEP005 no perfil de expressão/atividade das isoformas PKCs em linhagens de glioma

Para avaliar o perfil de expressão/atividade das isoformas PKCs, duas linhagens de glioma, uma sensível (GAMG) e outra resistente (U251-MG) de acordo com os valores de IC₅₀ do composto PEP005, foram avaliadas por 30 minutos e 1 hora^{70, 87}. Além disso, o composto sintético PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato)⁸⁷, um clássico ativador de PKCs, também foi utilizado como referência para o tratamento. Os resultados revelaram, que ambos os tratamentos modularam principalmente a expressão das isoformas das PKCs clássicas (p-PKC α/β II) e da PKD/PKC μ referente aos resíduos Ser⁹¹⁶ e Ser^{744/748} nas linhagens testadas (Figura 36). As outras isoformas avaliadas, PKCs novas (PKC δ , p-PKC δ e PKC δ/θ), atípicas (p-PKC ζ/λ e PKC ζ) e p-PKC Pan (β II Ser⁶⁶⁰), apresentaram um perfil de resposta heterogêneo nas linhagens avaliadas.

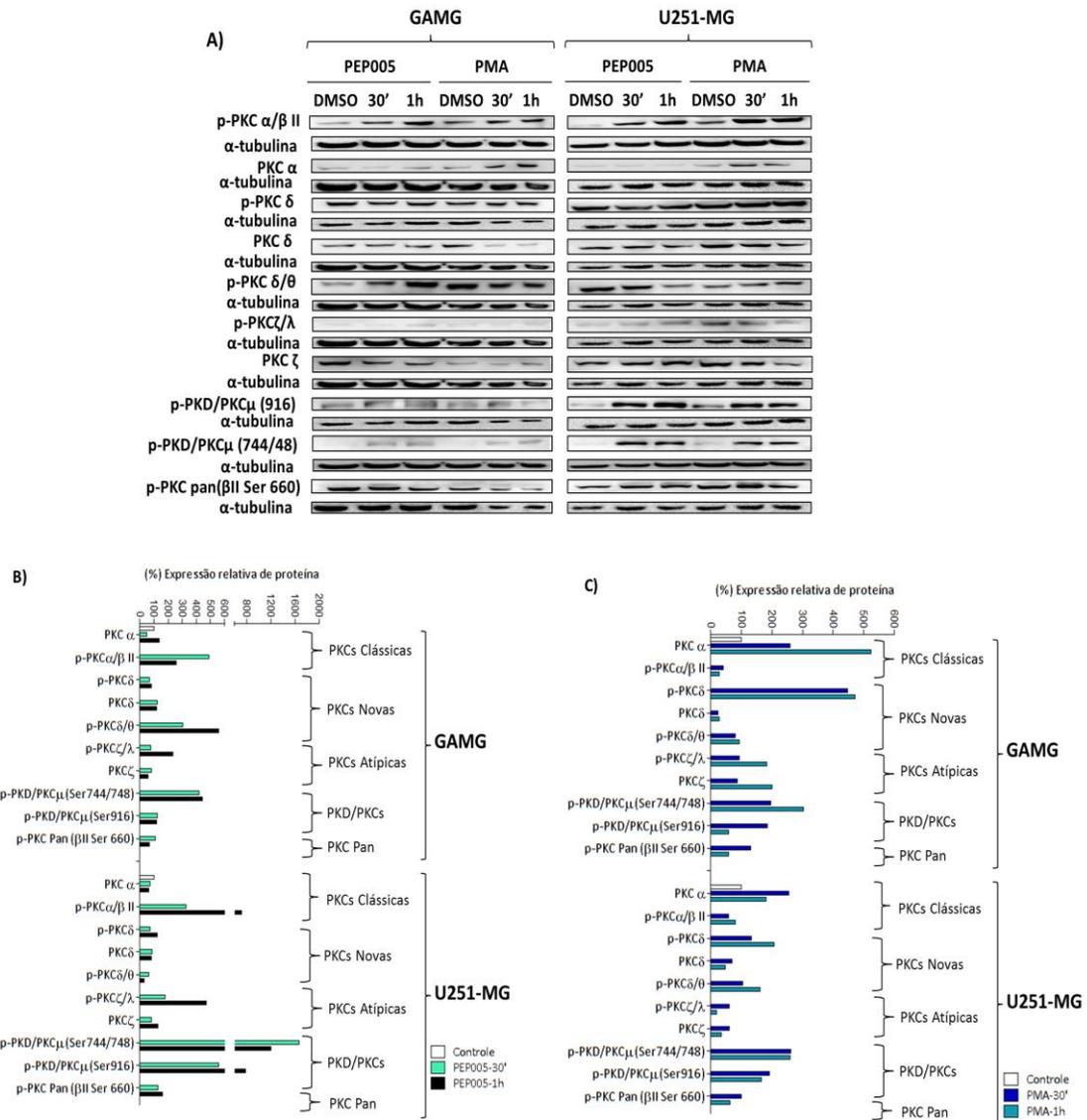


Figura 36- Efeito do PEP005 e PMA no perfil de expressão das isoformas PKC α , p-PKC α/β II, PKC δ , p-PKC δ/θ , p-PKC ζ/λ , PKC ζ , p-PKC δ , p-PKD/PKC μ (Ser744/748), p-PKD/PKC μ (Ser916), PKD/PKC μ e p-PKC Pan (β II Ser660) de linhagens comerciais de glioma adulto (GAMG e U251-MG) e pediátrico (SF188 e RES259). **A)** As linhagens RES259, U251-MG, GAMG e SF188 foram incubadas com o valor de IC₅₀ referente ao PEP005 e concentração final de 0,1 μ M para o PMA por 30 minutos e 1 hora. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). As proteínas PKC α , p-PKC α/β II, PKC δ , p-PKC δ/θ , p-PKC ζ/λ , PKC ζ , p-PKC δ , p-PKD/PKC μ (744/748), p-PKD/PKC μ (916), PKD/PKC μ e p-PKC Pan (β II Ser660) foram analisadas por *Western blot*. **B)** e **C)** Gráficos com os níveis de expressão/ atividade das isoformas das proteínas PKCs. As proteínas foram quantificadas pelo programa ImageJ.

Para avaliar se a modulação da expressão/ atividade dessas isoformas persistia após um maior tempo de exposição ao composto e se consistia em um mecanismo comum as demais linhagens de glioma, três linhagens definidas como sensíveis (RES259, GAMG e SF188) e uma como resistente (U251-MG) ao composto PEP005 foram tratadas com o composto PEP005 durante 24 horas. Os resultados revelaram que o tratamento com o PEP005 foi aparentemente similar ao perfil de expressão/atividade destas proteínas com 30 minutos e 1 hora de exposição no qual promove uma modulação na expressão das isoformas das PKCs clássicas (p-PKC α / β II e PKC α) nas linhagens de glioma adulto (GAMG, U251-MG) e pediátrico (RES259). Além do mais, o tratamento com o PEP005 revelou ainda, um aumento da atividade da isoforma PKD/PKC μ referente aos resíduos Ser⁹¹⁶ e Ser^{744/748} na maioria das linhagens de gliomas avaliadas. Apenas a linhagem RES259 apresentou ativação do resíduo Ser^{744/748} menos expressiva quando comparada ao controle (Figura 37). As demais isoformas, PKCs novas (p-PKC δ , PKC δ , PKC δ / θ , p-PKC θ e PKC ϵ), atípicas (p-PKC ζ / λ e PKC ζ) e p-PKC Pan (β II Ser⁶⁶⁰) revelaram um perfil de resposta heterogêneo nas linhagens de glioma (GAMG, U251-MG, RES259 e SF188) como evidenciado na Figura 37.

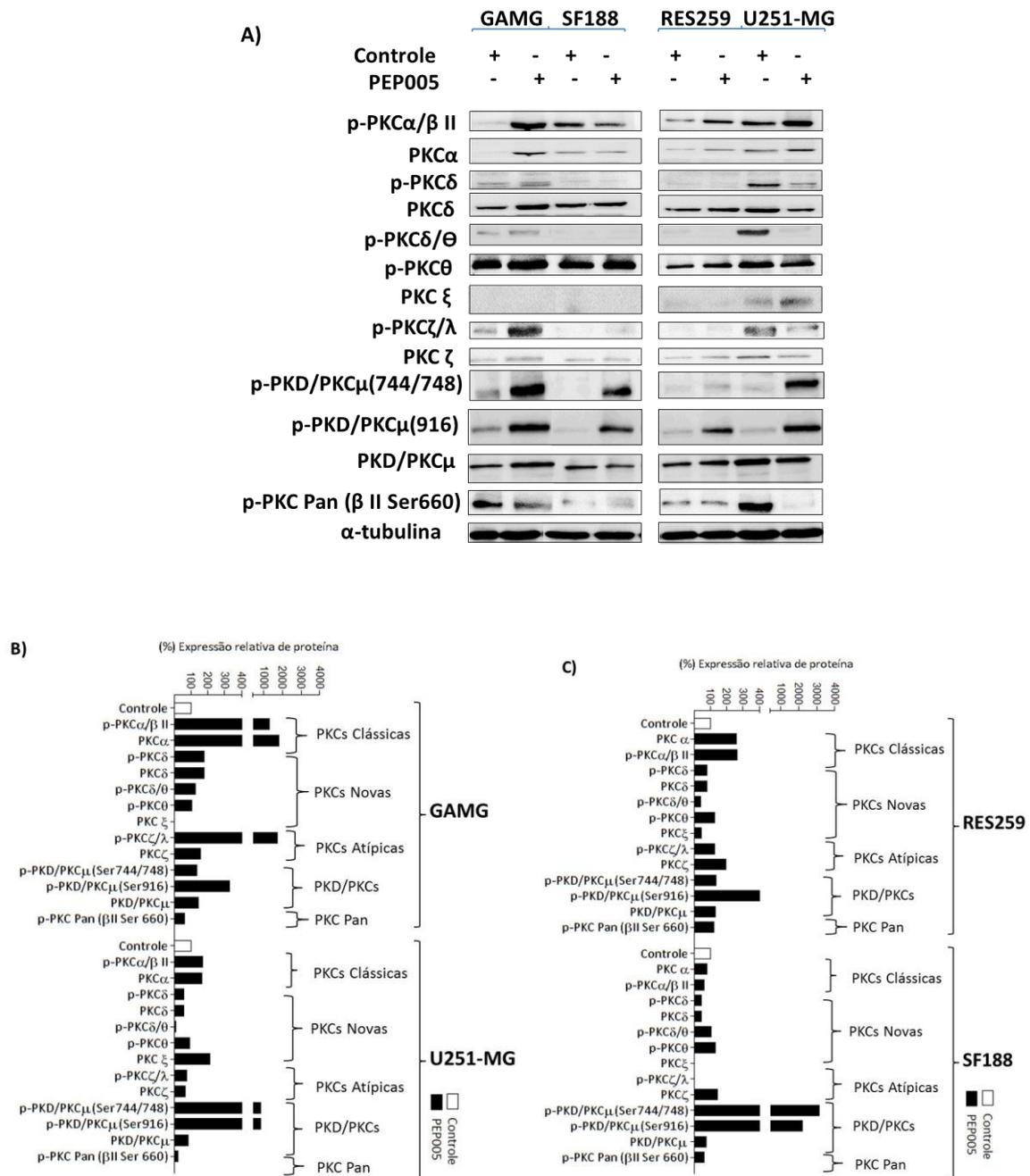


Figura 37- Efeito do PEP005 no perfil de expressão das isoformas PKC α , p-PKC α / β II, PKC δ , p-PKC δ / θ , PKC ϵ p-PKC θ , p-PKC ζ / λ , PKC ζ , p-PKC δ , p-PKD/PKC μ (916), p-PKD/PKC μ (744/748), PKD/PKC μ e p-PKC Pan (β II Ser660) de linhagens comerciais de glioma adulto (GAMG e U251-MG) e pediátrico (SF188 e RES259). **A)** As linhagens celulares RES259, U251-MG, GAMG e SF188 foram incubadas com o valor de IC₅₀ referente ao PEP005 por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). As isoformas das proteínas PKCs foram analisadas por *Western blot*. **B)** e **C)** Gráficos com os níveis de expressão das isoformas das proteínas PKCs. As proteínas foram quantificadas pelo programa ImageJ.

7.7- Efeito dos compostos, PEP005 e PMA, na ativação de proteínas PKCs por translocação celular em linhagem de glioma

A ativação das proteínas PKCs pode também ser observada através do processo de translocação celular⁸⁷. Dessa forma, o efeito dos compostos, PEP005 e PMA, foi avaliado na modulação da ativação da proteína PKC α após 1 hora de tratamento. Para isso, foi utilizada a linhagem de glioma adulto, U251-MG, que apresenta resistência ao tratamento com o PEP005, de acordo com o valor de IC₅₀ apresentado. Além disso, foram utilizados como controles internos de marcação das frações celulares as proteínas, TRADD, laminina e GLUT-1, marcadores citoplasmático, nuclear e de membrana, respectivamente. As imagens são representativas de dois experimentos.

Os resultados apresentados na Figura 38 revelam que ambos os tratamentos após 1 hora de exposição, promovem a ativação da proteína PKC α através de sua translocação do citoplasma para a membrana celular evidenciando que além de modular a expressão dessa isoforma como verificado nas figuras 36 e 37, também alteram a sua atividade.

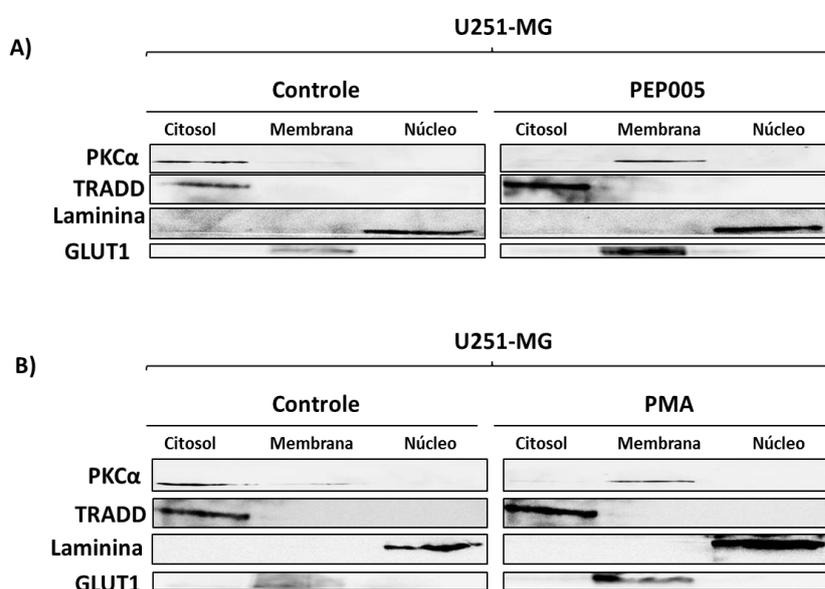


Figura 38- Efeito dos compostos, PEP005 e PMA, na indução da ativação de PKC α por translocação do citosol para a membrana celular. As células foram tratadas com o valor de IC₅₀ referente ao PEP005 e uma concentração final de 0,1 μ M para o PMA por 1 hora. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). **A)** e **B)** As imagens mostram a ativação da PKC α e são representativas de um único experimento.

7.8- Efeito do composto PEP005 na ativação/inibição de vias de sinalização intracelular em linhagens de glioma

Neste trabalho foi avaliado ainda, o efeito do PEP005 nas vias de proliferação e sobrevivência celular em linhagens de glioma após 24 horas de tratamento. Os resultados preliminares revelaram um aumento na atividade da proteína ERK para as linhagens sensíveis ao tratamento (GAMG, SF188 e RES259) (Figura 39). Entretanto, o tratamento com o composto PEP005 aparentemente, não modulou a atividade de AKT nas linhagens avaliadas (Figura 39).

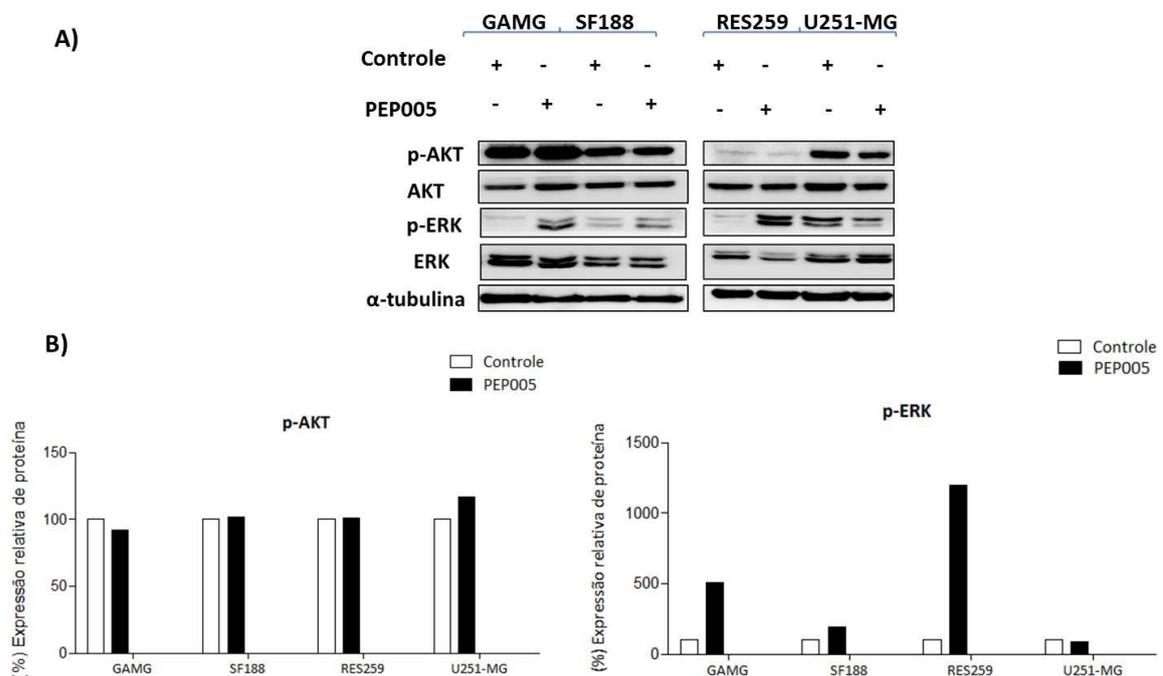


Figura 39- Efeito do composto PEP005 na modulação da expressão das proteínas, ERK e AKT, nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares RES259, U251-MG, GAMG e SF188 foram incubadas com o valor de IC_{50} referente ao PEP005 por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). As proteínas ERK e AKT foram analisadas por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis de expressão da atividade das proteínas ERK e AKT. As proteínas foram quantificadas pelo programa ImageJ. Os gráficos são representativos de um único experimento.

A exposição ao composto PEP005 também não promoveu clivagem da proteína caspase-3, um importante indicador de morte celular, nas linhagens avaliadas (Figura 40).

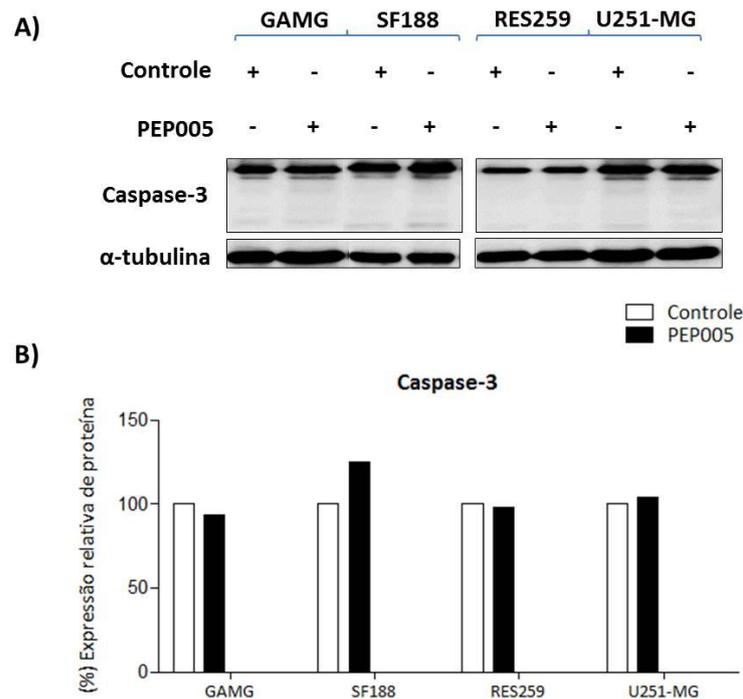


Figura 40- Efeito do composto PEP005 na clivagem da proteína caspase-3 nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares RES259, U251-MG, GAMG e SF188 foram incubadas com o valor de IC_{50} referente ao PEP005 por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). A proteína caspase-3 clivada foi analisada por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis de expressão da atividade da proteína caspase-3. As proteínas foram quantificadas pelo programa ImageJ. Os gráficos são representativos de um único experimento.

Analisou-se também se o tratamento com o composto PEP005 poderia promover o dano no DNA revelado pelo aumento do nível da fosforilação da proteína H2AX. Os resultados revelaram um aumento da atividade da proteína H2AX apenas nas linhagens de glioma adulto (GAMG e U251-MG) como observado na Figura 41.

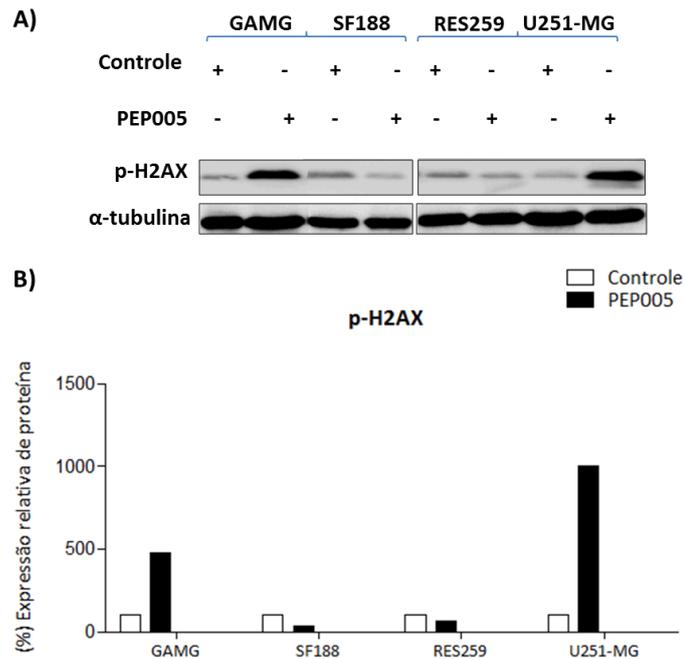


Figura 41- Efeito do composto PEP005 na expressão da proteína H2AX nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares RES259, U251-MG, GAMG e SF188 foram incubadas com o valor de IC_{50} referente ao PEP005 por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). A proteína H2AX fosforilada foi analisada por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis de expressão da atividade da proteína H2AX. As proteínas foram quantificadas pelo programa ImageJ. Os gráficos são representativos de um único experimento.

O efeito do composto PEP005 no ciclo celular foi avaliado pela análise da expressão das proteínas reguladoras, p21 e p27. O tratamento com o composto PEP005 promoveu aumento da expressão da proteína p21 nas linhagens de glioma adulto (GAMG e U251-MG). Entretanto, para as linhagens pediátricas (SF188 e RES259) a exposição ao tratamento não alterou a expressão na linhagem SF188 e promoveu uma diminuição da expressão dessa proteína na linhagem RES259 (Figura 42). Com relação à proteína p27, as linhagens GAMG e SF188 exibiram um aumento no nível de sua expressão, enquanto nas linhagens RES259 e U251-MG, foi observada uma diminuição após o tratamento com o PEP005, como mostra a Figura 42.

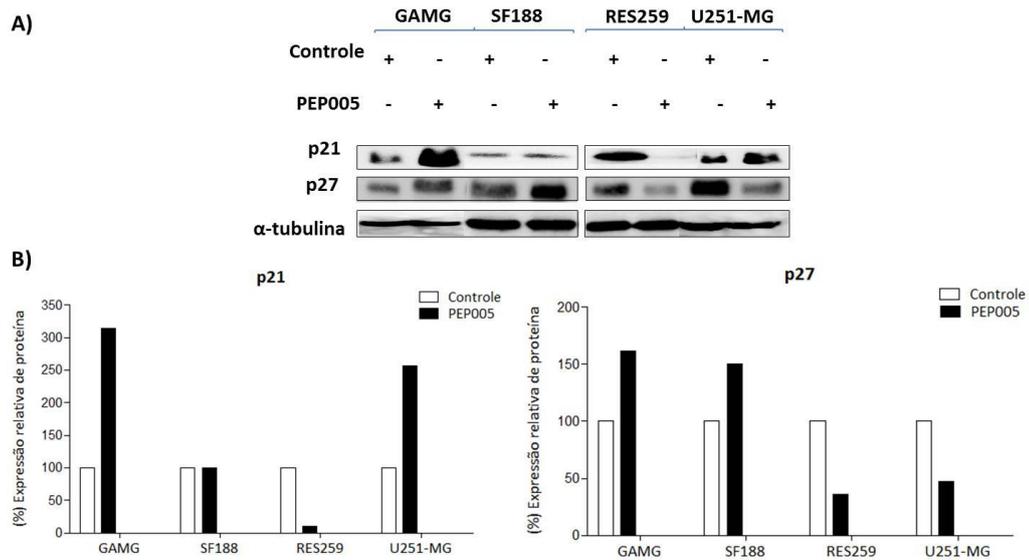


Figura 42- Efeito do composto PEP005 na expressão de p21 e p27 nas linhagens comerciais de glioma. **A)** As linhagens celulares RES259, U251-MG, GAMG e SF188 foram incubadas com o valor de IC₅₀ referente ao PEP005 por 24 horas. Os controles foram tratados apenas com DMSO (1%). A expressão das proteínas p21 e p27 foram analisadas por *Western blot*. **B)** Gráfico com os níveis de expressão da atividade das proteínas p21 e p27. As proteínas foram quantificadas pelo programa ImageJ. Os gráficos são representativos de um único experimento.

Os resultados obtidos até o momento são preliminares e referentes a um único experimento, sendo importante a realização de mais uma duplicata experimental para consolidação dos dados obtidos.

7.9- Caracterização biológica do composto sintético PEP005

7.9.1- Ensaio de ciclo celular

O tratamento com o PEP005 foi avaliado na distribuição do ciclo celular em 2 linhagens de glioma (GAMG e U251-MG) após 24 horas de tratamento. As linhagens foram tratadas com os seus respectivos valores de IC₅₀ para o composto PEP005 e com o quioterápico de referência, TMZ. O efeito dos tratamentos na distribuição do ciclo celular foi determinado através de citometria de fluxo. Os resultados obtidos evidenciam que o tratamento com o PEP005 não promoveu alterações na distribuição do ciclo celular durante o período avaliado para as linhagens GAMG e U251-MG (Figura 43 e 44 e Tabela 15 e 16).

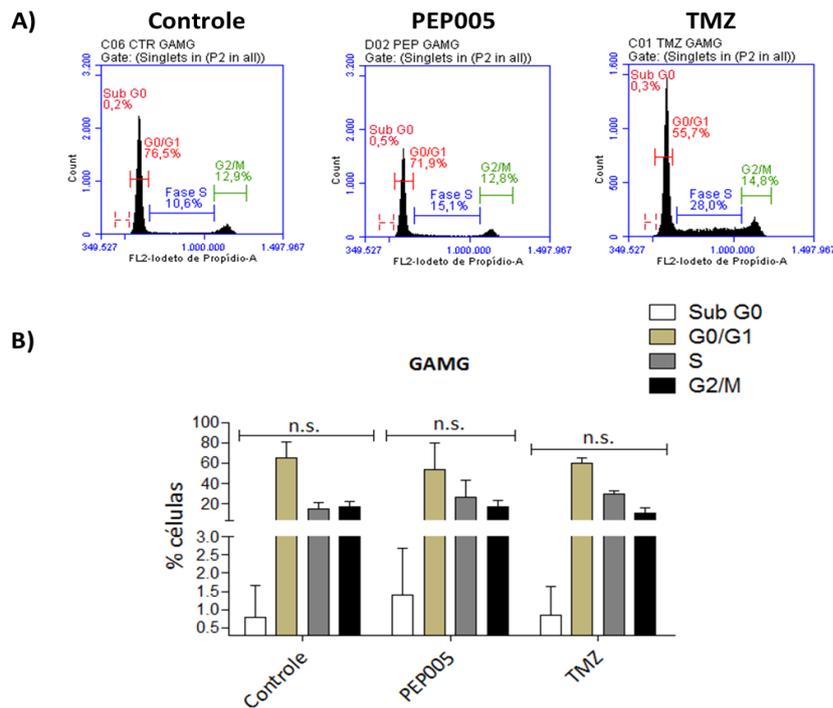


Figura 43- Efeito do composto PEP005 e do quimioterápico TMZ na distribuição do ciclo celular em linhagem comercial de glioma humano adulto (GAMG). **A)** A linhagem GAMG foi incubada com o valor de IC_{50} para o PEP005 e $100\mu M$ do quimioterápico TMZ por 24 horas. As células foram fixadas, marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. **B)** Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata e evidenciam a porcentagem de células \pm desvio padrão nas fases Sub G0, G0/G1, S e G2/M. Para valores de p diferentes de 0,05 foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

Tabela 15- Média da porcentagem de células e desvio padrão para a linhagem de glioma (GAMG) tratada com o PEP005 e o quimioterápico TMZ.

Média da porcentagem de células \pm desvio padrão				
Fases do ciclo celular		Controle	PEP005	TMZ
GAMG	G0/G1	65,4 \pm 15,70	53,55 \pm 25,95	59,48 \pm 5,37
	S	15,1 \pm 6,36	26,6 \pm 16,26	20,85 \pm 2,61
	G2/M	16,6 \pm 5,23	17,15 \pm 6,15	16,88 \pm 5,16
	Sub G0	0,8 \pm 0,84	1,4 \pm 1,27	1,10 \pm 0,77

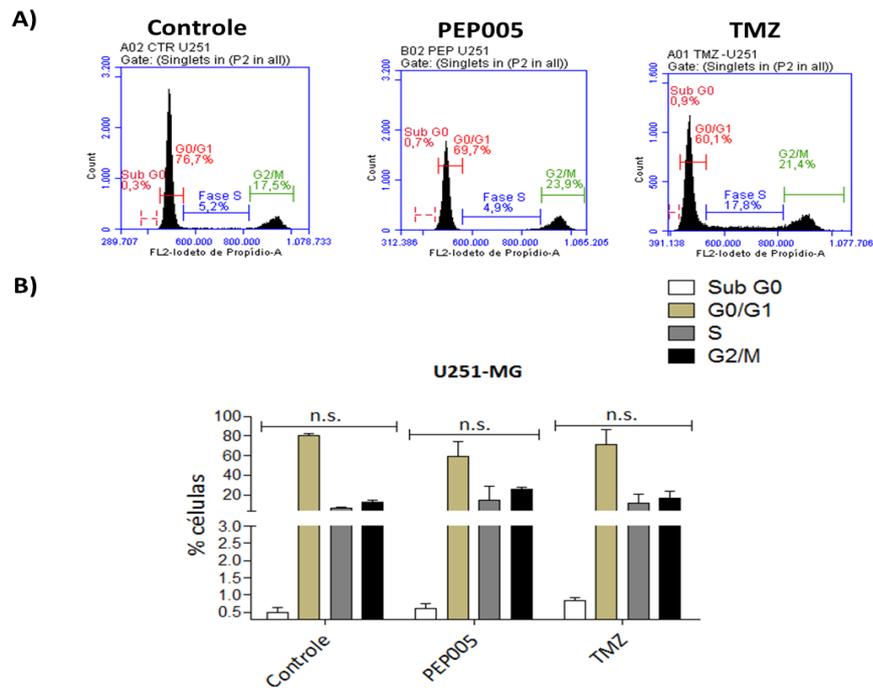


Figura 44- Efeito do composto PEP005 e do quimioterápico TMZ na distribuição do ciclo celular na linhagem comercial de glioma humano adulto (U251-MG). **A)** A linhagem U251-MG foi incubada com os valores de IC₅₀ do PEP005 e do quimioterápico TMZ por 24 horas. As células foram fixadas, marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. **B)** Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata e evidenciam a porcentagem de células \pm desvio padrão nas fases Sub G0, G0/G1, S e G2/M. Para valores de p diferentes de 0,05 foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

Tabela 16- Média da porcentagem de células e desvio padrão para a linhagem de glioma (U251-MG) tratada com o PEP005 e o quimioterápico TMZ.

Média da porcentagem de células \pm desvio padrão				
U251-MG	Fases do ciclo celular	Controle	PEP005	TMZ
		G0/G1	80,70 \pm 1,69	58,7 \pm 15,56
	S	6,45 \pm 0,91	14,95 \pm 14,21	11,70 \pm 8,62
	G2/M	12,10 \pm 2,54	25,60 \pm 2,40	16,30 \pm 7,21
	Sub G0	0,50 \pm 0,14	0,60 \pm 0,14	0,85 \pm 0,07

7.9.2- Ensaio de migração celular (*transwell*)

O efeito do composto PEP005 foi avaliado também no mecanismo de migração celular para as linhagens celulares (GAMG e U251-MG), após 24 horas de tratamento. As linhagens foram tratadas com o composto a partir dos respectivos valores de IC_{50} . Os resultados revelaram que o tratamento não foi capaz de inibir significativamente o processo de migração celular, durante o período avaliado nas linhagens de glioma testadas (Figura 45).

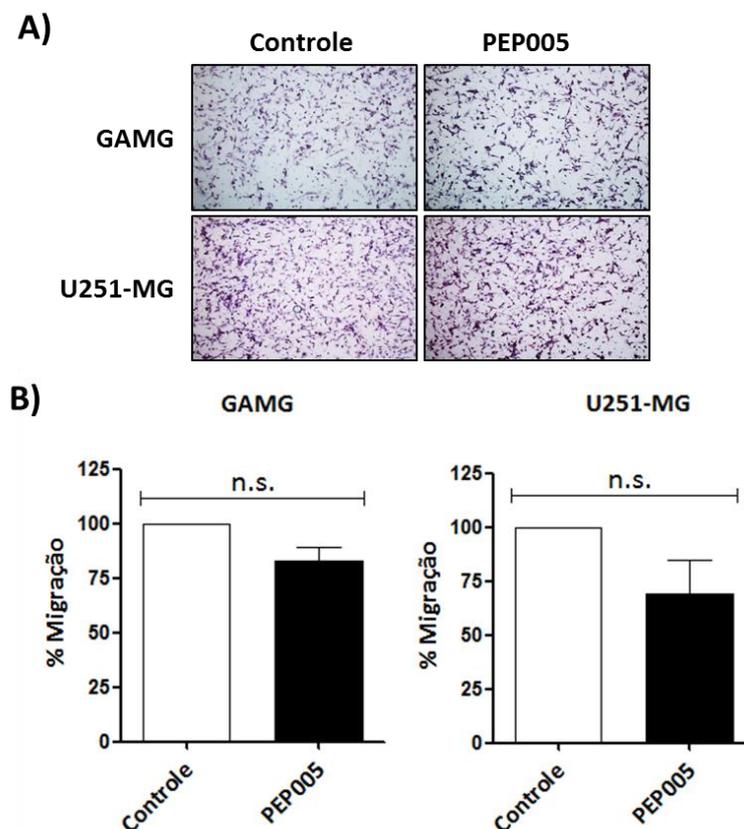


Figura 45- Efeito do composto PEP005 na migração celular em linhagens celulares de glioma GAMG e U251-MG. As linhagens foram plaqueadas em meio isento de soro e tratadas com os respectivos valores de IC_{50} em cada inserto (*transwell*). A quantidade de células foi determinada após 24 horas de tratamento e expressa pela porcentagem de migração de cada membrana tratada em relação ao controle (DMSO). **A)** Figuras representativas do ensaio de migração celular para as células tratadas e controle (DMSO) e **B)** gráficos representando a porcentagem de migração celular. Os ensaios são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. Para valores de p diferentes de 0,05 foi utilizada a sigla n.s. (não significativo).

7.9.3-Ensaio de invasão celular (*transwell*)

O processo de invasão celular também foi investigado durante a exposição com o composto PEP005 nas linhagens de glioma GAMG e U251-MG. As células foram tratadas com os respectivos valores de IC_{50} , por um período de 24 horas. A Figura 46 mostra que o tratamento com o PEP005 não foi capaz de inibir a invasão celular de maneira significativamente estatística nas linhagens avaliadas.

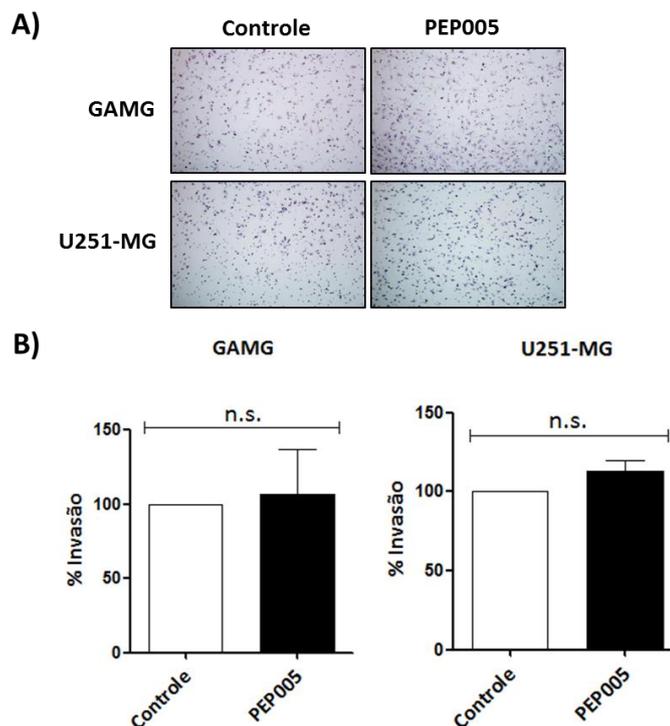


Figura 46- Efeito do composto PEP005 na invasão celular em linhagens celulares de glioma GAMG e U251-MG. As linhagens foram plaqueadas em meio isento de soro e tratadas com os respectivos valores de IC_{50} em cada inserto contendo matrigel. A quantidade de células foi determinada após 24 horas de tratamento e expressa pela porcentagem de invasão de cada membrana tratada em relação ao controle (DMSO). **A)** Figuras representativas do ensaio de migração celular para as células tratadas e controle (DMSO) e **B)** gráficos representando a porcentagem de invasão celular. Os ensaios são representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. Para valores de p diferentes de 0,05 foi utilizada a sigla n.s. (nãõ significativo).

8- DISCUSSÃO

8.1-Extratos e partições

Neste trabalho foi realizado um *screening* em linhagens de glioma humano para avaliar o potencial citotóxico de extratos brutos e partições de diversas plantas encontradas na flora Brasileira. Estes experimentos foram realizados a partir dos ensaios de MTS, uma técnica muito empregada para a análise da citotoxicidade celular promovida pelo tratamento com compostos/fármacos em linhagens celulares⁸⁹.

Inicialmente, 13 extratos brutos foram avaliados em 5 linhagens comerciais, sendo 2 de glioma adulto (GAMG e U251-MG), 2 de glioma pediátrico (SF188 e RES259) e 1 linhagem de astrócito normal humano (NHA), além de 1 linhagem primária de glioblastoma (HCB151) previamente estabelecida pelo grupo. Entre os extratos analisados, 3 extratos (17, 18 e 19) apresentaram maior potencial citotóxico e um efeito dose-dependente, sendo o valor da média de IC₅₀ das linhagens de 25,54, 36,27 e 35,59µg/mL, respectivamente. De acordo com critérios do NCI, valores de IC₅₀ <30µg/mL devem ser adotados para que extratos brutos sejam avaliados como promissores e sejam conduzidos para futuros ensaios de purificação⁸⁶. Além disso, neste estudo foi realizada ainda uma análise comparativa entre a média dos valores de IC₅₀ das linhagens tumorais dos extratos brutos avaliados em relação ao quimioterápico padrão Temozolamida (TMZ). Os resultados mostraram que a TMZ apresentou uma IC₅₀ média para as linhagens tumorais de 26,54 µg/mL, sendo esta média próxima aos valores encontrados para os 3 extratos selecionados (17, 18 e 19). É importante salientar que a citotoxicidade dos extratos brutos 17, 18 e 19, foi bem menor com a linhagem de astrócito normal quando comparada a do quimioterápico TMZ, de acordo com os valores de IC₅₀ encontrados. Além disso, através da análise do índice de seletividade (IS) foi possível verificar que uma das linhagens mais sensíveis aos 13 extratos avaliados neste estudo, GAMG, apresentou um IS de 5,4, ou seja, o extrato 8 mostrou ser 5 vezes mais ativo na linhagem tumoral em relação à linhagem de astrócito normal. Para os demais extratos avaliados/quimioterápico (TMZ), o índice de seletividade foi menor que 2,0, sendo assim não foram seletivos em relação ao astrócito normal, uma vez que adotou-se critérios do NCI que consideram um valor de IS significativo maior ou igual a 2,0⁸⁶.

A atividade citotóxica encontrada no presente estudo está de acordo com os achados da literatura uma vez que, os extratos brutos, 17, 18 e 19, pertencem à família *Melastomataceae* que é constituída por importantes compostos secundários cuja utilização na medicina popular tem sido vista como analgésicos, anti-inflamatórios, e até mesmo, como antineoplásicos^{57, 58, 62}. Estas classes de compostos secundários contemplam fenólicos simples, terpenóides, quinonas, lignanas e seus glicosídeos, além de inúmeros taninos ou polifenóis, alguns flavonóides e antocianinas⁹⁰. A planta *Miconia albicans* da qual foi obtido o extrato bruto 18, se destaca por suas ações anti-inflamatórias, antimicrobiais, antiparasitárias, assim como efeitos citotóxicos em algumas neoplasias malignas como já evidenciado^{57, 58}. Em estudo realizado com *Miconia albicans* (Sw.) Triana efeitos analgésicos dos extratos brutos (hexano, cloreto de metileno e hidroalcoólico) presentes nas folhas também foram descritos⁶². Contudo, apesar dos achados da literatura sobre o potencial citotóxico de algumas miconias no tratamento de doenças, até o momento, o papel de *Miconia cuspidata* Naudin (extrato 17) e *Miconia chamissois* Naudin (extrato 19) não foi descrito para o tratamento de doenças e tumores.

Neste contexto, selecionamos os três extratos brutos 17, 18 e 19 com maior potencial citotóxico, para dar continuidade aos estudos de caracterização biológica e avaliação de vias de sinalização relacionadas à carcinogênese. Inicialmente, foram avaliadas vias relacionadas à sobrevivência e proliferação celular a partir de importantes proteínas, AKT e ERK. Nossos ensaios indicaram um perfil de resposta heterogêneo em relação a expressão/atividade dessas proteínas nas linhagens de glioma avaliadas. A proteína AKT é um membro da família das serina/treonina quinases, possui um papel fundamental na sobrevivência celular e quando ativada permite a inativação de fatores pró-apoptóticos⁹¹. A proteína AKT tem se mostrado importante nas vias de proliferação celular, principalmente porque sua forma fosforilada, p-AKT (Ser⁴⁷³), tem sido encontrada em 85% dos glioblastomas^{92, 93}. Além disso, a ativação de ERK e *down*-regulação de AKT foi vista em células de glioblastoma (U87), após o tratamento com o extrato de *Hedyotis diffusa Willd* (HDW), mostrando o envolvimento das vias RAS/MAPK e PI3K/AKT na supressão do crescimento tumoral e também na apoptose através deste extrato⁹⁴. Entretanto, os resultados preliminares deste trabalho não mostraram alterações evidentes na proteína AKT após a exposição aos extratos brutos 17, 18

e 19 em linhagens de glioma indicando que no tempo avaliado, talvez esta via não participe do mecanismo de ação desses extratos.

A proteína ERK, quinase regulada por sinais extracelulares, possui duas isoformas ERK1/ERK2, que compõem a família das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) e quando são ativadas podem mediar os mecanismos de proliferação e apoptose celular^{91, 95, 96}. Estudos mostraram que a ativação contínua de ERK por compostos naturais em células de câncer gástrico foi associada com um efeito antiproliferativo⁹⁷. Em nosso estudo, um aumento na regulação da atividade da proteína ERK foi evidenciada apenas para o extrato 17 na linhagem de glioma RES259, sugerindo o envolvimento desta proteína como mecanismo de ação deste extrato, no entanto, este mecanismo parece não ser comum a todas as linhagens de glioma.

Segundo a literatura, danos no DNA e o estresse celular nas células parecem estar relacionadas com perturbações na sobrevivência e a ativação de diferentes vias pró-apoptóticas^{98, 99}. A fosforilação de H2AX (γ H2AX) é um sinal precoce de danos ao DNA induzidos por estagnação da replicação para que os danos sejam reparados dentro da célula ou para que esta entre em apoptose⁹⁸. Muitos compostos naturais promovem como mecanismo de ação danos no DNA com indução de H2AX¹⁰⁰⁻¹⁰². Dessa forma, avaliamos o perfil da ativação de H2AX^{98, 99}. Nossos resultados demonstraram que os tratamentos aumentaram expressivamente a fosforilação de H2AX nas linhagens GAMG e SF188, mais sensíveis aos extratos. No entanto, para as linhagens resistentes (RES259 e U251-MG), houve uma diminuição de H2AX. Assim, pode-se inferir que os extratos foram citotóxicos e capazes de induzir dano ao DNA apenas nas linhagens de glioma sensíveis aos mesmos.

O efeito de compostos naturais em proteínas reguladoras do ciclo celular também tem sido amplamente estudado. Estudos apontam que o aumento da expressão proteína reguladora p27/kip1 induz a apoptose em células de glioblastoma, mostrando que o p27 pode estar relacionado a vias de regulação da apoptose¹⁰³. Estudos realizados com uma terapia eficaz para gliomas, o GLA (ácido gama linolênico) mostraram que houve um aumento da expressão da proteína p27¹⁰⁴. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram um aumento da expressão de p27 apenas na linhagem de glioma RES259 quando tratada com todos os extratos testados. Entretanto, nas outras linhagens testadas (GAMG, SF188 e U251-MG) não foram observadas estas alterações.

Agentes antineoplásicos podem alterar e regular além de vias de sinalização importantes na carcinogênese, processos como a migração celular. Inúmeros fatores, dentre eles, a degradação da matriz extracelular, a transição epitélio-mesênquima, angiogênese tumoral, desenvolvimento de microambiente inflamatório e defeitos na morte celular programada podem acarretar a progressão deste mecanismo^{37,105}.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) também desempenham um fundamental papel no processo de homeostase durante o desenvolvimento celular e estão associadas à degradação da matriz extracelular, principalmente as metaloproteinases MMP9/2. Sendo assim, a desregulação destas proteínas e a degradação da matriz extracelular causada pelas metaloproteinases podem ocasionar angiogênese e outras injúrias, inclusive contribuir para o processo de metastização do câncer¹⁰⁶⁻¹¹⁰. O processo de migração celular pode ser mimetizado através do ensaio de cicatrização de ferida, *wound healing*, o qual é caracterizado pela retomada das células no local onde foi realizada a ranhura. Dessa maneira, inicialmente o perfil de migração celular foi avaliado através de ensaio de *wound healing*, em linhagens de glioma após o tratamento com os extratos brutos 17 e 18. Os resultados obtidos pelo presente estudo sugerem que os extratos promoveram uma atenuação na migração celular ao longo do tempo apenas na linhagem U251-MG quando comparado ao controle, sem provocar alterações na morfologia celular, enquanto que para as linhagens RES259 e GAMG, os resultados são inconclusivos.

Os resultados das vias de sinalização e do processo de migração obtidos até o momento são preliminares, mas sugerem importantes vias de sinalização associadas ao dano no DNA, proliferação e regulação do ciclo celular assim como migração celular como mecanismos de ação dos extratos 17, 18 e 19. Novos ensaios deverão ser conduzidos para elucidar os principais mecanismos de ação destes extratos. Uma melhor eficácia no estudo de compostos naturais e ou efeito de agentes antineoplásicos tem sido obtido a partir do particionamento e consequente fracionamento do extrato bruto para obter componentes mais puros e responsáveis pela bioatividade do mesmo⁷⁹. Assim, estudos conduzidos em parceria com a UFSJ e a Prof^a. Dr^a. Rosy I. M. A. Ribeiro permitiram o particionamento do extrato 19 em diferentes solventes originando as partições: hidroalcolica (A), hexânica (B), clorofórmica (C) e Aceto-etílica (D)).

Os estudos de citotoxicidade celular indicaram que as partições exibiram um efeito citotóxico dose-dependente sendo que a partição clorofórmica (C) apresentou maior potencial citotóxico quando comparada ao extrato bruto e as demais partições nas linhagens de glioma. Uma melhor caracterização quanto ao tempo de exposição necessário para atividade citotóxica também foi realizada nas linhagens tumorais a partir de uma cinética de viabilidade celular nos períodos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas. O extrato bruto 19, assim como as partições exibiram um perfil de resposta citotóxica dose e tempo dependente a partir de 24 horas de exposição, indicando uma citotoxicidade prévia para estes tratamentos. Estudos realizados com extratos naturais derivados de outras plantas no tratamento de células tumorais de cólon humano e glioma, também têm demonstrado efeitos citotóxicos e antiproliferativos a partir de 24 horas de tratamento^{94, 111-113}. A comparação dos valores de IC₅₀ obtidos como a cinética de viabilidade celular revelou que a partição C foi a que apresentou maior citotoxicidade quando comparada ao extrato bruto e as partições B e D ao longo da cinética, confirmando os resultados anteriores. Os estudos fitoquímicos realizados pela equipe da UFSJ mostraram que a partição C com exceção dos esteróides e triterpenos, mostrou a presença alcalóides e saponinas encontrados também no extrato bruto enquanto as demais partições, não possuem 2 ou 3 compostos secundários presentes no extrato bruto. Destacam-se as saponinas como a classe presente apenas na partição C, quando comparada às demais partições B e D, que possui efeito citotóxico nas linhagens de glioma. As saponinas são metabólitos secundários de origem glicosídica muito presente em plantas, e exercem inúmeras funções farmacológicas, incluindo: ação anti-inflamatória, vasoprotetora, hipocolesterolêmica, imonomoduladora, expectorante, moluscicida, antifúngica, antiparasitária, entre outras¹¹⁴. O seu uso ainda tem sido reportado na medicina, indústria alimentícia e cosmética, aplicação em vacinas e hormônios esteróides¹¹⁴. Esta classe de compostos vem sendo amplamente estudada em relação ao seu efeito antitumoral¹¹⁴. Seu estudo em glioma já foi reportado por Tian, *et al.*¹¹⁵ que demonstrou que saponinas triterpenóides derivadas de *Ardisia crispa* na linhagem U251-MG promovia significativa citotoxicidade e não afetou astrócitos primários humanos¹¹⁵. Ressalta-se ainda, que o efeito promovido pode ser muitas vezes decorrente da ação sinérgica entre os compostos secundários¹¹⁶. Estudos conduzidos em parceria com o Prof. Dr. Wanderson Romão da Universidade Federal do Espírito Santo e sua equipe permitiram avaliar através da

técnica de RMN, as principais moléculas encontradas tanto nas partições (B, C e D) quanto no extrato 19, as quais foram confirmadas por similaridade em banco de dados. Estudos futuros possibilitarão uma melhor compreensão sobre a atividade e os possíveis mecanismos de ação deste extrato e suas partições.

Neste estudo foi realizado também uma comparação entre a média dos valores de IC₅₀ das linhagens tumorais para os tratamentos com o extrato 19, suas partições e o quimioterápico Temozolamida (TMZ). Os resultados revelaram médias de IC₅₀ de 35,59, 23,47, 19,79 e 41,66 µg/mL, para o extrato e as partições (B, C e D) respectivamente, sendo estes valores muito próximos à média do quimioterápico 26,54 µg/mL. Entretanto, quando correlacionamos os valores de IC₅₀ obtidos para o extrato bruto 19 às suas partições e também para o quimioterápico TMZ, os resultados obtidos revelaram não ser estatisticamente significantes. Ressalta-se ainda que, a citotoxicidade promovida pelo quimioterápico com astrócito normal foi bem maior do que aquela observada para o extrato bruto e suas partições como evidenciado pelos valores de IC₅₀. Estes achados preliminares são promissores e demonstram principalmente, o potencial antineoplásico da partição clorofórmica. A análise do índice de seletividade também foi realizada para as partições, e os resultados observados evidenciaram que entre as partições avaliadas, houve seletividade apenas para a partição D, que mostrou ser 12,1 mais seletiva para a linhagem GAMG quando comparada à linhagem de astrócito normal. Porém, não foi verificado este mesmo perfil de seletividade para as demais partições, sendo os valores de IS encontrados abaixo de 2,0⁸⁶.

Como mencionado anteriormente, embora não tenha sido um mecanismo comum a todas as linhagens, assim como os demais extratos, o tratamento com o extrato bruto 19 revelou uma importante modulação em proteínas associadas ao dano no DNA e regulação do ciclo celular nas linhagens de glioma. Uma das principais características dos gliomas é a elevada heterogeneidade intratumoral^{117, 118}. Sabe-se que estes tumores podem ser constituídos por mais de um subtipo tumoral dentro do mesmo tumor e conter diferentes origens a nível celular. Dessa forma, estes fatores podem influenciar a agressividade destes tumores e a resposta às terapias¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Para melhor caracterizá-lo quanto à classe de compostos secundários responsáveis por estes mecanismos, realizou-se um estudo comparativo do extrato com suas partições mais citotóxicas (B, C e D) em importantes vias de sinalização de morte e ciclo celular. A proteína

poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) está envolvida na regulação da homeostase celular, além de transcrição DNA, regulação do ciclo celular e reparo do DNA¹²⁰. Esta proteína possui uma regulação positiva em tumores e sua inativação leva à clivagem de caspase-3, sendo um efeito relevante no processo de apoptose¹²¹⁻¹²³. Além disso, PARP atua no reparo do DNA e processo de transcrição¹²¹. Diversos estudos tem revelado a associação da clivagem desta proteína assim como da ativação da cascata de caspases como mecanismo de ação de compostos naturais na indução da apoptose^{124, 125}. Os resultados obtidos pelo presente trabalho mostraram que houve um pequeno aumento da clivagem de PARP para as linhagens mais resistentes (RES259 e U251-MG) quando tratadas com o extrato 19 e suas partições. Contudo, nas linhagens sensíveis (GAMG e SF188), apesar de indícios de clivagem da proteína para o tratamento com o extrato 19 e a partição C, os resultados foram inconclusivos, uma vez que foi observado que as células controle também apresentaram clivagem de PARP inferindo-se que estas células apresentavam alguma forma de *stress* e baixa viabilidade celular. Portanto, não foi possível comprovar o verdadeiro potencial do extrato 19 e suas partições nestas linhagens. Dessa forma, mais estudos serão necessários para elucidar o possível envolvimento destes tratamentos nas vias de morte celular.

Outro importante regulador negativo do ciclo celular é a proteína p21, também conhecida como p21^{waf1/cip1} ou p21/CDKN1A, esta pequena proteína composta por 165 aminoácidos, pertence à família de inibidores de CDKs (CIP/Kip). Além disso, p21 atua inibindo o ciclo celular, podendo parar a transição da progressão do ciclo em G1/S e G2/M por inibição de ciclina-D/CDK4,6 e ciclina-E/CDK2, respectivamente¹²⁶. Os resultados obtidos pelo atual trabalho mostraram um aumento da expressão da proteína reguladora do ciclo celular p21, nas duas linhagens glioma (GAMG e U251-MG) tratadas apenas com a partição C do extrato 19. Ressalta-se que o aumento desta expressão foi mais pronunciado na linhagem mais sensível, GAMG. Estudos recentes revelam efeitos antiproliferativos de extratos naturais obtidos de plantas em tumores de carcinoma de cólon, hepatoma e glioblastoma devido à alta expressão de p21/ Cip1 promovendo a inibição da proliferação com alteração na distribuição do ciclo celular (parada G1) e apoptose celular^{98, 104, 109, 112}. No entanto, apesar das alterações encontradas na proteína p21, os resultados dos nossos ensaios de distribuição do ciclo celular mostraram que os tratamentos não promoveram alterações em sua distribuição na linhagem sensível, GAMG. Para a linhagem de glioma resistente U251-

MG, embora haja alterações aparentes na distribuição do ciclo celular em G0/G1 e G2/M, esses achados não foram estatisticamente significativos. O quimioterápico TMZ utilizado como controle positivo do experimento, começa a mostrar indícios de alterações em G2/M a partir do período de 48-72 horas¹²⁷⁻¹²⁹, entretanto como o período de exposição utilizado em nossos experimentos foi de 24 horas não foi possível verificar alterações significativas nas linhagens de glioma.

O extrato 19 e suas partições hexânica (B) e clorofórmica (C) também foram selecionados para uma melhor caracterização biológica em mecanismos migração e invasão celular. Entretanto, os resultados obtidos nos ensaios por *transwell* mostraram que o tratamento com o extrato 19 e suas partições não foram capazes de inibir, no tempo e condições avaliadas, estes dois mecanismos associados à carcinogênese. Portanto, o extrato e suas partições mostraram não regular os processos de migração e invasão celular, sendo assim, seus mecanismos de citotoxicidade antitumoral precisam ser melhor avaliados. A inibição do processo de migração tem sido investigada como mecanismo de ação de compostos naturais derivados de outras plantas¹³⁰⁻¹³² e tem revelado eficácia até mesmo em gliomas^{131, 132}, mas até o momento para o nosso conhecimento, não foram relatados estudos sobre o potencial das miconias nesses processos.

Com base nos resultados deste trabalho as possíveis vias de sinalização e processos relacionados aos mecanismos ação desses extratos e suas partições em linhagens de glioma são indicados nas figuras 47 e 48.

É importante salientar que maiores estudos serão necessários para confirmar o potencial e os mecanismos de ação desses extratos e partições, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de gliomas.



Figura 47- Diagrama sobre os possíveis mecanismos de ação dos extratos brutos 17 e 18 nas linhagens de glioma.

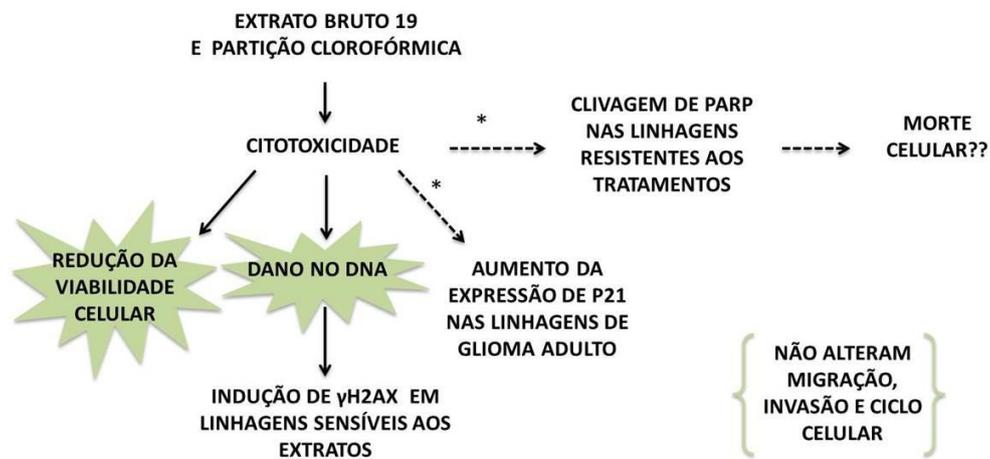


Figura 48- Diagrama sobre os possíveis mecanismos de ação do extratos bruto 19 e partição C nas linhagens de glioma.

8.2 – Composto sintético PEP005

O composto sintético PEP005 é um medicamento já utilizado na área clínica, principalmente para o tratamento de queratose actínica^{66-68, 73}. Em nosso *screening*, este composto revelou um grande potencial citotóxico em linhagens de glioma quando comparado ao quimioterápico padrão, TMZ⁶⁸. A média de IC₅₀ das linhagens de glioma tratadas com o PEP005 foi de 25,65 µg/mL enquanto a TMZ evidenciou 29,35 µg/mL. Um dos primeiros estudos que avaliaram a citotoxicidade celular do composto PEP005 em linhagens de câncer de cólon demonstrou que valores de IC₅₀ de 0,01 a 140µM foram capazes de inibir a proliferação celular de maneira dose e tempo dependente⁷⁰. Porém, quando comparado aos resultados encontrados no corrente estudo, os valores de IC₅₀ foram bem menores em gliomas, sendo a média de IC₅₀ de 0,004 a 95,14 µM. O índice de seletividade (IS) encontrado em duas das linhagens mais sensíveis ao PEP005 GAMG e SF188, mostrou que o composto sintético foi 160 e 595 vezes mais ativo, respectivamente, nestas linhagens quando comparadas à linhagem de astrócito normal. Estes dados confirmam a potencial atividade antitumoral do PEP005, sugerindo o potencial uso deste composto sintético no tratamento de gliomas.

O importante papel da proteína quinase C (PKC) em processos relevantes para transformação neoplásica e invasão celular a torna um alvo potencialmente adequado para a terapia antitumoral. Além disso, há evidências de que o direcionamento de PKCs específicas como alvos pode melhorar a eficácia terapêutica dos agentes neoplásicos estabelecidos^{68, 73, 74, 87, 133}. Estas proteínas quinases C (PKCs), constituem uma classe de mais de dez isoformas da família das serina/treonina quinases e são distintas quanto à sua estrutura, domínio e substrato, os quais dependem da interação com os cofatores de cálcio (Ca²⁺) ou diacilglicerol (DAG)^{68, 69, 87}. Como mencionado, o composto PEP005 atua como um ativador das isoenzimas PKCs, o que resulta num efeito anti-proliferativo e pró-apoptótico em várias células neoplásicas. Além disso, um aumento da expressão destas proteínas PKCs, tem sido visto a partir de períodos curtos de exposição ao tratamento com o PEP005 e ésteres de forbol, em células de diferentes tipos tumorais^{68, 70, 87}. Neste contexto, o perfil de expressão/ ativação das diferentes isoformas de PKCs foi avaliado após o tratamento com PEP005 em linhagens de glioma tendo como referência um conhecido éster de forbol, PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato)⁸⁷. O PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), também é um

ativador clássico de PKCs e seu principal benefício tem sido junto à diferenciação de células de leucemia mielomonocíticas, além de auxiliar no tratamento de pacientes com leucemia mielocítica¹³⁴. Os resultados encontrados no atual trabalho mostraram que as PKCs clássicas (p-PKC α/β II e PKC α) tiveram um aumento de sua expressão em linhagens de glioma adulto (GAMG, U251-MG) quando tratadas por 30 minutos e 1 hora, com o PEP005 e o PMA respectivamente. Além disso, ambos os tratamentos alteraram a isoformas PKD/PKC μ referentes aos resíduos Ser^{744/48} e Ser⁹¹⁶. Os dados obtidos também foram confirmados com um maior tempo de exposição ao PEP005, 24 horas, e em outras linhagens de glioma. Ressalta-se que neste tempo, a isoforma da PKC clássicas (PKC α) também foi alterada para a maioria das linhagens avaliadas.

De forma semelhante, um trabalho realizado com linhagem de próstata (LNCaP) mostrou que células tratadas com um análogo de diacilglicerol (HK654) são induzidas à apoptose através da ativação de PKC α ¹³⁵. Serova *et al.*⁶⁸ mostraram que o PEP005 ativou a isoforma PKC δ e reduziu a expressão de PKC α em linhagens de Colo205, levando a apoptose induzida pela ativação da via de sinalização Ras/Raf/MAPK e inibição de PI3K/AKT. Outro estudo realizado mostra que a PKC α exerce um papel fundamental em G1/S através da ativação de p21 mediando à diferenciação em células de intestino^{136, 137}. É importante salientar que por outro lado, estudos realizados com 22 amostras de tecido de GBM mostraram maiores níveis de atividade da proteína PKC α e menores níveis de PKC δ quando comparados a gliomas de baixo grau e astrócitos normais tratados com 100nM de PMA⁷⁴. Neste mesmo estudo citado anteriormente, o envolvimento de PKC α foi associado a um aumento da proliferação e diminuição da apoptose em células de gliomas⁷⁴. Outro trabalho mostrou que de seis PKCs testadas em 4 linhagens de glioma humano e 2 linhagens primárias de astrócito fetal humano tratadas com PMA, a PKC α foi a que exibiu um maior aumento de sua atividade, e esses níveis de expressão foram associados à proliferação celular dependente da *up*-regulação de p21¹³⁸. Dados relacionam isoformas de PKCs com diferentes funções celulares, dentre elas proliferação, diferenciação, apoptose, invasão, senescência, angiogênese tumoral, resistência a fármacos. Porém, para que estas isoformas possam atuar é necessário um equilíbrio dinâmico entre elas^{71, 139, 140}. Estas observações ilustram claramente a importância do *crossstalk* entre isoformas de PKC pro- e anti-apoptóticas, e que o efeito final dos agonistas de PKCs pode, portanto, depender do balanço

entre as várias isoenzimas presentes nos diferentes tipos tumorais e dentro do mesmo tipo tumoral (heterogeneidade intratumoral). Neste sentido, o fármaco pode ser menos eficaz nos tumores com maiores níveis das isoformas anti-apoptóticas⁶⁹.

A isoforma PKD/PKC μ tem se mostrado muito presente em diversos processos celulares, tais como sobrevivência celular, proliferação e invasão, mas a forma de regulação e o verdadeiro papel dessa proteína ainda permanecem inexplorados¹³⁹. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que após 30 minutos, 1 hora e 24 horas de tratamento, houve um aumento da atividade de proteínas da família PKD/PKC μ para todas as linhagens de glioma, tanto adulto (30 minutos, 1 hora e 24 horas) quanto pediátrico (24 horas). Destaca-se a PKD/PKC μ (Ser⁹¹⁶) que teve uma substancial ativação em todas as linhagens tratadas com o PEP005 em relação ao controle, sendo que o mesmo ocorreu para as linhagens (SF188 e U251-MG) para a forma fosforilada da PKD/ PKC μ (Ser^{744/748}). As demais isoformas, PKCs novas (p-PKC δ , PKC δ , PKC δ/θ , p-PKC θ e PKC ϵ), atípicas (p-PKC ζ/λ e PKC ζ) e p-PKC Pan (β II Ser⁶⁶⁰) mostraram um perfil heterogêneo de resposta ao tratamento com PEP005 nas linhagens de glioma (GAMG, U251-MG, RES259 e SF188).

Além das questões mencionadas, as isoformas de PKC diferem, não apenas na sua estrutura, especificidade do substrato e modo de ativação, mas também na sua distribuição nos tecidos, localização subcelular e funções biológicas⁶⁹. A ativação das isoenzimas PKCs resulta em mudanças na sua localização subcelular seguida por translocação. Assim, quando a enzima se encontra inativa, ela permanece no citoplasma e o pseudosubstrato da região regulatória se liga ao domínio catalítico, impedindo a sua atividade catalítica. Entretanto, uma vez ativada por DAG, a PKC é recrutada para a membrana celular⁸⁷.

Em nosso estudo, a forma fosforilada de PKC α se mostrou alterada para o tratamento com o PEP005. Dessa maneira, para comprovar se além da alteração na sua expressão, esta isoforma também foi ativada, avaliamos a exposição dos compostos PEP005 e PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) na ativação da proteína PKC α através da técnica de fracionamento celular. Os resultados obtidos evidenciaram uma ativação da isoforma PKC α através de sua translocação do citoplasma para a membrana celular, o que foi comprovado pela presença de marcadores específicos de cada fração celular. Estes dados corroboram com um estudo que utilizando microscopia confocal em linhagem de ovário de camundongo CHO-K1 (CCL-61) expressando PKC α marcada com GFP, mostrou que 100 nM de ingenol-3-angelato foi

capaz de ativar a translocação desta proteína do citoplasma para a membrana celular, após 30 minutos de avaliação⁸⁷. Estes achados apoiam claramente um papel importante de isoformas das proteínas PKCs no efeito do PEP005 em linhagens de glioma. No entanto, os resultados não são conclusivos e requerem mais estudos para confirmar o potencial e mecanismos de ação desse composto sintético em glioma.

Com base nos resultados descritos, no diagrama abaixo apresentamos de uma forma resumida as principais isoformas das proteínas PKCS moduladas pelo composto PEP005 em linhagens de glioma (Figura 49).

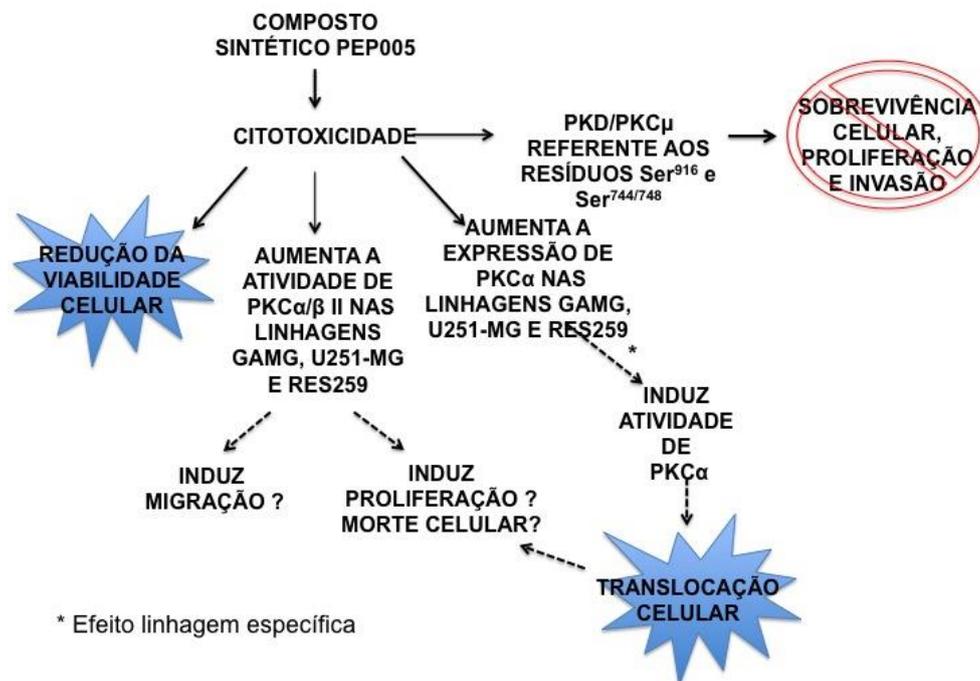


Figura 49- Diagrama sobre as possíveis isoformas de PKCs moduladas pelo composto PEP005 nas linhagens de glioma.

Neste trabalho foram investigadas também as vias de sinalização de proliferação, sobrevivência, morte e ciclo celular. Nossos resultados revelaram que a exposição ao PEP005 promove um aumento na atividade de ERK para as linhagens mais sensíveis ao PEP005 (GAMG, SF188 e RES259). Estes dados corroboram com estudos em linhagens de células de melanoma, no qual a proteína ERK1/2 foi ativada em resposta ao tratamento com o PEP005 independentemente da sensibilidade ao tratamento¹⁴¹. Além disso, dados evidenciaram que a ativação de ERK1/2 ocorreu tanto em células sensíveis quanto em células resistentes de

linhagens de leucemia⁷³. Dados de Hampson *et al.*⁷³ mostraram que a apoptose foi induzida pelo PEP005 dependentemente da PKC δ e ERK1/2, indicando também que a ativação crônica de ERK1/2 desencadeia um direcionamento pró-apoptótico ao invés de sinais de proliferação ou sobrevivência celular em linhagens de leucemia⁷³. Estudos realizados com células de cólon, leucemia e carcinoma de células escamosas mostraram ainda, que essa ativação de ERK1/2 pode estar relacionada a estímulos de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), pois uma vez que as PKCs são ativadas pelo PEP005, as MAPK integram Raf1, MAPK/MEK (proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK)), ERK, quinase N-terminal c-Jun (JNK) e quinases p38^{68, 73, 142}. Além disso, uma vez ativada pela atividade de proteínas PKC, JNK e quinases p38 podem desencadear os mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose celular^{68, 73, 142}. Com relação a proteína AKT, em nosso trabalho, demonstramos que a atividade da proteína AKT não foi alterada aparentemente nas linhagens avaliadas. Por outro lado, outros relatos mostram que o PEP005 leva à diminuição na regulação da atividade de AKT, que pode induzir a apoptose⁶⁸.

Estudos revelaram ainda que a PKC δ , quando associada à caspase-3 se mostra um indutor de apoptose⁶⁸. Entretanto, os resultados do presente estudo não revelaram alteração na clivagem da proteína caspase-3 sugerindo que talvez, no tempo avaliado e nas linhagens avaliadas, o tratamento não tenha sido capaz de desencadear a morte celular. Os resultados revelaram ainda, uma possível resposta ao dano no DNA relacionada ao aumento da atividade da proteína H2AX⁹⁸ apenas nas linhagens de glioma adulto (GAMG e U251-MG). Porém, não há dados na literatura que mostrem a alteração dessa proteína após o tratamento com o composto sintético (PEP005) em tumores.

As proteínas reguladoras do ciclo celular p21 e p27 também foram avaliadas mediante ao tratamento com o PEP005. Evidenciou-se que as linhagens de glioma adulto (GAMG e U251-MG) exibiram um aumento da expressão de p21. Entretanto, para as linhagens pediátricas (SF188 e RES259) a exposição ao tratamento não alterou a expressão de p21 na linhagem SF188 e promoveu uma diminuição da expressão dessa proteína na linhagem RES259. Os dados obtidos para as linhagens de glioma adulto corroboram com Cozzi *et al.*¹⁴¹ que verificaram ainda que em linhagens celulares sensíveis de melanoma, a indução de senescência pelo tratamento com 1 μ g/mL de PEP005 e PMA foi acompanhada pela expressão de p21^{WAF1/CIP1}, perda de fosforilação de *Rb* e repressão de genes requeridos para

a progressão de G1, síntese de DNA e mitoses. Além do mais, corroborando com os nossos resultados do perfil de expressão/ ativação de PKCs, Besson *et al.*¹³⁸ revelaram que em gliomas e astrócito normal, a PKC α foi a isoforma que exibiu um maior aumento de sua atividade, e esses níveis de expressão foram associados à proliferação celular dependente da *up*-regulação de p21. A proteína p27, por outro lado está diretamente relacionada à inibição do complexo ciclina-CDK, além de funcionar como um regulador negativo da progressão do ciclo celular^{143, 144}. Um aumento da porcentagem de expressão relativa da proteína p27 nas linhagens sensíveis de glioma (GAMG e SF188) e uma possível diminuição da expressão de p27 nas linhagens resistentes de gliomas (RES259 e U251-MG) foram observados nos resultados obtidos pelo atual estudo. Porém, não há relatos na literatura que comprovem o papel dessa proteína em tumores, quando tratados com o PEP005.

Estudos realizados mostraram que o tratamento com o PEP005 leva a uma diminuição de células na fase S observada após 12 horas em linhagens tumorais de cólon^{68,141}. Shen *et al.*¹³⁴ avaliaram os efeitos da prostatina, um forbol muito utilizado na medicina tradicional, na progressão do ciclo celular e verificaram uma indução na parada do ciclo celular em G1, que se mostrou fundamental na diferenciação de células de leucemia mielóide aguda. Em linhagens de melanoma sensíveis ao PEP005 e PMA foi observada a parada do ciclo celular em G1 e G2/M quando tratadas por 24 horas¹⁴¹. Além disso, outro estudo mostrou que efeitos antiproliferativos em células tumorais de cólon tratadas com o PEP005 foram associados a inibição da fase G1 e à apoptose⁷⁰. Na tentativa de elucidar o papel do PEP005 no ciclo celular avaliamos a distribuição do ciclo celular pela técnica de citometria de fluxo. Entretanto, os resultados observados não promoveram alterações na distribuição do ciclo celular no tempo e nas linhagens avaliadas (GAMG e U251-MG). Além disso, o quimioterápico TMZ também não mostrou alterações significativas, pois o período avaliado nos ensaios foi de 24 horas e de acordo com achados na literatura, a TMZ começa a mostrar indícios de alterações em G2/M a partir do período de 48-72 horas de tratamento¹²⁷⁻¹²⁹.

A caracterização biológica do composto PEP005 em gliomas também foi avaliada nos processos de migração e invasão celular. Para a avaliação do processo de migração celular foram utilizados insertos *transwell* em meio quimio-atrativo. Nossos resultados revelaram que o composto PEP005 não afeta de forma significativa o processo de migração no tempo e nas linhagens avaliadas (GAMG e U251-MG). Além disso, o PEP005 também mostrou não

impedir o mecanismo de invasão celular nas linhagens de glioma sensível (GAMG) e resistente (U251-MG) testadas. Até o momento poucos estudos evidenciam o papel e a eficácia do PEP005 nos processos de tumorigênese, além disso, os resultados apresentados são muitas vezes conflitantes e dependem do tipo tumoral avaliado como abordado em nossa discussão.

Com base nos resultados deste trabalho as possíveis vias de sinalização e processos relacionados aos mecanismos ação do composto PEP005 em linhagens de glioma são indicados na Figura 50.

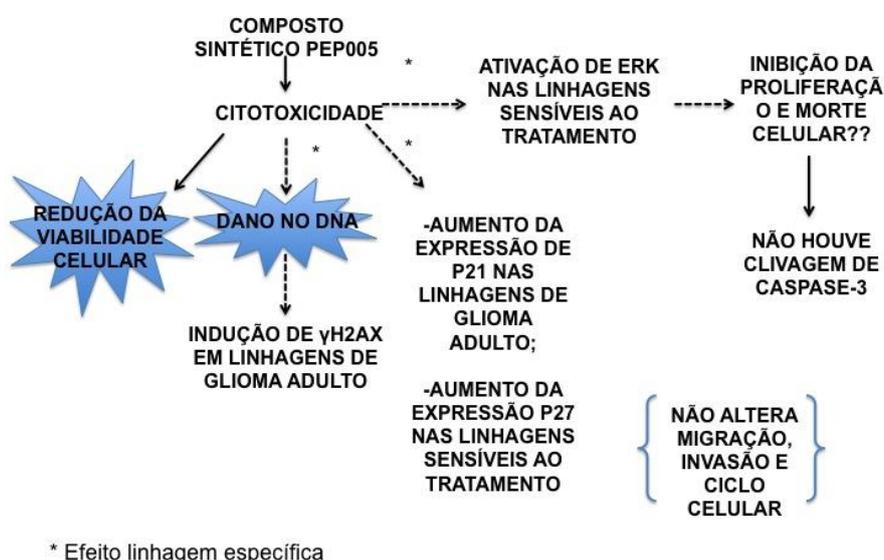


Figura 50- Diagrama sobre os possíveis mecanismos de ação do composto PEP005 nas linhagens de glioma.

Em síntese, baseado nos resultados apresentados e no que já foi discutido neste trabalho, sugere-se um potencial antineoplásico *in vitro* tanto para os extratos testados e selecionados, quanto para o composto sintético PEP005. Entretanto, a fim de elucidar melhor o efeito destes compostos em gliomas serão necessários mais experimentos que caracterizem as vias de sinalização relacionadas a processos da carcinogênese, bem como os mecanismos de migração e invasão celular.

9- CONCLUSÕES

1. Os ensaios de citotoxicidade revelaram que os extratos naturais e o composto sintético PEP005 exibiram um potencial antineoplásico *in vitro* nas linhagens de glioma avaliadas, mostrando um perfil de resposta dose-dependente na maioria das linhagens após 72 horas de tratamento. Além disso, estudos conduzidos com um dos extratos mais eficazes, 19, nos permitiram verificar que as partições clorofórmica e hexânica derivadas deste extrato apresentaram uma maior citotoxicidade em linhagens de glioma, exibindo um perfil de resposta dose e tempo dependente.

2. Os extratos naturais selecionados, partições e o composto sintético PEP005 não foram capazes de alterar de uma forma geral, os processos de migração, invasão e distribuição do ciclo celular em linhagens de glioma. Com relação à morte celular, os resultados foram inconclusivos e requerem mais estudos para afirmar o tipo de morte desencadeada pela citotoxicidade promovida pelo composto sintético e pelos extratos.

3. A avaliação das vias de sinalização permitiu verificar que os extratos naturais selecionados e o PEP005 modulam, de uma maneira geral, proteínas chaves relacionadas às vias de sinalização de proliferação, dano do DNA e regulação do ciclo celular. Ressalta-se ainda que, o composto PEP005 regula a atividade de importantes isoformas das proteínas PKCs envolvidas no processo da tumorigênese. Contudo, os estudos são preliminares e uma melhor caracterização será necessária para confirmar o potencial e os mecanismos de ação dos extratos e do composto sintético como uma nova estratégia para o tratamento de gliomas.

REFERÊNCIAS

1. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. *Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads*. **Bioorg Med Chem**. 2005;13(21):5892-908.
2. Ferlay J, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base* [Internet] Lyon, France: GLOBOCAN; 2012 [cited 20/03/2014]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
3. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2016-Incidência de Câncer no Brasil*. Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância-Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, editor. **Rio de Janeiro: INCA**; 2016.
4. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. **Neuro Oncol**. 2012;14 Suppl 5:v1-49.
5. Jones C, Perryman L, Hargrave D. *Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins?* **Nat Rev Clin Oncol**. 2012;9(7):400-13.
6. Louis DN., Ohgaki H., Wiestler OD., Cavenee WK. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th ed. ed. Bosman FT JE, Lakhani SR, Ohgaki H, editors. **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC)**; 2007.
7. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. **Acta Neuropathol**. 2007;114(2):97-109.
8. Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffiatti R, Jaal J, et al. *Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe*. **Eur J Cancer**. 2012;48(10):1532-42.
9. Cruceru ML, Neagu M, Demoulin JB, Constantinescu SN. *Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms*. **J Cell Mol Med**. 2013;17(10):1218-35.
10. Rousseau A, Mokhtari K, Duyckaerts C. *The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system - what has changed?* **Curr Opin Neurol**. 2008;21(6):720-7.
11. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. **Acta Neuropathol**. 2016;131(6):803-20.

12. Alelu-Paz R, Ashour N, Gonzalez-Corpas A, Ropero S. *DNA methylation, histone modifications, and signal transduction pathways: a close relationship in malignant gliomas pathophysiology*. **J Signal Transduct**. 2012;2012:956958.
13. Zhu Y, Parada LF. *The molecular and genetic basis of neurological tumours*. **Nat Rev Cancer**. 2002;2(8):616-26.
14. Chamberlain MC. *Treatment options for glioblastoma*. **Neurosurg Focus**. 2006;20(4):E19.
15. Wen PY, Kesari S. *Malignant gliomas in adults*. **N Engl J Med**. 2008;359(5):492-507.
16. Kesari S. *Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments*. **Semin Oncol**. 2011;38 Suppl 4:S2-10.
17. Appin CL, Brat DJ. *Molecular genetics of gliomas*. **Cancer J**. 2014;20(1):66-72.
18. Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S, et al. *Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity*. **Cancer Res**. 2012;72(7):1614-20.
19. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, et al. *Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012;109(8):3041-6.
20. Neto V M., Dubois LG., Alves TR., Correia AH., Brabo EP. *Câncer do Sistema Nervoso Central do Adulto*. In: Ferreira C G., Rocha J CC., editors. *Oncologia Molecular*. 2nd ed. **Rio de Janeiro: Atheneu** 2010. p. 700
21. Ohgaki H, Kleihues P. *Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas*. **Cancer Sci**. 2009;100(12):2235-41.
22. Ohgaki H, Kleihues P. *The definition of primary and secondary glioblastoma*. **Clin Cancer Res**. 2013;19(4):764-72.
23. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, et al. *Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin*. **J Clin Oncol**. 2011;29(34):4482-90.
24. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. **N Engl J Med**. 2005;352(10):987-96.
25. Abhinav K, Aquilina K, Gbejuade H, La M, Hopkins K, Iyer V. *A pilot study of glioblastoma multiforme in elderly patients: treatments, O-6-methylguanine-DNA*

methyltransferase (MGMT) methylation status and survival. Clin Neurol Neurosurg. 2013;115(8):1375-8.

26. Germano I, Swiss V, Casaccia P. *Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: where is the link? Neuropharmacology.* 2010;58(6):903-10.

27. Mittal S, Pradhan S, Srivastava T. *Recent advances in targeted therapy for glioblastoma. Expert Rev Neurother.* 2015:1-12.

28. Alrwas A, Papadopoulos NE, Cain S, Patel SP, Kim KB, Deburr TL, et al. *Phase I trial of biochemotherapy with cisplatin, temozolomide, and dose escalation of nab-paclitaxel combined with interleukin-2 and interferon-alpha in patients with metastatic melanoma. Melanoma Res.* 2014;24(4):342-8.

29. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al. *Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. Cancer Cell.* 2012;22(4):425-37.

30. Yokota J. *Tumor progression and metastasis. Carcinogenesis.* 2000;21(3):497-503.

31. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. *Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. Cell.* 2009;136(5):823-37.

32. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. *DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. Nat Rev Cancer.* 2016;16(1):20-33.

33. Croce CM. *Oncogenes and cancer. N Engl J Med.* 2008;358(5):502-11.

34. Stowers SJ, Maronpot RR, Reynolds SH, Anderson MW. *The role of oncogenes in chemical carcinogenesis. Environ Health Perspect.* 1987;75:81-6.

35. Presneau N, Manderson EN, Tonin PN. *The quest for a tumor suppressor gene phenotype. Curr Mol Med.* 2003;3(7):605-29.

36. Weinberg RA. *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res.* 1989;49(14):3713-21.

37. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer. Cell.* 2000;100(1):57-70.

38. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell.* 2011;144(5):646-74.

39. Ito Y, Kawanishi M, Harayama T, Takabayashi S. *Combined effect of the extracts from Croton tiglium, Euphorbia lathyris or Euphorbia tirucalli and n-butyrate on Epstein-Barr virus expression in human lymphoblastoid P3HR-1 and Raji cells. Cancer Lett.* 1981;12(3):175-80.

40. van den Bosch CA. *Is endemic Burkitt's lymphoma an alliance between three infections and a tumour promoter?* **Lancet Oncol.** 2004;5(12):738-46.
41. McGarvey DJ, Croteau R. *Terpenoid metabolism.* **Plant Cell.** 1995;7(7):1015-26.
42. Gschwendt M, Hecker E. *Tumor promoting compounds from Euphorbia triangularis: mono- and diesters of 12-desoxy-phorbol.* **Tetrahedron Lett.** 1969(40):3509-12.
43. Alentorn A, Duran-Pena A, Pingle SC, Piccioni DE, Idbah A, Kesari S. *Molecular profiling of gliomas: potential therapeutic implications.* **Expert Rev Anticancer Ther.** 2015:1-8.
44. Omuro A, DeAngelis LM. *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review.* **JAMA.** 2013;310(17):1842-50.
45. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. *Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors.* **N Engl J Med.** 2015;372(26):2499-508.
46. Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. *Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer.* **Science.** 2015;348(6238):1036-9.
47. Foote MB, Papadopoulos N, Diaz LA, Jr. *Genetic Classification of Gliomas: Refining Histopathology.* **Cancer Cell.** 2015;28(1):9-11.
48. Costa-Lotufo LVM, R. C.; Alves, A.P.N.N., Madeira, S.V.F.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A; Moraes, M.O. *A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.* *Revista Virtual Química.* 2010 30/08/2010:47-58.
49. Junior CV., Bolzani VS., Barreiro JE. *[The Natural Products and the Modern Medicinal Chemistry].* **Química Nova.** 2006;29(2):326-37. Portuguese.
50. Pinto AC, Bolzani, VS, Silva DHS, Lopes NP, Epifanio RA. *[Natural products: current status, challenges and trends].* **Química Nova.** 2002;25(1):45-61. Portuguese.
51. Elisabetsky E, Souza, GC. *Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 2004:107-22.
52. Braz-Filho R. *[Phytochemical contribution to development of a emergent country]* **Química Nova.** 2010;33(1):229-39. Portuguese.
53. Cragg GM, Newman DJ, Yang SS. *Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience.* **J Nat Prod.** 2006;69(3):488-98.

54. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002*. **J Nat Prod**. 2003;66(7):1022-37.
55. Sharma SV, Haber DA, Settleman J. *Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents*. **Nat Rev Cancer**. 2010;10(4):241-53.
56. de Melo JG, Santos AG, de Amorim EL, do Nascimento SC, de Albuquerque UP. *Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach*. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2011;2011:365359.
57. de Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, et al. *Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines*. **J Ethnopharmacol**. 2009;123(3):439-45.
58. Napolitano DR, Mineo JR, de Souza MA, de Paula JE, Espindola LS, Espindola FS. *Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado*. **J Ethnopharmacol**. 2005;99(1):37-41.
59. Goldenberg R, Baumgratz JFA, Souza MLR. *[Taxonomy of Melastomataceae in Brazil: retrospective and perspective views, and an identification key for the genera]*. **Rodriguésia**. 2012;63(1):145-61. "Portuguese".
60. Romero R, Martins AB. *[Melastomataceae from Serra da Canastra National Park, Minas Gerais, Brazil]*. **Revista Brasil Bot**. 2000;25(1):19-24. "Portuguese".
61. Mara Serpeloni J, Mazzaron Barcelos GR, Prates Mori M, Yanagui K, Vilegas W, Aparecida Varanda E, et al. *Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the Miconia genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an in vitro analysis*. **Exp Toxicol Pathol**. 2011;63(5):499-504.
62. Vasconcelos MA, Royo VA, Ferreira DS, Crotti AE, Andrade e Silva ML, Carvalho JC, et al. *In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from Miconia albicans (Melastomataceae)*. **Z Naturforsch C**. 2006;61(7-8):477-82.
63. Serpeloni JM, Bizarro dos Reis M, Rodrigues J, Campaner dos Santos L, Vilegas W, Varanda EA, et al. *In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts from Miconia species using the comet assay and micronucleus test*. **Mutagenesis**. 2008;23(6):501-7.
64. Rezende A. *Sistemática e conservação de Miconia seção Miconia DC. (Melastomataceae) no estado de Minas Gerais, Brasil*. "**Dissertação (Mestrado)**". Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia (UFU)-MG; 2012.
65. Kuhlmann M. *Frutos e sementes do Cerrado atrativos para fauna: guia de campo*. **Brasília**2012.

66. King AJ, Brown GD, Gilday AD, Larson TR, Graham IA. *Production of bioactive diterpenoids in the euphorbiaceae depends on evolutionarily conserved gene clusters*. **Plant Cell**. 2014;26(8):3286-98.
67. Doan HQ, Gulati N, Levis WR. *Ingenol mebutate: potential for further development of cancer immunotherapy*. **J Drugs Dermatol**. 2012;11(10):1156-7.
68. Serova M, Ghouli A, Benhadji KA, Faivre S, Le Tourneau C, Cvitkovic E, et al. *Effects of protein kinase C modulation by PEP005, a novel ingenol angelate, on mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in cancer cells*. **Mol Cancer Ther**. 2008;7(4):915-22.
69. Ersvaer E, Kittang AO, Hampson P, Sand K, Gjertsen BT, Lord JM, et al. *The protein kinase C agonist PEP005 (ingenol 3-angelate) in the treatment of human cancer: a balance between efficacy and toxicity*. **Toxins (Basel)**. 2010;2(1):174-94.
70. Benhadji KA, Serova M, Ghouli A, Cvitkovic E, Le Tourneau C, Ogbourne SM, et al. *Antiproliferative activity of PEP005, a novel ingenol angelate that modulates PKC functions, alone and in combination with cytotoxic agents in human colon cancer cells*. **Br J Cancer**. 2008;99(11):1808-15.
71. Mascia F, Denning M, Kopan R, Yuspa SH. *The black box illuminated: signals and signaling*. **J Invest Dermatol**. 2012;132(3 Pt 2):811-9.
72. Hampson P, Wang K, Ersvaer E, McCormack E, Schuler J, Fiebig HH, et al. *Up-regulation of anti-apoptotic genes confers resistance to the novel anti-leukaemic compound PEP005 in primary AML cells*. **Oncoscience**. 2014;1(8):529-39.
73. Hampson P, Wang K, Milverton L, Ersvaer E, Bruserud O, Lord JM. *Kinetics of ERK1/2 activation determine sensitivity of acute myeloid leukaemia cells to the induction of apoptosis by the novel small molecule ingenol 3-angelate (PEP005)*. **Apoptosis**. 2010;15(8):946-55.
74. Mandil R, Ashkenazi E, Blass M, Kronfeld I, Kazimirsky G, Rosenthal G, et al. *Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells*. **Cancer Res**. 2001;61(11):4612-9.
75. Ribeiro DA, Oliveira LG, Macedo DG, Menezes IR, Costa JG, Silva MA, et al. *Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil*. **J Ethnopharmacol**. 2014;155(3):1522-33.
76. Newman DJ, Cragg GM. *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010*. **J Nat Prod**. 2012;75(3):311-35.
77. Gioti K, Tenta R. *Bioactive Natural Products against Prostate Cancer: Mechanism of Action and Autophagic/Apoptotic Molecular Pathways*. **Planta Med**. 2015;81(7):543-62.

78. Chang J, Kwon HJ. *Discovery of novel drug targets and their functions using phenotypic screening of natural products*. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 2015.
79. Sharma SB, Gupta R. *Drug development from natural resource: a systematic approach*. **Mini Rev Med Chem**. 2015;15(1):52-7.
80. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. *Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review*. **Biotechnol Adv**. 2015;33(8):1582-614.
81. Tang B, Bi W, Tian M, Row KH. *Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants*. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**. 2012;904:1-21.
82. Silva-Oliveira RJ, Silva VA, Martinho O, Cruvinel-Carlioni A, Melendez ME, Rosa MN, et al. *Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker*. **Cell Oncol (Dordr)**. 2016;39(3):253-63.
83. Bax DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, et al. *Molecular and phenotypic characterisation of paediatric glioma cell lines as models for preclinical drug development*. **PLoS One**. 2009;4(4):e5209.
84. Costa BM, Smith JS, Chen Y, Chen J, Phillips HS, Aldape KD, et al. *Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma*. **Cancer Res**. 2010;70(2):453-62.
85. Carlioni CA. *Estabelecimento e caracterização citogenética e molecular de culturas primárias de glioblastomas*. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos-SP: Hospital de Câncer de Barretos; 2013.
86. Suffness M, Pezzuto JM. *Assays related to cancer drug discovery*. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. London: Academic Press; 1990. 71–133. p.
87. Kedei N, Lundberg DJ, Toth A, Welburn P, Garfield SH, Blumberg PM. *Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C*. **Cancer Res**. 2004;64(9):3243-55.
88. Morais-Santos F, Granja S, Miranda-Goncalves V, Moreira AH, Queiros S, Vilaca JL, et al. *Targeting lactate transport suppresses in vivo breast tumour growth*. **Oncotarget**. 2015;6(22):19177-89.
89. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Assay Guidance Manual [Internet]*. . In: Sittampalam GS CN, Nelson H, et al., Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004, editor.2013.

90. Serna DM, Martinez JH. *Phenolics and Polyphenolics from Melastomataceae Species*. **Molecules**. 2015;20(10):17818-47.
91. Cagnol S, Chambard JC. *ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence*. **FEBS J**. 2010;277(1):2-21.
92. Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, et al. *Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma*. **Genes Dev**. 2012;26(8):756-84.
93. Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WS, Fuller GN. *Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas*. **Lab Invest**. 2004;84(8):941-51.
94. Zhang Y, Xie RF, Xiao QG, Li R, Shen XL, Zhu XG. *Hedyotis diffusa Willd extract inhibits the growth of human glioblastoma cells by inducing mitochondrial apoptosis via AKT/ERK pathways*. **J Ethnopharmacol**. 2014;158 Pt A:404-11.
95. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. **Biochim Biophys Acta**. 2007;1773(8):1263-84.
96. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. *How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?* **Cell Cycle**. 2009;8(8):1168-75.
97. Lin MW, Lin AS, Wu DC, Wang SS, Chang FR, Wu YC, et al. *Euphol from Euphorbia tirucalli selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis*. **Food Chem Toxicol**. 2012;50(12):4333-9.
98. Fragkos M, Jurvansuu J, Beard P. *H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway*. **Mol Cell Biol**. 2009;29(10):2828-40.
99. Motomura T, Ueda K, Ohtani S, Hansen E, Ji L, Ito K, et al. *Evaluation of systemic external microwave hyperthermia for treatment of pleural metastasis in orthotopic lung cancer model*. **Oncol Rep**. 2010;24(3):591-8.
100. Guo Z, Zhao J, Song L, Ma JX, Wang CJ, Pei SY, et al. *Induction of H2AX phosphorylation in tumor cells by gossypol acetic acid is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) family*. **Cancer Cell Int**. 2014;14(1):141.
101. Su J, Lai H, Chen J, Li L, Wong YS, Chen T, et al. *Natural borneol, a monoterpenoid compound, potentiates selenocystine-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by enhancement of cellular uptake and activation of ROS-mediated DNA damage*. **PLoS One**. 2013;8(5):e63502.
102. Hsieh YH, Lee CH, Chen HY, Hsieh SC, Lin CL, Tsai JP. *Induction of cell cycle arrest, DNA damage, and apoptosis by nimbolide in human renal cell carcinoma cells*. **Tumour Biol**. 2015;36(10):7539-47.

103. Chen LC, Lee WS. *P27/Kip1 is responsible for magnolol-induced U373 apoptosis in vitro and in vivo*. **J Agric Food Chem**. 2013;61(11):2811-9.
104. Miyake JA, Benadiba M, Colquhoun A. *Gamma-linolenic acid inhibits both tumour cell cycle progression and angiogenesis in the orthotopic C6 glioma model through changes in VEGF, Flt1, ERK1/2, MMP2, cyclin D1, pRb, p53 and p27 protein expression*. **Lipids Health Dis**. 2009;8:8.
105. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. *Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis*. **Mol Cancer**. 2015;14:48.
106. Chen S, Meng F, Chen Z, Tomlinson BN, Wesley JM, Sun GY, et al. *Two-dimensional zymography differentiates gelatinase isoforms in stimulated microglial cells and in brain tissues of acute brain injuries*. **PLoS One**. 2015;10(4):e0123852.
107. Kim TD, Song KS, Li G, Choi H, Park HD, Lim K, et al. *Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer*. **BMC Cancer**. 2006;6:211.
108. Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. *Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines*. **Int J Oncol**. 2014;45(2):887-94.
109. Ding D, Guo YR, Wu RL, Qi WY, Xu HM. *Two new isoquinoline alkaloids from *Scolopendra subspinipes mutilans* induce cell cycle arrest and apoptosis in human glioma cancer U87 cells*. **Fitoterapia**. 2016;110:103-9.
110. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. *Comparative effects of EGCG, green tea and a nutrient mixture on the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines*. **Oncol Rep**. 2010;24(3):747-57.
111. Chang HF, Huang WT, Chen HJ, Yang LL. *Apoptotic effects of gamma-mangostin from the fruit hull of *Garcinia mangostana* on human malignant glioma cells*. **Molecules**. 2010;15(12):8953-66.
112. Liu B, Gao YQ, Wang XM, Wang YC, Fu LQ. *Germacrone inhibits the proliferation of glioma cells by promoting apoptosis and inducing cell cycle arrest*. **Mol Med Rep**. 2014;10(2):1046-50.
113. Gentile MT, Ciniglia C, Reccia MG, Volpicelli F, Gatti M, Thellung S, et al. **Ruta graveolens* L. induces death of glioblastoma cells and neural progenitors, but not of neurons, via ERK 1/2 and AKT activation*. **PLoS One**. 2015;10(3):e0118864.
114. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. *Saponins as cytotoxic agents: a review*. **Phytochem Rev**. 2010;9(3):425-74.

115. Tian Y, Tang HF, Qiu F, Wang XJ, Chen XL, Wen AD. *Triterpenoid saponins from Ardisia pusilla and their cytotoxic activity*. **Planta Med**. 2009;75(1):70-5.
116. Gu R, Wang Y, Long B, Kennelly E, Wu S, Liu B, et al. *Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches*. **Biol Pharm Bull**. 2014;37(6):903-15.
117. Aum DJ, Kim DH, Beaumont TL, Leuthardt EC, Dunn GP, Kim AH. *Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma*. **Neurosurg Focus**. 2014;37(6):E11.
118. Oberoi RK, Parrish KE, Sio TT, Mittapalli RK, Elmquist WF, Sarkaria JN. *Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood-brain barrier to treat glioblastoma*. **Neuro Oncol**. 2016;18(1):27-36.
119. Lemee JM, Clavreul A, Menei P. *Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone*. **Neuro Oncol**. 2015;17(10):1322-32.
120. Ricks TK, Chiu HJ, Ison G, Kim G, McKee AE, Kluetz P, et al. *Successes and Challenges of PARP Inhibitors in Cancer Therapy*. **Front Oncol**. 2015;5:222.
121. Ko HL, Ren EC. *Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription*. **Biomolecules**. 2012;2(4):524-48.
122. Thangam R, Sathuvan M, Poongodi A, Suresh V, Pazhanichamy K, Sivasubramanian S, et al. *Activation of intrinsic apoptotic signaling pathway in cancer cells by Cymbopogon citratus polysaccharide fractions*. **Carbohydr Polym**. 2014;107:138-50.
123. Wong RS. *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. **J Exp Clin Cancer Res**. 2011;30:87.
124. Wang SG, Huang MH, Li JH, Lai FI, Lee HM, Hsu YN. *Punicalagin induces apoptotic and autophagic cell death in human U87MG glioma cells*. **Acta Pharmacol Sin**. 2013;34(11):1411-9.
125. Lv L, Zheng L, Dong D, Xu L, Yin L, Xu Y, et al. *Dioscin, a natural steroid saponin, induces apoptosis and DNA damage through reactive oxygen species: a potential new drug for treatment of glioblastoma multiforme*. **Food Chem Toxicol**. 2013;59:657-69.
126. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage*. **DNA Repair (Amst)**. 2016;42:63-71.
127. Shen W, Hu JA, Zheng JS. *Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells*. **J Int Med Res**. 2014;42(1):164-72.
128. Filippi-Chiela EC, Thome MP, Bueno e Silva MM, Pelegrini AL, Ledur PF, Garicochea B, et al. *Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic*

catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer.** 2013;13:147.

129. Barciszewska AM, Gurda D, Glodowicz P, Nowak S, Naskret-Barciszewska MZ. *A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells.* **PLoS One.** 2015;10(8):e0136669.

130. Mishra R, Kaur G. *Aqueous ethanolic extract of Tinospora cordifolia as a potential candidate for differentiation based therapy of glioblastomas.* **PLoS One.** 2013;8(10):e78764.

131. Tsai CF, Yeh WL, Chen JH, Lin C, Huang SS, Lu DY. *Osthole suppresses the migratory ability of human glioblastoma multiforme cells via inhibition of focal adhesion kinase-mediated matrix metalloproteinase-13 expression.* **Int J Mol Sci.** 2014;15(3):3889-903.

132. Zhang Z, Lv J, Lei X, Li S, Zhang Y, Meng L, et al. *Baicalein reduces the invasion of glioma cells via reducing the activity of p38 signaling pathway.* **PLoS One.** 2014;9(2):e90318.

133. Gokmen-Polar Y, Murray NR, Velasco MA, Gatalica Z, Fields AP. *Elevated protein kinase C beta11 is an early promotive event in colon carcinogenesis.* **Cancer Res.** 2001;61(4):1375-81.

134. Shen X, Xiong GL, Jing Y, Xiao H, Cui Y, Zhang YF, et al. *The protein kinase C agonist prostratin induces differentiation of human myeloid leukemia cells and enhances cellular differentiation by chemotherapeutic agents.* **Cancer Lett.** 2015;356(2 Pt B):686-96.

135. Garcia-Bermejo ML, Leskow FC, Fujii T, Wang Q, Blumberg PM, Ohba M, et al. *Diacylglycerol (DAG)-lactones, a new class of protein kinase C (PKC) agonists, induce apoptosis in LNCaP prostate cancer cells by selective activation of PKCalpha.* **J Biol Chem.** 2002;277(1):645-55.

136. Black JD. *Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle.* **Front Biosci.** 2000;5:D406-23.

137. Oliva JL, Caino MC, Senderowicz AM, Kazanietz MG. *S-Phase-specific activation of PKC alpha induces senescence in non-small cell lung cancer cells.* **J Biol Chem.** 2008;283(9):5466-76.

138. Besson A, Yong VW. *Involvement of p21(Waf1/Cip1) in protein kinase C alpha-induced cell cycle progression.* **Mol Cell Biol.** 2000;20(13):4580-90.

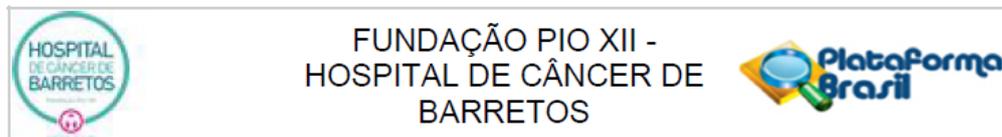
139. Giorgi C, Agnoletto C, Baldini C, Bononi A, Bonora M, Marchi S, et al. *Redox control of protein kinase C: cell- and disease-specific aspects.* **Antioxid Redox Signal.** 2010;13(7):1051-85.

140. Kim RK, Suh Y, Hwang E, Yoo KC, Choi KS, An S, et al. *PKCdelta maintains phenotypes of tumor initiating cells through cytokine-mediated autocrine loop with positive feedback.* **Oncogene.** 2015;34(46):5749-59.

141. Cozzi SJ, Parsons PG, Ogbourne SM, Pedley J, Boyle GM. *Induction of senescence in diterpene ester-treated melanoma cells via protein kinase C-dependent hyperactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway.* **Cancer Res.** 2006;66(20):10083-91.
142. Freiburger SN, Cheng PF, Iotzova-Weiss G, Neu J, Liu Q, Dziunycz P, et al. *Ingenol Mebutate Signals via PKC/MEK/ERK in Keratinocytes and Induces Interleukin Decoy Receptors IL1R2 and IL13RA2.* **Mol Cancer Ther.** 2015;14(9):2132-42.
143. Wang Y, Xiang J, Ji F, Deng Y, Tang C, Yang S, et al. *Knockdown of CRM1 inhibits the nuclear export of p27(Kip1) phosphorylated at serine 10 and plays a role in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer.* **Cancer Lett.** 2014;343(1):6-13.
144. Orlando S, Gallastegui E, Besson A, Abril G, Aligue R, Pujol MJ, et al. *p27Kip1 and p21Cip1 collaborate in the regulation of transcription by recruiting cyclin-Cdk complexes on the promoters of target genes.* **Nucleic Acids Res.** 2015;43(14):6860-73.

ANEXOS

Anexo A - Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DO COMPOSTO DERIVADO DO EXTRATO DE *Euphorbia tirucalli* EM LINHAGENS COMERCIAIS, PRIMÁRIAS E CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS CEREBRAIS

Pesquisador: Rui Manuel Vieira Reis

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34085414.0.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 742.030

Data da Relatoria: 07/08/2014

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

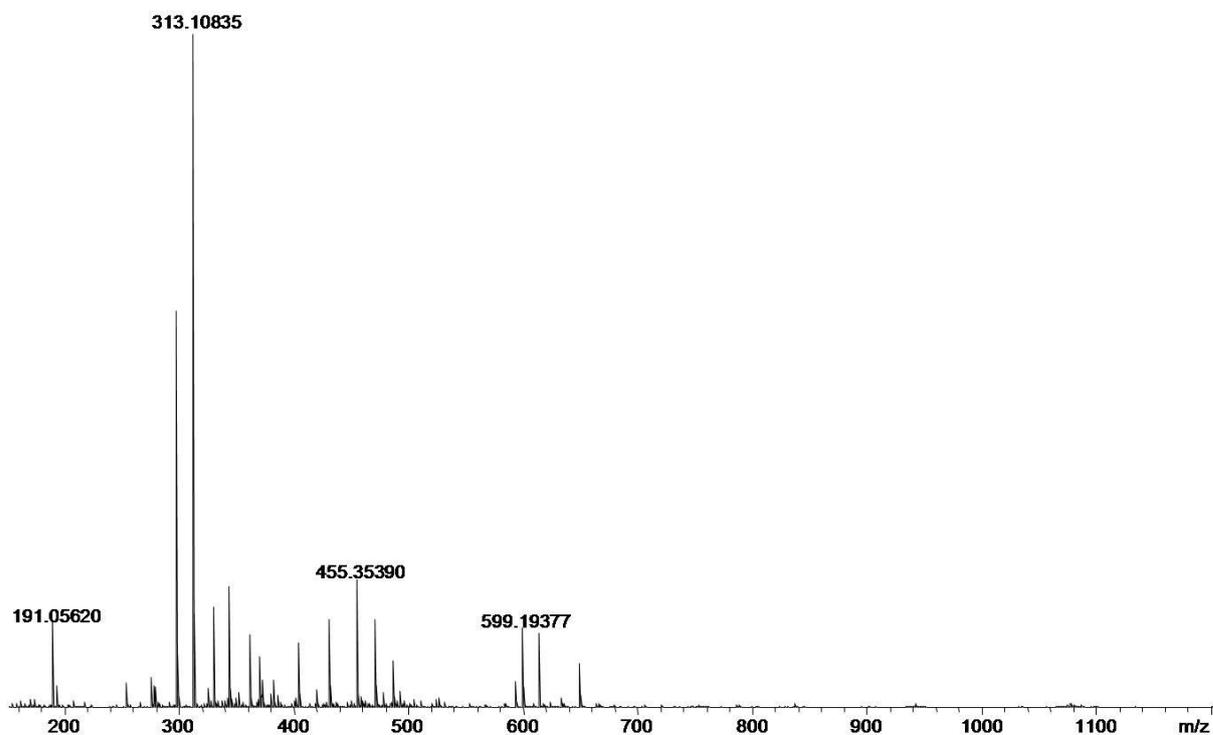
Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

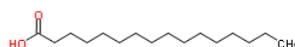
Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 07/02/2015.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 836/2014.

Anexo B - Espectro obtido por RMN evidenciando as principais moléculas encontradas no extrato bruto 19

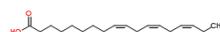


m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
191.0562	C ₇ H ₁₁ O ₆	
255.2333	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	

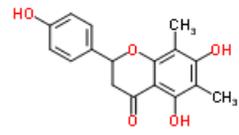
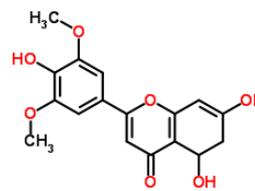
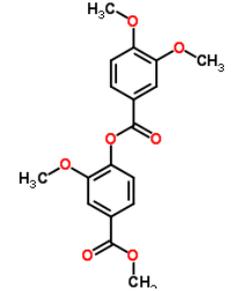
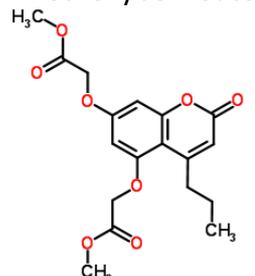


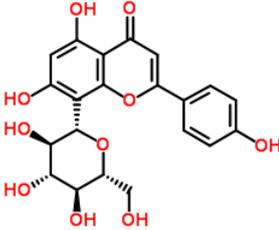
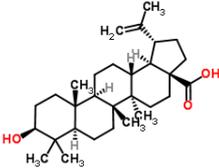
Ácido Palmítico

277.21771 C₁₈H₂₉O₂

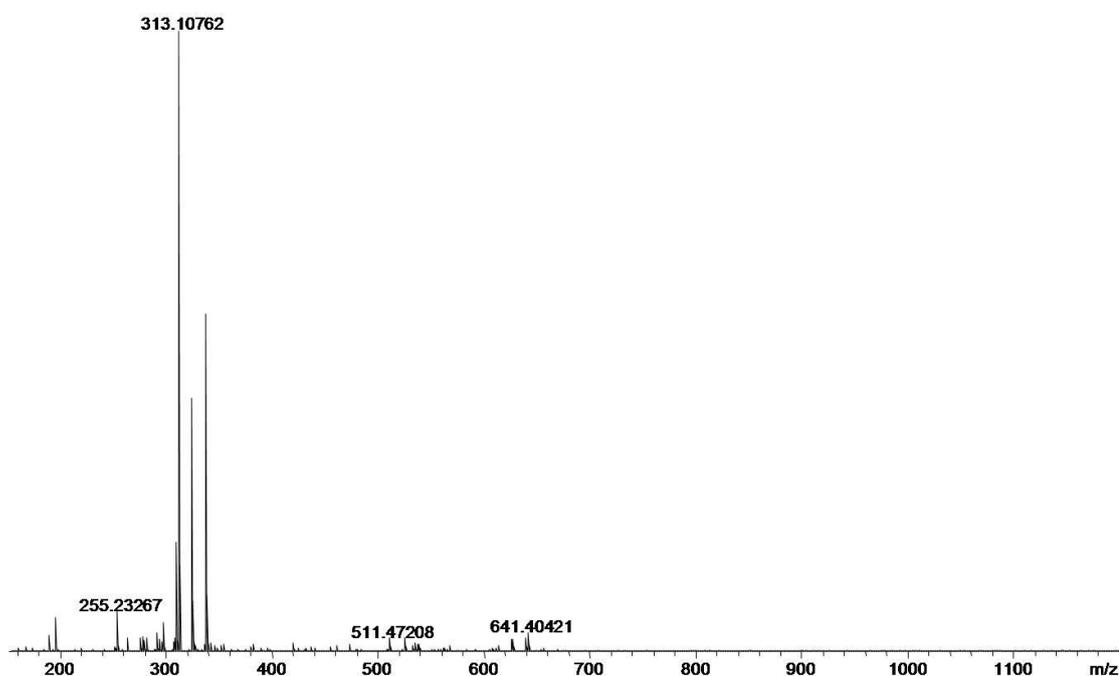


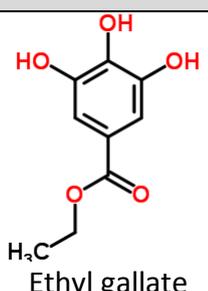
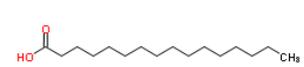
Ácido α-Linolênico

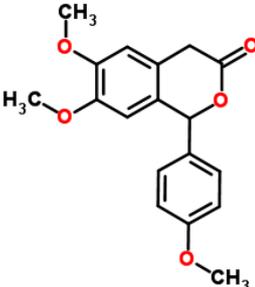
m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
299.09276	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	
313.10835	C ₁₈ H ₁₇ O ₅	Farresol
331.08275	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	5,7-Dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one
331.08275	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	
345.09851	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-5,6-dihydro-4H-chromen-4-one
345.09851	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	
363.10909	C ₁₈ H ₁₉ O ₈	Methyl 4-[(3,4-dimethoxybenzoyl)oxy]-3-methoxybenzoate
363.10909	C ₁₈ H ₁₉ O ₈	

m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
431.09923	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	
455.3539	C ₃₀ H ₄₇ O ₃	Vitexina
471.34894	C ₃₁ H ₄₃ N ₄	
487.3441	C ₁₆ H ₃₉ N ₁₆	Ácido Betulínico
599.19377	C ₂₀ H ₂₃ N ₁₆	
613.20962	C ₂₃ H ₃₇ N ₂ O	
	17	

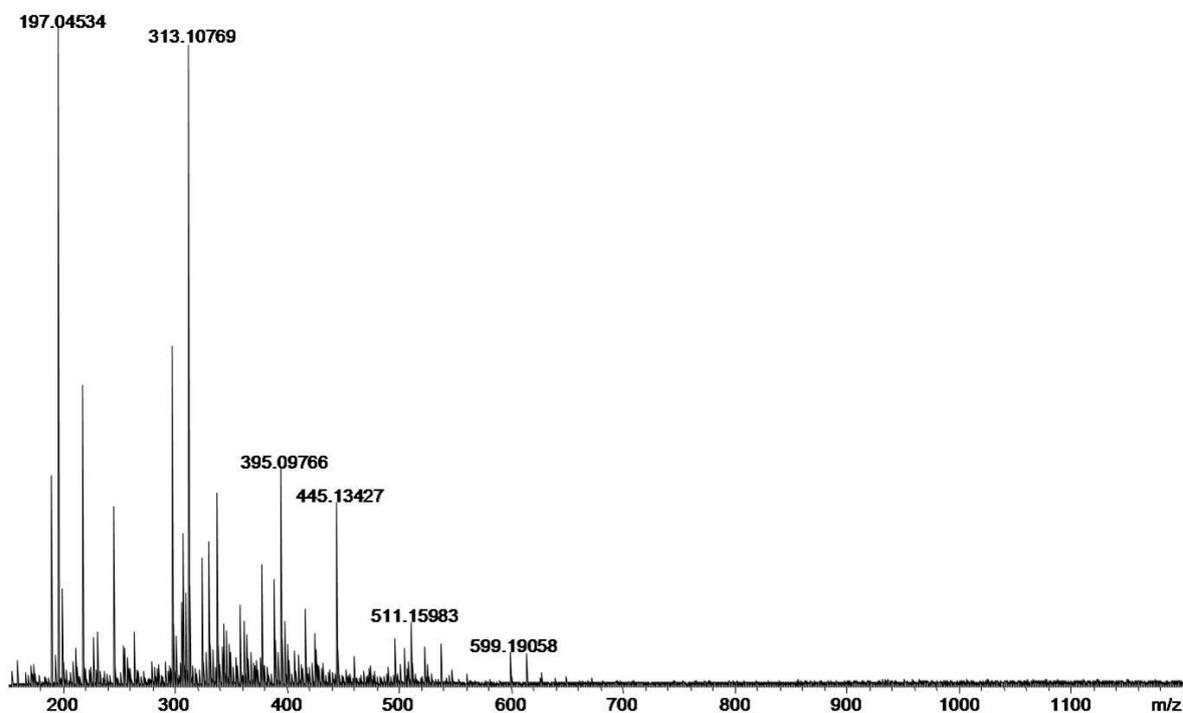
Anexo C - Espectro obtido por RMN evidenciando as principais moléculas encontradas na partição B (hexânica) do extrato bruto 19

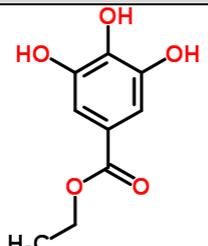
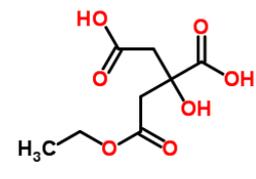


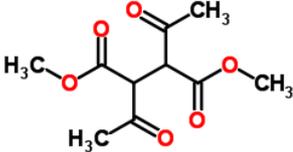
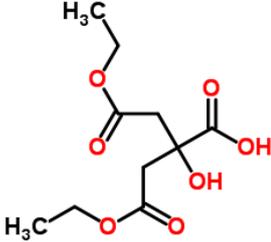
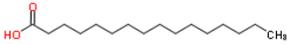
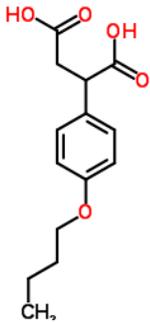
m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
197.04534	C ₉ H ₉ O ₅	 Ethyl gallate
255.23267	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	 Ácido Palmítico

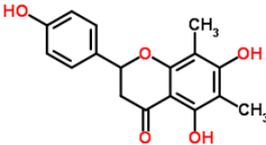
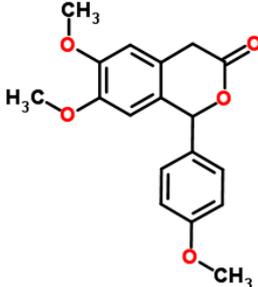
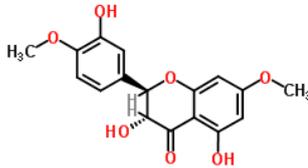
m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
313.10762	C ₁₈ H ₁₇ O ₅	 <p>6,7-Dimethoxy-1-(4-methoxy-phenyl)-isochroman-3-one</p>
325.18367	C ₁₀ H ₂₅ N ₆ O ₆	
339.1993	C ₁₁ H ₂₇ N ₆ O ₆	

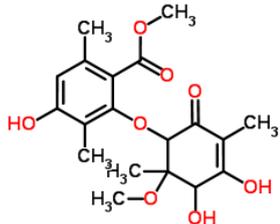
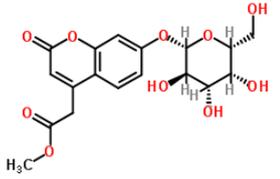
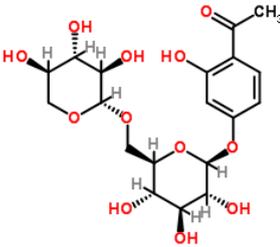
Anexo D - Espectro obtido por RMN evidenciando as principais moléculas encontradas na partição C (clorofórmica) do extrato bruto 19



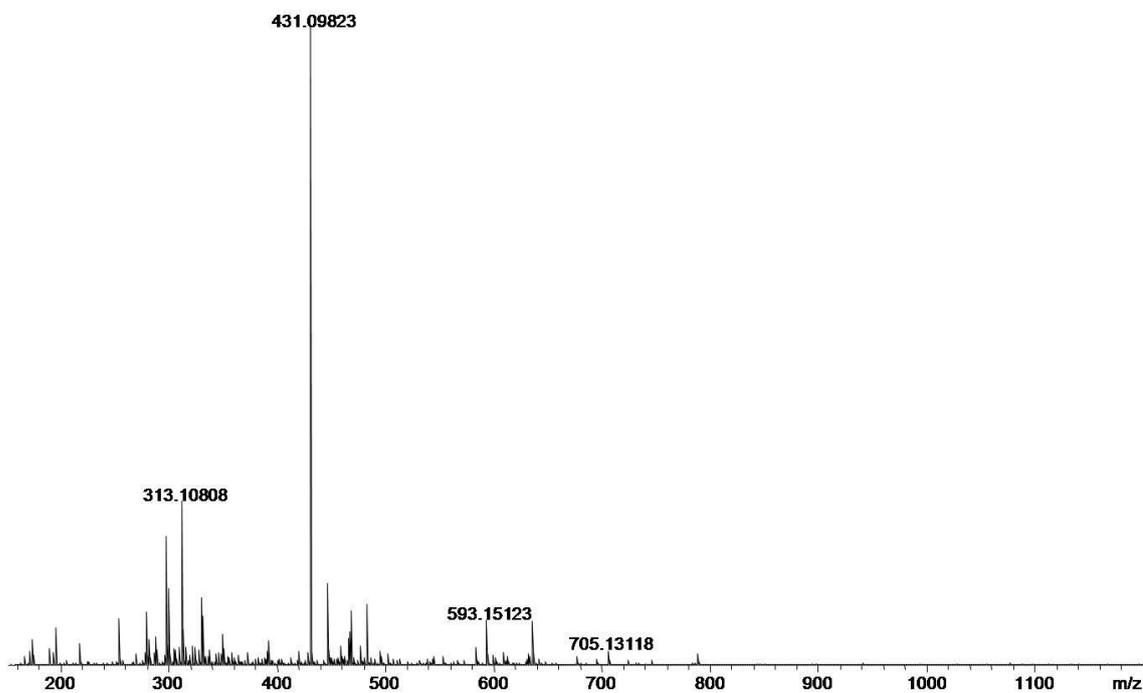
m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
197.04534	C ₉ H ₉ O ₅	 Ethyl gallate
219.05079	C ₈ H ₁₁ O ₇	 2-(2-Ethoxy-2-oxoethyl)-2-hydroxysuccinic acid

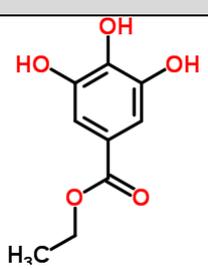
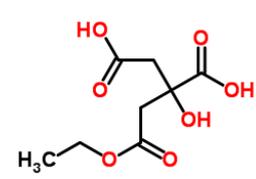
m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
229.07151	C ₁₀ H ₁₃ O ₆	 <p>Dimethyl 2,3-diacetylsuccinate</p>
247.08203	C ₁₀ H ₁₅ O ₇	 <p>4-Ethoxy-2-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-2-hydroxy-4-oxobutanoic acid</p>
255.23267	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	 <p>Ácido Palmítico</p>
265.10783	C ₁₄ H ₁₇ O ₅	 <p>2-(4-Butoxyphenyl)succinic acid</p>

m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
299.0921	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	
309.09756	C ₁₅ H ₁₇ O ₇	Farresol
313.10769	C ₁₈ H ₁₇ O ₅	Ethyl 2,4-dioxo-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)butanoate
331.08184	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	
331.08184	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	(2R,3R)-3,5-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one
		

m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
379.13921	C ₁₉ H ₂₃ O ₈	 <p data-bbox="710 672 1369 784">Methyl 2-[(4,5-dihydroxy-6-methoxy-3,6-dimethyl-2-oxo-3-cyclohexen-1-yl)oxy]-4-hydroxy-3,6-dimethylbenzoate</p>
395.09766	C ₁₈ H ₁₉ O ₁₀	 <p data-bbox="710 1064 1369 1131">Methyl [7-(β-D-galactopyranosyloxy)-2-oxo-2H-chromen-4-yl]acetate</p>
445.13427	C ₁₉ H ₂₅ O ₁₂	 <p data-bbox="710 1433 1369 1509">4-Acetyl-3-hydroxyphenyl 6-O-β-D-xylopyranosyl-β-D-glucopyranoside</p>

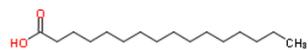
Anexo E - Espectro obtido por RMN evidenciando as principais moléculas encontradas na partição D (aceto-etílica) do extrato bruto 19



m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
197.04549	C ₉ H ₉ O ₅	 Ethyl gallate
219.05098	C ₈ H ₁₁ O ₇	 2-(2-Ethoxy-2-oxoethyl)-2-hydroxysuccinic acid

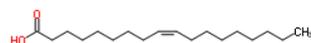
m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
------------	--------------------------------------	-------------------

255.23294 C₁₆H₃₁O₂



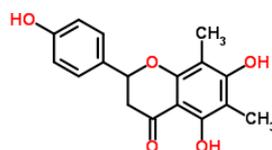
281.2486 C₁₈H₃₃O₂

Ácido Palmítico



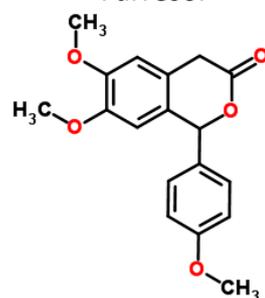
299.09247 C₁₇H₁₅O₅

Ácido Oleico

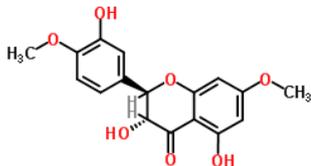
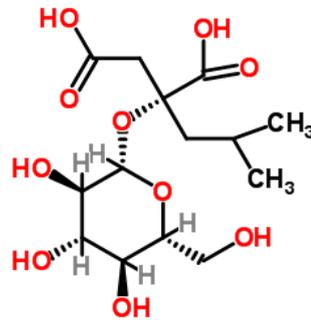
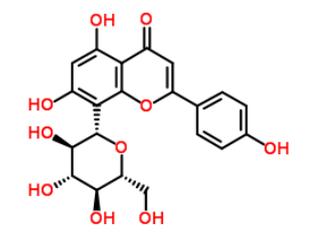
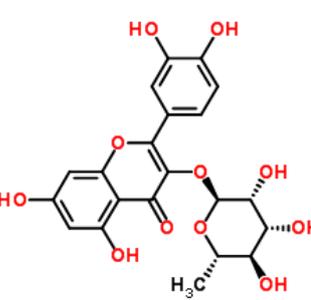


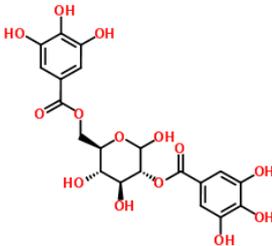
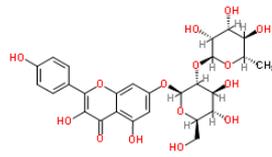
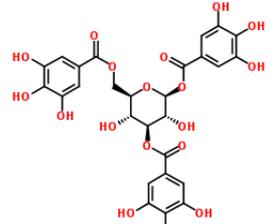
313.10808 C₁₈H₁₇O₅

Farresol



6,7-Dimethoxy-1-(4-methoxy-phenyl)-
isochroman-3-one

m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
331.08231	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	 <p>(2R,3R)-3,5-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-methoxy-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one</p>
351.12974	C ₁₄ H ₂₃ O ₁₀	 <p>(2R)-2-(β-D-Glucopyranosyloxy)-2-isobutylsuccinic acid</p>
431.09823	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	 <p>Vitexina</p>
447.09333	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	 <p>Quercitrina</p>

m/z (exp.)	Fórmula Molecular (M-H) ⁻	Possível Molécula
483.07802	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄	 <p data-bbox="782 672 1276 750">2,6-Bis-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)-D-glucopyranose</p>
593.15123	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	 <p data-bbox="813 1019 1244 1064">Kaempferol-7-neohesperidoside</p>
635.08917	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₈	 <p data-bbox="877 1321 1181 1361">1,3,6-Trigalloyl glucose</p>