



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

MARCELA DE ALMEIDA RABELLO OLIVEIRA

Atividade inibitória de flavonoides metoxilados extraídos *Solanum paludosum* sobre a atividade da enzima topoisomerase II- α , e seus efeitos citotóxicos sobre a linhagem de glioblastoma humano, (GBM02), *in vitro*.

Maceió

2018

MARCELA DE ALMEIDA RABELLO OLIVEIRA

Atividade inibitória de flavonoides metoxilados extraídos *Solanum paludosum* sobre a atividade da enzima topoisomerase II- α , e seus efeitos citotóxicos sobre a linhagem de glioblastoma humano, (GBM02), *in vitro*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira.

Maceió

2018

Ficha catalográfica

Catlogação na fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante

- O48e Oliveira, Marcela de Almeida Rabello.
Efeitos citotóxicos de flavonoides metoxilados extraídos da *Solanum Paludosum* e seus mecanismos de ação sobre a linhagem de glioblastoma humano (GBM-02), *in vitro* / Ana Carolina Santana Vieira. – 2018.
79 f.: il. color. ,grafs., tabs.
- Orientador: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.
- Bibliografia: f. 70-81.
Anexos: f.80-82
1. Glioblastoma humano. 2. Flavonoides. 3. Topoisomerase.
4. Malondialdeído. 5. Peroxidação lipídica. I. Título.

CDU: 616-006

Folha de Aprovação



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Marcela de Almeida Rabello Oliveira

Efeitos citotóxicos de flavonoides metoxilados extraídos da *S. paludosum* e seus mecanismos de ação sobre a linhagem de glioblastoma humano (Gbm02) in vitro.

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 13 de março de 2018.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ênio Jose Bassi - (UFAL)

Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro - (UFAL)

Prof. Dr. Marcelo Duzzioni - (UFAL)

Prof. Dr. Thiago Jose Matos Rocha - (CESMAC)

*Dedico este trabalho ao meu
marido Krerley Oliveira, e filhos, Arthur
e Alice Rabello Oliveira, vocês são minha
inspiração.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS e a tudo que não podemos ver, mas sentir, que colaboraram para que eu caminhasse até aqui.

À Profa. Dra. MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA por abraçar mais um grande desafio científico. Sua vasta experiência profissional e interpessoal aliada à confiança que depositou neste trabalho me fizeram crescer consciente da autonomia que me foi atribuída e com muita responsabilidade. Hoje não sou mais a mesma, me tornei uma cientista, ainda mais questionadora.... Carrego comigo a certeza de que uma parte de mim vai carregar, por toda a minha vida profissional, um pouquinho da sua sabedoria. Muito obrigada por tudo.

À Profa. Dra. TÂNIA MARIA SARMENTO SILVA, pelo auxílio na co-orientação. Agradeço pelo apoio e dedicação neste trabalho;

Ao Prof. VIVALDO MOURA NETO e sua equipe do Instituto Estadual do Cérebro do RJ, pelo suporte científico;

Ao meu marido, KRERLEY OLIVEIRA, pelo incansável suporte pessoal, esportivo e profissional. Meu porto seguro, meu companheiro, muitíssimo obrigada.

Aos meus filhos, meus amores, minha vida.

Ao amigo ANDERSON BRANDÃO LEITE, pela paciência e pela parceria incansável. Obrigada por ter compartilhado tanto conhecimento comigo...

A todos que fazem parte da grande família que compõe o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI), que me ajudaram direta ou indiretamente.

À professora e pesquisadora ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ, pelo suporte profissional, perseverança e paciência nos momentos mais complicados;

Às amigas MAGNA SUZANA e FABIANA ANDREIA MOURA pelo carinho e pelos intermináveis momentos de risos.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pelo ensino e colaboração com a minha formação acadêmica;

À toda a equipe do Laboratório de Estresse Oxidativo, do Instituto de Química e Biotecnologia, UFAL;

À equipe do Laboratório de Química Medicinal, da Escola de Enfermagem e Farmácia, UFAL;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa;

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral de maior malignidade, incurável e altamente resistente ao tratamento medicamentoso. A *Solanum paludosum* Moric é uma espécie pertencente à família das solanáceas, rica em substâncias protetoras, como flavonoides, cujos efeitos antioxidantes, vaso relaxantes e moluscicida já foram descritos na literatura. Neste trabalho, verificou-se os efeitos antitumorais de flavonoides extraídos da *S. paludosum* em cultura de células de GBM humano (GBM02). Foram selecionados três flavonoides que apresentaram maior atividade sobre a redução da viabilidade celular de GBM02, assim como a fração flavonoídica da qual foram isolados. Estes flavonoides assemelham-se estruturalmente com a gossipetina e o kaempferol, apresentando, entretanto, diferentes substituições do tipo metoxila. Os três flavonoides (Sp1, Sp2 e Sp3) e a fração flavonoídica induziram um padrão morfológico típico de morte celular, especialmente Sp1 e Sp2. Para buscar uma possível causa para estes efeitos analisou-se os processos de peroxidação lipídica, através da análise do marcador malondialdeído (MDA) por HPLC-UV, e a atividade da enzima topoisomerase II- α (TOPO II- α) humana, através da análise topológica do plasmídeo kDNA por eletroforese. Foi demonstrado que os tratamentos induziram um aumento nos níveis de MDA, característico do processo de peroxidação lipídica, e apresentaram atividade inibitória sobre a TOPO II- α . Verificou-se através das análises do ciclo celular o aumento na proporção de células em G0/G1 e uma redução em S/G2/M e, por fim, demonstramos redução da mobilidade celular através do ensaio do *scratch* e da organização dos filamentos de actina. Concluiu-se que os tratamentos inibiram a enzima TOPO II- α e provocaram danos permanentes no DNA, levando a célula a parar o ciclo celular em G0/G1 e entrar em apoptose, motivo pelo qual reduziram a capacidade migratória. Os flavonoides Sp1 e Sp2 e a fração apresentaram efeitos citotóxicos sobre o GBM02 superiores ao fármaco padrão, a temozolomida, demonstrando potencial para serem utilizados como modelos estruturais para o desenho de novos compostos líderes antitumorais.

Palavras chave: GBM, flavonoides, topoisomerase, malondialdeído, peroxidação lipídica, kaempferol, gossipetina.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most malignant brain tumor, incurable and highly resistant to drug treatment. *Solanum paludosum* Moric is a species belonging to the Solanaceae family, whose antioxidant, vasorelaxing and molluscicidal effects have already been described in the literature. In this work, we verified the antitumor effects of flavonoids extracted from *S. paludosum* on human GBM cell line (GBM02). Three flavonoids were selected which showed greater activity on the reduction of cell viability of GBM02, as well as the flavonoid fraction from which they were isolated. These flavonoids resemble structurally with gossypetin and kaempferol, however, presenting different methoxyl substitutions. The three flavonoids (Sp1, Sp2 and Sp3) and the flavonoid fraction induced a typical morphological pattern of cell death, especially Sp1 and Sp2. To investigate a possible cause for these effects, we analyzed the lipid peroxidation processes through the analysis of the malondialdehyde (MDA) marker and the activity of the human enzyme topoisomerase II- α (TOPO II- α), through the topological analysis of the kDNA plasmid by electrophoresis. We demonstrated that the treatments induced an increase in MDA levels, characteristic of the lipid peroxidation process, and showed inhibitory activity on TOPO II- α . We verified through the cell cycle analysis the increase in the cell ratio in G0/G1 and a reduction in S/G2/M and, finally, we demonstrated a reduction in cellular mobility through the scratch assay and the organization of the actin filaments. We concluded that the treatments initially inhibited the enzyme TOPO II- α and induced permanent damage in the DNA, causing cell cycle arrest in G0/G1 before enter apoptosis, reason why they reduced the migratory capacity. The literature indicates that the flavonoid methylation process reduces its anti-oxidant capacity; therefore, the lipid peroxidation process possibly occurred due to apoptosis induced by irreparable DNA damage. The Sp1 and Sp2 flavonoids and the fraction had cytotoxic effects on GBM02 higher than the standard drug temozolomide, demonstrating the potential to be used as structural models for the design of new antitumor lead compounds.

Key words: GBM, flavonoids, topoisomerase, malondialdehyde, lipid peroxidation, kaempferol, gossipetin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação dos tumores do Sistema Nervoso Central segundo a Organização Mundial de Saúde, 2016	21
Figura 2 – Estados topológicos do DNA	26
Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides	27
Figura 4 – <i>S. paludosum</i> ou Jurubeba roxa	30
Figura 5 – Esquema para partição do extrato etanólico bruto de <i>S. paludosum</i>	43
Figura 6 – Estrutura química dos flavonoides extraídos da <i>S. paludosum</i>	44
Figura 7 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a viabilidade celular do GBM02	47
Figura 8 – Perfil morfológico das células de GBM02	47
Figura 9 – Efeito dos tratamentos com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a morfologia do GBM02	48
Figura 10 – Efeito dos tratamentos com flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a organização dos filamentos de F-actina do GBM02	50
Figura 11 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a capacidade migratória do GBM02	52
Figura 12 – Efeito dos tratamentos com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a morfologia nuclear do GBM02	53
Figura 13 – Análise da peroxidação lipídica através da determinação do malonaldeído por HPLC-UV	54
Figura 14 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 sobre a topologia do plasmídeo kDNA pHOT1	55
Figura 15 – Interação dos flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 com o sítio de ligação da enzima TOPO II- α	56
Figura 16 – Interações entre Sp1, Sp2, Sp3 e a molécula de ADP no sítio ativo da TOPO II- α	57
Figura 17 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre o ciclo celular do GBM02	58
Figura 18 – Possíveis mecanismos citotóxicos decorrentes do tratamento com Sp1, Sp2 e Sp3 em células de glioblastoma humano, decorrentes de lesão no DNA induzida pela inibição da TOPO II- α	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos tumores do Sistema Nervoso Central segundo a Organização Mundial de Saúde, 2007	19
Tabela 2 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e da temozolomida sobre a da viabilidade celular do GBM02	45
Tabela 3 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e da temozolomida sobre a da viabilidade celular de macrófagos peritoneais	46

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
•OH	Radical hidroxila
ADP	Adenosina difosfatada
Akt	Proteína quinase B
AM1	Austin Model 1
ANOVA	Análise de variância
Asn	Asparagina
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina trifosfatada
ATR	Ataxia telangiectasia mutada relacionada a Rad3
Bak	<i>BCL-2 homologous antagonist/killer</i> (antagonista de morte e homólogo a BCL-2)
Bax	<i>BCL-2 associated X protein</i> (proteína X associada à BCL-2)
BHT	Butil-hidroxitolueno
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Soro albumina bovina
CBTRUS	Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinases</i> (quinase dependente de ciclina)
CLC	Cromatografia líquida em coluna
CO₂	Monóxido de carbono
DAD	Detector de arranjo diódos
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (meio Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DTF	Teoria do funcional de densidade
ERK ½	<i>Extracellular signal–regulated kinase ½</i> (quinase regulada pela sinalização extracelular)
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FFL	Fração flavonoídica
FL	Flavonoide
g	Gramma
GBM	Glioblastoma
GFAP	<i>Glial fibrillary acid protein</i> (proteína ácida fibrilar glial)
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta performance)
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
IDH2	Isocitrato desidrogenase 2
Ile	Isoleucina
IP3	Inositol fosfato
L•	Radical lipídico
Leu	Leucina
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Radical hidroperoxila
m²	Metros quadrados
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
MGMT	O6-metilguanina-DNA metil transferase
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mm³	Metros cúbicos

MQ	Mecânica quântica
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NADPH	Nicotinamida adenina difosfatada
Nf1	Neurofibromatose 1
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
nm	Nanometro
NOS	<i>Not otherwise specified</i> (Não especificado)
O2	Oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (células não tumorais mononucleares periféricas sanguíneas)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de Dados de Proteínas)
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PDGFR-B	<i>Beta-type platelet-derived growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento derivado da plaqueta tipo B)
PIP2	Fosfatidil inositol
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> (homólogo a fosfatase e tensina)
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> (modulador de apoptose super regulado pelo p53)
R•	Espécie reativa
Rb	Retinoblastoma
Rf	Fator de retenção
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i> (desvio do quadrado da média)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD-1	Superóxido dismutase 1

Sp	<i>Solanum paludosum</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (extração em fase solida)
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i> (Atlas Genômico de Câncer)
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TMZ	Temozolomida
TOPO	Topoisomerase
TRX-1	Tiorredoxina 1
ZPE	<i>Zero point energy</i> (ponto de energia zero)
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O glioblastoma	18
2.2 Tratamento do glioblastoma	23
2.3 A topoisomerase: um alvo para a ação de fármacos	25
2.4 O uso de flavonoides e seus efeitos biológicos	27
2.5 A espécie <i>S. paludosum</i> e o uso popular	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 METODOLOGIA	32
4.1 Extração e isolamento dos flavonoides	33
4.2 Ensaio de viabilidade celular	33
4.2.1 Ensaio de viabilidade celular através de brometo de brometo de MTT em células tumorais de GBM02.....	34
4.2.2 Ensaio de viabilidade celular através de MTT em células não tumorais de macrófagos	35
4.2.3 Ensaio de viabilidade celular através da coloração com azul de tripan.....	35
4.3 Análise histológica	36
4.4 Imunocitoquímica	36
4.5 Migração celular através do <i>scratch</i>	37
4.6 Análise da peroxidação lipídica através da determinação do malonaldeído por HPLC-UV	37
4.7 Extração e inibição da topoisomerase II-α	39
4.8 Modelagem computacional	39
4.9 Análise do ciclo celular	41
4.10 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Extração e isolamento dos flavonoides	43
5.2 Análises de viabilidade celular	44
5.2.1 Análises de viabilidade celular através do MTT em células tumorais de GBM02.....	44
5.2.2 Análises de viabilidade celular através do MTT em células não tumorais de macrófagos	45

5.2.3 Análises de viabilidade celular através da coloração com azul de tripan	46
5.3 Análise histológica	47
5.4 Imunocitoquímica	49
5.5 Análise da mobilidade celular através do ensaio do <i>scratch</i>	51
5.6 Análise da morfologia nuclear com DAPI	51
5.7 Análise da peroxidação lipídica através da determinação do MDA por HPLC-UV ..	53
5.8 Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 sobre o envelhecimento do DNA	54
5.9 Análise da interação entre os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 e a enzima TOPO II-α por <i>Docking</i> molecular	55
5.10 Efeito dos tratamentos com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre o ciclo celular do GBM02	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral de origem glial de maior malignidade, incurável e altamente resistente ao tratamento medicamentoso (LIMA et al, 2012). É classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a manifestação mais agressiva dentre os astrocitomas por apresentar neoangiogênese, necrose e grande atividade mitótica e proliferativa (LOUIS et al., 2007). Segundo as informações de registro de base hospitalar de câncer do Instituto Nacional do Câncer (INCA,2016), foram identificados 9 mil casos com perfil histológico de glioblastoma nas unidades hospitalares do Brasil no período de 2010 a 2016.

De acordo com o INCA (2016), os gliomas representam 40 a 60% dos tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC), manifestando-se de forma preponderante no sexo masculino e na faixa etária adulta. As causas dos tumores do SNC ainda não foram completamente esclarecidas, entretanto reconhece-se que a irradiação terapêutica pode ser um provável fator. Trabalhadores do setor de radiologia, indústria nuclear e minas subterrânea podem apresentar mais chance de apresentar esta classe de tumores por estarem mais expostos a radiação. As taxas de incidência destes tipos de tumores aumentam quanto maior o nível socioeconômico, possivelmente devido ao melhor acesso ao diagnóstico. O INCA estima que em 2016 haja 5.440 casos novos de câncer do SNC em homens e 4.830 em mulheres, ou seja, 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

Em 2005, a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização da temozolomida (TMZ) (Temodar[®]) como fármaco padrão para o tratamento do GBM, que consiste na remoção cirúrgica, sempre que possível, seguida de radioterapia concomitante ao uso da temozolomida, seguida de temozolomida adjuvante. A associação da TMZ à radioterapia como tratamento representou uma melhora de apenas 2,5 meses na expectativa de vida comparativamente à utilização apenas da radioterapia (COHEN; JOHNSON; PAZDUR, 2005; STUPP et al., 2005). A sobrevida média dos pacientes diminui progressivamente com o aumento da idade, variando entre 18,5 meses para aqueles com idade entre 20 e 44 anos, a 3,5 meses em idosos com mais de 80 anos (OSTROM et al., 2013). A formação de edema também contribui para a alta mortalidade do GBM, pois pode levar à compressão de áreas cerebrais vitais, fazendo-se necessária a inclusão de corticoides no tratamento padrão (DUBOIS et al., 2014; SINHA et al., 2004). Assim, atualmente não existe tratamento efetivo para o GBM, se tornando extremamente necessário o desenvolvimento de novos fármacos.

A grande diversidade molecular dos compostos isolados a partir de produtos naturais é bastante importante para a química medicinal, pois possibilita atingir alvos moleculares variados e podem servir como modelo estrutural para síntese de análogos mais potentes. A exemplo, a quinina, isolada a partir da casca de espécies do gênero *Cinchona*, foi utilizada para o tratamento da malária, e serviu como base para a síntese da cloroquina e mefloquina, assim como a artemisina, a partir da *Artemisia annua* L.; a reserpina é um anti-hipertensivo isolado da raiz da *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz; a efedrina, a partir da *Ephedra sinica* Stapf, serviu como base para síntese de fármacos β -agonistas como o salbutamol (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Diversos fármacos antitumorais utilizados clinicamente são derivados de produtos naturais. A vimblastina e a vincristina são alcaloides desestabilizadores de microtúbulos derivados da *Catharanthus roseus* (L.) G.Don utilizados para o tratamento de linfoma Hodgking e teratoma testicular; o paclitaxel (Taxol[®]), um estabilizador de microtúbulos, é obtido a partir da espécie *Taxus brevifolia* Nutt., amplamente utilizado para o tratamento do câncer de mama e ovário (CRAGG; NEWMAN, 2013; MANN, 2002).

Além dos microtúbulos, que desempenham papel fundamental no processo mitótico, outro promissor alvo molecular importante para os antitumorais é a enzima topoisomerase (TOPO). A camptotecina, um inibidor da topoisomerase I (TOPO I), foi isolado da espécie *Camptotheca acuminata* Decne. e serviu como modelo estrutural para os análogos semissintéticos topotecano, irinotecano e belotecano. O etoposídeo e o teniposídeo, inibidores da topoisomerase II- α (TOPO II- α), são derivados semissintéticos da epipodofilotoxina, extraída da espécie *Podophyllum peltatum* L. (CRAGG; NEWMAN, 2013; MANN, 2002).

Inibidores de topoisomerase são compostos disponíveis para uso clínico utilizados na terapia anticâncer. As topoisomerasas apresentam mecanismo catalítico semelhante, no qual resíduos ativos de tirosina desta enzima atacam covalentemente a ligação fosfodiéster do ácido desoxirribonucleico (DNA), provocando uma quebra transiente no DNA, relaxando assim essa molécula (CHEN; CHAN; HSIEH, 2013; KIRKEGAARD; WANG, 1985; WANG, 2002). A TOPO II- α interage com a fita dupla para relaxar o DNA superenovelado através da quebra transiente de uma das fitas duplas, permitindo que a outra passe através dessa abertura, em presença de ATP e Mg^{+2} (DEWEESE; OSHEROFF, 2010; LINDSLEY; WANG, 1991, 1993; MCCLENDON; OSHEROFF, 2007; NITISS, 2009a; SISSI; PALUMBO, 2009).

O aumento da expressão da TOPO II em células de GBM humano (KENIG et al., 2016; SONABEND et al., 2014) aliado ao conhecido efeito desta enzima sobre o processo de proliferação celular tornam a busca por compostos que possuam esta enzima como alvo

interessante do ponto de vista farmacológico. Compostos que apresentem menor toxicidade e ação antitumoral seletiva tornam-se promissores para o desenvolvimento de protótipos que possam combater o GBM.

Diante da notória relevância clínica dos efeitos antitumorais de inibidores da enzima TOPO II- α e da necessidade de se descobrir novos compostos que aumentem a expectativa de vida de pacientes acometidos do tumor cerebral de maior malignidade, o GBM, o objetivo desse estudo foi investigar o potencial efeito antitumoral de flavonoides isolados da *Solanum paludosum* Moric. em linhagem de GBM humano.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O glioblastoma

O GBM é o tumor maligno mais comum que acomete o SNC. De acordo com o Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS) 2017, 47,1% das manifestações malignas do SNC são de GBM; sua incidência acomete 3,2 a cada 100.000 pessoas e aumenta com a idade, sendo menos comum em crianças e maior em pessoas com 79 a 84 anos. A sobrevivência relativa é baixa, apenas 5,5% dos pacientes sobrevivem 5 anos após o diagnóstico (OSTROM et al., 2017).

Até o ano de 2016, quando foi publicada a quinta edição atualizada da classificação de tumores do SNC pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a classificação dos tumores malignos cerebrais era realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS no ano de 2007 (quarta edição), os quais tomam como referência apenas as características histopatológicas e as similaridades moleculares de cada tipo de lesão. A caracterização dos tipos de tumores era realizada através de técnicas de histoquímica e/ou por meio de imunohistoquímica, utilizando anticorpos para marcadores moleculares específicos (LOUIS et al., 2007; PERRY; WESSELING, 2016). Os tumores de origem glial compreendem um grupo de tumores cerebrais que são classificados conforme o tipo de célula normal com a qual apresentam semelhanças morfológicas e moleculares, por exemplo, os astrocitomas são tumores de origem glial que se assemelham a astrócitos, e oligodendrogliomas se assemelham a oligodendrócitos.

De acordo com a quarta edição, os astrocitomas são classificados em graus de I a IV de acordo com padrões histológicos, a atividade mitótica e presença de angiogênese ou necrose, conforme a escala de malignidade de cada um, sendo o GBM classificado como astrocitoma grau IV, conforme **Tabela 1** a seguir (LOUIS et al., 2007).

Tabela 1 – Classificação dos tumores do Sistema Nervoso Central segundo a Organização Mundial de Saúde, 2007

Grau I	Astrocitoma pilocítico	Baixo potencial proliferativo e possibilidade de cura após remoção cirúrgica.
Grau II	Astrocitoma difuso	Difusamente infiltrativo, baixa atividade mitótica, atipias citológicas isoladas e anaplasia. Podem progredir para tumores mais malignos, como astrocitomas anaplástico ou GBM.
Grau III	Astrocitoma Anaplástico	Evidências histológicas de malignidade: atipia nuclear e aumento da atividade mitótica.
Grau IV	GBM	Citologicamente maligno, intensa atividade mitótica, necrose, angiogênese. Fatal, não apresenta tratamento disponível.

Fonte: LOUIS et al., 2007.

A atual classificação da OMS agrupa todos os gliomas difusos infiltrantes em um único grupo, incluindo aqueles de origem astrocítica, oligodendroglial e os mistos (astrocíticos e oligodendrogliais); o astrocitoma pilocítico, antes classificado como astrocitoma grau I, não pertence mais ao grupo dos gliomas difusos, passando a ser classificado como outro tipo de tumor astrocítico. A nova classificação inicia a partir dos gliomas difusos infiltrantes grau II, que possuem baixa atividade mitótica e não apresentam necrose e nem proliferação microvascular; grau III são os gliomas difusos anaplásticos que apresentam maior atividade mitótica; grau IV é o GBM, que apresenta intensa atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose (LOUIS et al., 2016; PERRY; WESSELING, 2016). As lesões menos malignas, graus II e III, podem recorrer de forma mais agressiva, com perfil de GBM que, nesta situação, pode ser chamado de GBM secundário, enquanto aquelas que surgem sem precedente de lesão anterior, são conhecidas como GBM primário (KLEIHUES; OHGAKI, 1999; SCHERER, 1940).

A classificação dos tumores conforme critérios estabelecidos é de fundamental importância para o prognóstico, cuidados e tratamento dos pacientes, entretanto os critérios histopatológicos e moleculares muitas vezes podem se tornar imprecisos, especialmente diante da heterogeneidade celular e da complexidade biológica de determinados tumores, como o GBM, e da limitação do tamanho da amostra obtida por meio de biópsia, dificultando desta forma a adequada classificação do tumor de acordo com esses critérios (PERRY; WESSELING, 2016). A atual classificação acrescentou ainda o perfil genético aos critérios classificatórios, integrando de maneira complementar os parâmetros genéticos moleculares aos

parâmetros histológicos, a fim de aumentar a objetividade da classificação, melhorar a precisão dos resultados, o prognóstico e a resposta dos pacientes ao tratamento (LOUIS et al., 2016; PERRY; WESSELING, 2016).

Parsons e cols. (2008) verificaram através de sequenciamento genético de amostras de GBM removidos de pacientes e de xenotransplante em camundongos a presença de mutações na enzima isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), cuja função é catalisar a carboxilação do isocitrato a α -cetoglutarato, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, resultando na produção de NADPH. As mutações verificadas neste estudo ocorreram em quase todos os pacientes jovens diagnosticados com GBM secundário, os quais apresentaram maior sobrevida (3,8 anos) comparativamente ao grupo que não apresentava mutação em IDH1 (1,1 anos de sobrevida). Este estudo sugeriu que a presença de mutação na enzima IDH1 poderia ser um marcador específico para o GBM secundário.

Com base em estudos de *screening* genético, a nova classificação passou a considerar 3 classes de gliomas difusos, de acordo com a presença de mutações nas enzimas isocitrato desidrogenase 1 ou 2 (IDH1 ou IDH2, respectivamente), podendo ser: IDH1 ou IDH2 mutantes; IDH *wild type*, sem apresentar mutação nestas enzimas; ou não especificado (NOS – *Not otherwise specified*), que representa um grupo de lesões que ainda não foram completamente definidas dentro dos parâmetros já determinados (LOUIS et al., 2016; PERRY; WESSELING, 2016).

Desta forma, o GBM é classificado como glioma difuso infiltrante grau IV, que apresenta intensa atividade mitótica, angiogênese, necrose e heterogeneidade celular. De acordo com a OMS, é possível utilizar adicionalmente a presença de mutação na enzima IDH1 para complementar a classificação histopatológica, sendo GBM *wild type*, refere-se a lesões primárias; GBM IDH1 mutante, refere-se à lesões secundárias; GBM NOS, sem classificação encontrada nos parâmetros já estabelecidos, conforme ilustrado na **Figura 1** (LOUIS et al., 2016). Vale destacar que, mesmo com a nova classificação de 2016, ainda se verifica a utilização da nomenclatura anterior, astrocitoma grau V.

Figura 1 – Classificação dos tumores do Sistema Nervoso Central segundo a Organização Mundial de Saúde, 2016



Fonte: Autora, 2018.

Para compreender os tipos celulares que podem iniciar a formação de gliomas, estudos utilizam recursos de manipulação genética que permitam suprimir ou ativar determinados genes que possam desencadear o início da oncogênese em um tipo celular específico. Llaguno e cols. (2010) silenciaram os genes supressores de tumor p53, neurofibromatose tipo1 (Nf1) e homólogos à tensina e fosfatase (PTEN - *phosphatase and tensin homolog*) através da injeção da enzima *cre recombinase*, a qual catalisa a recombinação de determinados segmentos do DNA, inibindo a síntese de proteínas que estejam sob o domínio de um promotor específico. Neste estudo, verificaram que a tumorigênese se iniciou a partir de regiões neurogênicas em células tronco e progenitoras, se difundindo para outras regiões vizinhas, com um perfil histopatológico semelhante a astrocitoma graus III e IV (GBM).

Jacques e cols. (2010) confirmaram esses resultados a partir do silenciamento dos genes supressores de tumor retinoblastoma (Rb), p53 e PTEN em diferentes combinações (Rb/p53, Rb/p53/PTEN, p53/PTEN), em diferentes regiões cerebrais (neurogênicas ou não), demonstrando que a supressão dos genes na zona subventricular também provocou a oncogênese em células tronco e/ou progenitoras gliais, dando origem a tumores com perfis histopatológicos diferentes a depender do padrão de genes silenciados, podendo ser de origem neuroectodérmica ou glial.

Para confirmar o papel das células tronco/progenitoras ou de astrócitos no desenvolvimento da tumorigênese, estudos foram realizados a partir de cultura de células

isolando-se dois tipos celulares do cérebro de camundongos, separadamente: neurosféricas obtidas a partir da zona subventricular, ou astrócitos isolados do prosencéfalo. Após o silenciamento dos genes p53, PTEN, Rb em culturas de neurosféricas ou de astrócitos e a posterior injeção destes tipos celulares no cérebro de camundongos, separadamente, verificou-se que ocorreu a formação de tumores malignos apenas nos animais injetados com as neurosféricas, confirmando que as células tronco/progenitoras são, de fato, responsáveis pela formação tumoral neste modelo, e não os astrócitos adultos (JACQUES et al., 2010).

Os estudos acima descritos demonstram claramente o papel das células tronco/progenitoras no desenvolvimento de gliomas, entretanto o papel desempenhado pelos astrócitos ainda não foi completamente esclarecido. Dai e cols. (2001) demonstraram em modelo animal que a indução do aumento da expressão do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), estimulado de maneira autócrina, induziu a formação de oligodendrogliomas ou de gliomas mistos em células positivas para a proteína glial ácida fibrilar (GFAP). Chow e cols. (2011) silenciaram Tp53, Rb, PTEN em camundongos adultos, e verificaram a tumorigênese em regiões neurogênicas e não neurogênicas, em células GFAP positivas, sugerindo que astrócitos maduros também poderiam originar tumores gliais. Células tronco/progenitoras localizadas em regiões germinativas são marcadas por GFAP, entretanto essa marcação em regiões como cerebelo e córtex, por exemplo, não são sugestivas de células indiferenciadas, mas sim de astrócitos maduros, visto que estas regiões não são consideradas germinativas. Apesar de outros estudos indicarem que astrócitos maduros também podem se diferenciar em gliomas, se torna difícil diferenciar progenitores de astrócitos maduros, visto que todos são GFAP positivos. Ainda que haja marcação em regiões não neurogênicas, não foi possível esclarecer até o momento se essas células são de fato astrócitos maduros ou se são progenitoras residentes ou que migraram a partir de regiões germinativas (CHOW et al., 2011).

As células progenitoras de oligodendrócitos também podem desempenhar um papel relevante na gliomagenese, visto que continuam a se dividir lentamente em cérebros adultos (ZONG; PARADA; BAKER, 2015). Galvão e cols. (2014) demonstraram que a supressão de p53 e Nf1 em células progenitoras de oligodendrócitos em cérebros de camundongos adultos levava a formação de tumores com perfil semelhante ao GBM humano; Lindberg e cols. (2014) demonstraram em modelo animal que a indução de tumor através da supressão de p16^{Ink4a}/p19^{Arf} em células precursoras de oligodendrócitos também pode gerar tumor com padrão histológico de oligodendroglioma ou astrocitoma, graus III ou IV.

Desta forma, diferentes tipos celulares podem iniciar a gliomagenese em modelos experimentais com animais e em cultura de células: as células tronco neurais, astrócitos e

células progenitoras de oligodendrócitos. Todos os tipos celulares descritos apresentam uma característica comum, capacidade proliferativa ao longo da vida (ZONG; PARADA; BAKER, 2015).

2.2 Tratamento do glioblastoma

Um dos grandes desafios àqueles que trabalham com o desenvolvimento ou a descoberta de fármacos antitumorais é encontrar protótipos eficazes para o tratamento do GBM. A heterogeneidade molecular associada ao grande número de mutações genéticas presentes neste tumor torna extremamente difícil encontrar um alvo molecular específico para o desenvolvimento de um protótipo. A diversidade de mutações presentes no GBM levou Parsons e cols. (2008) e Verhaak e cols. (2010) a analisarem geneticamente o perfil do GBM e a definir subclasses com base no perfil genético encontrado. Estes estudos demonstraram alterações nos genes relacionados às vias do TP53, Rb e PTEN/PI3K em pelo menos 50% dos tumores analisados, bem como a existência de mutações na enzima IDH1 preferencialmente em pacientes jovens com GBM secundário, as quais conferem prognóstico mais positivo do que aqueles que não apresentaram mutação nesta enzima.

O conhecimento do perfil genético é importante para o estabelecimento da terapia individualizada com base no perfil mutacional de cada tumor, entretanto o desafio do desenvolvimento de novos protótipos que atendam estas necessidades permanece, visto que existem mutações que afetam diversas vias simultaneamente. A possibilidade de desenvolvimento de um novo protótipo, eficaz para diferentes vias moleculares ou eficaz num sistema molecular essencial para a sobrevivência do tumor, permanece um desafio.

A obtenção de um perfil molecular individualizado para o tratamento do GBM se torna difícil atualmente em função do alto custo, da disponibilidade de equipamentos específicos nos hospitais ou laboratórios, da padronização dos métodos e de protocolos individualizados de acordo com o perfil molecular de cada tipo de tumor, tornando desta forma este tipo de terapia indisponível no momento.

Stupp e cols. (2005) realizaram uma pesquisa multicêntrica em colaboração com a *European Organization for Research and Treatment of Cancer* e o *National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*, com 573 pacientes distribuídos em 15 países da Europa e Canadá, no qual desenvolveram o protocolo atual do tratamento padrão ouro para o GBM. Este estudo demonstrou que a utilização de temozolomida associada à radioterapia aumentou a sobrevivência média dos pacientes de 12,1 para 14,6 meses, comparativamente ao grupo que

recebeu apenas radioterapia. Foi verificado ainda que a taxa de sobrevivência de 2 anos aumentou de 10,4% no grupo que recebeu apenas radioterapia para 26,5% no grupo recebeu radioterapia e temozolomida. Em um acompanhamento médio de 28 meses destes pacientes, 84% dos pacientes morreram. O tratamento padrão utilizado, atualmente considerado o padrão para o tratamento do GBM, foi 75 mg/m² de temozolomida concomitante às sessões de radioterapia, por um período de até 49 dias, seguido de 30 dias de descanso. Após este período, acrescenta-se até 6 ciclos de temozolomida adjuvante, com doses crescentes de 150 a 200 mg/m², por 5 dias, a cada 28 dias. As principais complicações decorrentes do tratamento foram hematológicas, como trombocitopenia em 11% dos pacientes que receberam temozolomida adjuvante, e náusea (STUPP et al., 2005).

A sobrevivência média dos pacientes está relacionada ao período no qual o paciente iniciou o tratamento até a morte, abrangendo os casos nos quais houve remissão seguida de recorrência; nesta situação, a critério do médico, os pacientes podem ser tratados com outros agentes quimioterápicos de segunda linha (STUPP et al., 2005)

Baseado nesses resultados, em 2005, a *U.S Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização da temozolomida (Temodar®, Schering-Plough) concomitante a radioterapia, seguida do tratamento de manutenção com a temozolomida, para o tratamento do GBM (COHEN; JOHNSON; PAZDUR, 2005).

Os pacientes do estudo acima citado foram acompanhados por 5 anos em um estudo longitudinal, até o ano de 2009. Aqueles que possuíram melhores prognósticos, especialmente os mais jovens, apresentaram mais chance de sobreviver até 5 anos de tratamento. Dentre o grupo que recebeu temozolomida e radioterapia apenas 5,6 % sobreviveu por 4 anos e 4,1% por 5 anos, enquanto os que receberam somente a radioterapia 1,3% sobreviveu por 4 anos e 1,3% por 5 anos (STUPP et al., 2009).

A temozolomida é um agente alquilante que pertence à classe dos imidazotetrazinas, cuja principal atividade antitumoral é a metilação da guanina no DNA, a qual provoca um efeito citotóxico na célula levando a apoptose (NEWLANDS et al., 1997). Um dos mecanismos de resistência ao tratamento com agentes alquilantes, como a temozolomida, é o mecanismo de reparo do DNA realizado por uma enzima produzida pelo gene O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), a qual remove grupamentos alquil da posição O6 da guanina no DNA. Hegi e cols. (2005) determinaram o status de metilação de 206 pacientes provenientes do mesmo grupo do estudo de Stupp e cols. (2005) e verificaram que, aqueles que apresentaram metilação no promotor do MGMT, reduziram em 55% o risco de morte e que os pacientes que receberam temozolomida e radioterapia apresentaram um aumento na sobrevivência média para

21,7 meses. Apesar da temozolomida aumentar modestamente a sobrevida dos pacientes, nem todos se beneficiam dos seus efeitos, visto que é mais eficiente em pacientes com bons prognósticos e naqueles que apresentam mutação no promotor do MGMT (HEGI et al., 2005).

A descoberta de novos protótipos para combater este tipo de tumor se faz extremamente necessária, visto que não há fármacos disponíveis que levem a completa remissão tumoral ou mesmo que aumentem a sobrevida de todos os pacientes.

2.3 A topoisomerase: um alvo para a ação de fármacos

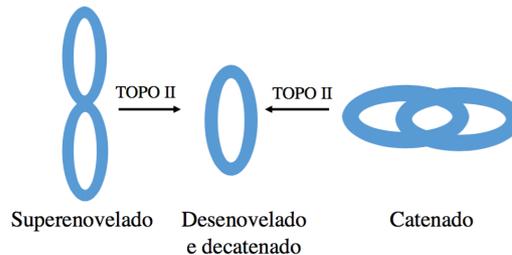
O DNA é o material genético da célula, o qual carrega as informações que serão transmitidas na reprodução celular e na formação de novos indivíduos. O genoma completo de uma célula encontra-se empacotado dentro do núcleo de forma compacta, topologicamente chamado de superenovelado (VOLOGODSKII; COZZARELLI, 1994).

Durante os processos de transcrição ou replicação, a abertura das fitas do DNA pelo complexo polimerase-helicase provoca o superenovelamento nas regiões flanqueadas (RICHMOND; DAVEY, 2003). As topoisomerase são enzimas nucleares que desempenham papéis essenciais na replicação do DNA, na transcrição, na segregação cromossômica e na recombinação, pois controlam o estado topológico do DNA nas células, sendo responsáveis pelo relaxamento do DNA superenovelado. Apresentam mecanismo catalítico semelhante, no qual resíduos ativos de tirosina da enzima atacam covalentemente a ligação fosfodiéster do DNA, provocando uma quebra transiente na molécula, que é seguida pela religação das terminações clivadas e liberação da enzima (CHEN; CHAN; HSIEH, 2013; WANG, 2002).

A topoisomerase do tipo I atua de forma independente de adenosina trifosfatada (ATP) na abertura da cadeia simples de DNA e pode ser subdividida em dois subgrupos: a enzima do tipo IA, que é homóloga à enzima topoisomerase I de *Escherichia coli*, e a enzima do tipo IB, homóloga à topoisomerase I humana. A topoisomerase do tipo II (TOPO II) atua no relaxamento e na decatenação do DNA superenovelado (**Figura 2**), processos provocados pela abertura das fitas de DNA durante o processo de replicação, e está subdividida em dois subgrupos: TOPO II- α , que é relacionada ao processo de segregação cromossômica e aumenta sua expressão nos períodos de proliferação celular, e a TOPO II- β , a qual é envolvida nos processos de desenvolvimento e diferenciação cerebral. Além das TOPO I e TOPO II, a família das enzimas topoisomerase inclui ainda a TOPO III e a TOPO IV, sendo esta última descrita para uma única espécie de arquea *Methanopyrus kandleri* (CHEN; CHAN; HSIEH, 2013; FORTERRE et al., 2007; WANG, 2002).

A enzima TOPO II promove uma quebra transitória na cadeia dupla de DNA, permitindo que a fita íntegra passe através desta abertura, necessitando de ATP e Mg^{2+} para que sua atividade catalítica ocorra (LINDSLEY; WANG, 1991, 1993; NITISS, 2009b).

Figura 2 – Estados topológicos do DNA



Fonte: Autora, 2018.

Nota: A enzima TOPO II é responsável pelo processo de desenovelamento e decatenação do DNA, provocados pela abertura da dupla fita DNA nos processos de replicação e transcrição.

Os inibidores de TOPO II podem atuar de duas formas distintas: reduzindo a atividade catalítica da enzima ligando-se diretamente a ela e impedindo a formação do complexo de clivagem, por este motivo sendo conhecidos como inibidores catalíticos da topoisomerase; ou estabilizando o complexo de clivagem e provocando a quebra permanente da cadeia dupla do DNA, podendo levar a célula a apoptose, desta forma, são conhecidos como venenos para topoisomerase (BURDEN; OSHEROFF, 1998).

Vários quimioterápicos atuam como venenos para a TOPO II e são utilizados para o tratamento do câncer, tais como o câncer de mama, pulmão, sarcoma e diversos tipos de linfomas e leucemias. Os venenos para a TOPO II exercem sua ação através de dois mecanismos diferentes: impedindo que a enzima religue os segmentos de DNA que foram clivados, como fazem o etoposídeo, a amsacrina, a mitoxantrona e a doxorubicina; ou aumentando a formação do complexo de clivagem, como fazem a elipticina, o genisteína e as quinolonas (BURDEN; OSHEROFF, 1998; NITISS, 2009a).

Compostos naturais com ação sobre esta enzima demonstram efeito preventivo contra o câncer e menor toxicidade. Estudos demonstram que o alto consumo da soja pela população oriental pode exercer um efeito protetor contra o câncer de mama e de próstata, sugerindo-se que a genisteína, uma isoflavona derivada da soja, seja responsável por esse efeito protetor (BARNES; PETERSON; COWARD, 1995). A genisteína, dentre outros flavonoides, também

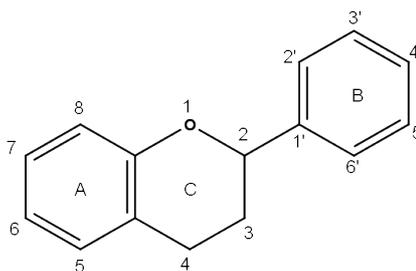
apresenta atividade inibitória sobre a atividade da enzima TOPO II (FUJII et al., 1992; WENG; HO; LIN, 2005).

Em linhagens de GBM, a literatura aponta que os flavonoides apresentam atividade antitumoral, destacando-se seus efeitos antiproliferativos e pro-apoptóticos (BRAGANHOL et al., 2006; SANTOS et al., 2015; WENG; HO; LIN, 2005). Um dos alvos moleculares destes compostos é a enzima topoisomerase (RUSSO; DEL; CESARIO, 2012). A shikonina apresenta ação inibitória sobre a ação da enzima TOPO II isolada do timo de bezerro, reduzindo a formação do complexo de clivagem do DNA (FUJII et al., 1992); a genisteína, em linhagem de câncer de cólon, a luteolina e a quercetina em extratos de células de ovário de hamster, também apresentaram efeito sobre a ação da enzima TOPO II, sugerindo que essa classe de compostos pode servir como modelo estrutural para o desenho de fármacos antitumorais com atividade sobre esta enzima (CANTERO, 2006; SALTI et al., 2000).

2.4 O uso de flavonoides e seus efeitos biológicos

Flavonoides são compostos polifenólicos encontrados em frutas, grãos, raízes, cascas, chá e vinho. Sua estrutura química básica compreende 2 anéis benzeno (A e B) ligados por 1 anel pirano heterocíclico (C), conforme ilustrado na **Figura 3**. Os flavonoides podem ser divididos em subgrupos de acordo com a posição e com o tipo de ligação que ocorre entre os anéis pirano (C) e benzeno (B), desta forma, isoflavonas são flavonoides cuja ligação ocorre na posição 3 e neoflavonoides na posição 4. Aqueles cujo anel B se liga à posição 2 podem ser subdivididos em vários grupos, de acordo com a estrutura química, que geralmente varia com o acréscimo de grupos hidroxila, metila, acetila ou de glicosídeos à estrutura básica dos flavonoides, sendo eles: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonois, flavanóis ou catequinas, antocianinas e chalconas (KUMAR; PANDEY, 2013; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: Autora, 2018.

Nota: Flavonoides são representados por dois anéis benzeno (A) e (B) ligados por um anel pirano heterocíclico.

Os flavonoides apresentam diversas propriedades biológicas bem descritas na literatura, que podem variar de acordo com as alterações em sua estrutura química, por exemplo, a configuração da hidroxila está relacionada a capacidade antioxidante, quanto mais grupamentos hidroxila, maior a reatividade do flavonoide; a metilação confere planaridade à molécula e está relacionada à lipofilicidade, facilitando a ação antioxidante nas membranas lipídicas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

As propriedades antioxidantes dos flavonoides incluem: inibição de enzimas pro oxidantes, como a xantina oxidase, uma das enzimas responsáveis pela produção do ânion radical superóxido; capacidade de quelar íons metálicos, evitando a formação de radicais hidroxila, como ocorre na reação de Fenton; sequestro de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio já formadas; estímulo a defesa antioxidante enzimática e não enzimática; e, por fim, inibição do dano oxidativo às macromoléculas (lipídios, proteínas e DNA) (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994; KORKINA; AFANAS'EV, 1996; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

A ingestão de uma dieta rica em flavonoides exerce um efeito protetor para doenças cardiovasculares, melhorando, desta forma, as condições de saúde do indivíduo (KIM; VANCE; CHUN, 2016). Os flavonoides também desempenham papel no combate a diversas doenças, como as neurodegenerativas, diabetes e câncer. Diversos mecanismos de ação, *in vitro* e *in vivo*, têm sido propostos para explicar esse efeito protetor, tais como atividade anti-acetilcolinesterase, fundamental no controle do Alzheimer, doença caracterizada pela deficiência do neurotransmissor acetilcolina e pela formação da placa β -amiloide (KHAN et al., 2009); capacidade protetora contra os efeitos induzidos pela exposição da célula a altos níveis de glicose, como por exemplo, a redução dos receptores e da sinalização da insulina, e redução dos receptores de glicose tipo 2 (GLUT-2), promovendo melhora à sensibilidade à insulina (CORDERO-HERRERA et al., 2014); modulação da atividade inflamatória induzida por lipopolissacarídeo, reduzindo os efeitos provocados pelo aumento do NF- κ B e da infiltração de neutrófilos no pulmão de camundongos (CARDENAS et al., 2016).

As propriedades anticancerígenas dos flavonoides têm sido descritas na literatura e estão relacionadas, principalmente, aos seus efeitos antiproliferativos e antioxidantes. Diversas vias de ação têm sido propostas para explicar tais propriedades, dentre elas, a inibição de proteínas quinase que transduzem o sinal mitogênico para o núcleo; inibição de enzimas que regulam a progressão do ciclo celular, como as ciclinas dependentes de kinases (CDKs), que encontram-se desreguladas na tumorigênese; a inibição da enzima topoisomerase, impedindo o desenovelamento da dupla fita de DNA, e, por fim, a inibição da angiogênese, a qual facilita o

crescimento tumoral (RAVISHANKAR et al., 2013; SINGH; AGARWAL, 2006). A exemplo, a baicaleína associada a silimarina apresenta efeito citotóxico e retarda a progressão do ciclo celular em células de hepatocarcinoma humano (CHEN et al., 2009); o suco de maçã do tipo Pelingo, que possui alto conteúdo de polifenóis, apresenta atividade antiproliferativa em linhagens de câncer de mama humano retardando o ciclo celular e inibindo a sinalização da ERK $\frac{1}{2}$, a qual está envolvida com a progressão do ciclo e com a proliferação celular (SCHIAVANO et al., 2015).

Diversos flavonoides apresentaram atividade antitumoral em linhagens de GBM humano. A quercetina apresenta efeitos antiproliferativo, indutor de apoptose, redutor da progressão do ciclo celular, além de apresentar ação neuroprotetora em cultura organotípica de hipocampo submetido a dano isquêmico (BRAGANHOL et al., 2006). A rutina também inibe a proliferação celular, reduz a viabilidade e a progressão do ciclo celular, induzindo a apoptose em linhagem de GBM humano (SANTOS et al., 2011). Santos e cols. (2015) demonstraram os mesmos efeitos em diversos tipos de flavonoides e, ainda, redução da capacidade migratória celular.

Como resultado dos seus efeitos benéficos à promoção da saúde bem como no tratamento de doenças, o estudo acerca da ação dos flavonoides torna-se promissor para o desenvolvimento de protótipos antitumorais que apresentem menor toxicidade e maior eficiência.

2.5 A espécie *S. paludosum* e o uso popular

A busca por substâncias biologicamente ativas em produtos naturais contribuiu substancialmente para o desenvolvimento de fármacos importantes para o tratamento do câncer, dentre eles destacam-se os quimioterápicos como vincristina, etoposídeo, paclitaxel, camptotecina e irinotecano (CRAGG; NEWMAN, 2013).

A utilização de produtos naturais como alternativa terapêutica é uma prática bastante antiga, que antecede ao nascimento de Cristo e se estende aos dias atuais. Até o final de 2013, os produtos naturais e seus derivados, sintéticos ou semissintéticos, representaram um terço das aprovações da FDA como novas entidades moleculares, sendo que apenas um quarto desses é proveniente de plantas, sendo a grande maioria sintética ou derivada de organismos biológicos (PATRIDGE et al., 2016).

Apesar da flora brasileira possuir uma diversidade de aproximadamente 46.000 espécies de plantas descritas (GONÇALVES; JUNIOR, [s.d.]), apenas o Acheflan®, um

fitoterápico produzido a partir do óleo da planta *Cordia verbenacea* A.DC., está entre os 20 produtos mais vendidos no Brasil (DUTRA et al., 2016). Estes fatos sugerem que, apesar da grande diversidade da flora brasileira, a utilização de fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais da flora brasileira ainda é precária.

Dentre as 46.000 espécies da flora brasileira, 32.830, ou 71%, são angiospermas (GONÇALVES; JUNIOR, [s.d.]), nas quais encontra-se a família das solanáceas. Algumas espécies desta família são bastante conhecidas popularmente, por exemplo, *Solanum tuberosum* L. é a batata, a *Solanum lycopersicum* L. é o tomate e a *Solanum melongena* L. é a berinjela (PEREIRA; RODRIGUES; VEJA, 2016).

As propriedades curarizantes das solanáceas presentes no nordeste brasileiro foram descritas por Agra e Barbosa-Filho (2007), que estudaram o uso popular de plantas medicinais. Dentre as espécies do gênero *Solanum*, verificou-se que a *Solanum agrarium* Sendtn, popularmente conhecida como gogóia, é utilizada como abortiva ou para inflamação na próstata; a *Solanum rhytidoandrum* Sendtn, conhecida como jurubeba-branca, é utilizada contra doenças do fígado; a *Solanum paniculatum* L. conhecida como jurubeba, é utilizada como diurética, contra as doenças do fígado, anemia e tuberculose.

A espécie *Solanum paludosum* Moric. (**Figura 4**) é encontrada na costa litorânea da América do Sul, desde a Venezuela até o Brasil, onde é conhecida popularmente como “jurubeba roxa”. Sua raiz é utilizada para o tratamento de doenças hepáticas (DE FÁTIMA AGRA; DE FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Figura 4 – *S. paludosum* ou Jurubeba roxa



Fonte: Jurubeba-roxa (*Solanum paludosum*) Planta Medicinal <<https://www.vegetall.com.br/jurubeba-roxa-S.-paludosum/>>. Disponível em: 19 de novembro de 2017.

O interesse em desvendar o (s) princípio(s) ativo(s) que confere(m) atividade medicinal a *S. paludosum* e a busca por novos compostos biologicamente ativos derivados da flora

brasileira levou pesquisadores a analisarem a composição e a atividade biológica de diferentes substâncias extraídas a partir desta espécie.

O isolamento de compostos a partir de diferentes partes desta planta, como a raiz, fruta e partes aéreas levaram a identificação de duas classes de substâncias já descritas na literatura, os flavonoides e os alcaloides. Bhattacharyya (1984) e Bhattacharyya e cols. (2009) isolaram solasodina da fruta e da casca da raiz da *S. paludosum*, que é um alcaloide esteroidal importante para síntese de hormônios esteroidais. Além da solasodina, diferentes tipos de flavonoides já foram isolados das partes aéreas da *S. paludosum* (DA SILVA; DE CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009; SARMENTO SILVA et al., 2002).

Poucos estudos relatam a atividade biológica da *S. paludosum*. Siqueira e cols. (2011) verificaram propriedades antioxidantes em flavonoides metoxilados, compostos fenólicos e polifenóis extraídos do extrato da *S. paludosum*. Monteiro e cols. (2012) verificaram que a fração total de alcaloides extraída da raiz da *S. paludosum* apresentava ação vasorelaxante na aorta de ratos mediada pela ação do óxido nítrico (NO) e, por fim, Silva e cols. (2005) verificaram que o extrato obtido das partes aéreas da *S. paludosum* apresentaram atividade moluscicida.

A atividade citotóxica do extrato de diversas espécies da flora brasileira foi verificada em linhagens tumorais de melanoma de camundongo, carcinoma hepatocelular humano, leucemia mielocítica crônica e promielocítica, e em células não tumorais mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC – *peripheral blood mononuclear cell*). Neste estudo, a *S. paludosum* não apresentou atividade citotóxica significativa em nenhum tipo celular na concentração testada (50 µg/ml) após 72h de tratamento, sendo considerado significativo para este fim um efeito citotóxico mínimo de 75% de redução do crescimento celular, entretanto verificou-se redução em aproximadamente 64% do crescimento da linhagem celular da leucemia promielocítica humana (DA SILVA et al., 2016).

A grande variabilidade da flora brasileira torna os estudos acerca de compostos naturais, ou de seus derivados biologicamente ativos, bastante promissores. A espécie *S. paludosum* é uma solanácea cujos efeitos biológicos ainda não foram completamente esclarecidos, tornando-se desta forma uma opção de escolha para o estudo de suas propriedades químicas e de seus efeitos biológicos visando o desenvolvimento de protótipos de fármacos, especialmente aqueles com efeitos antitumorais, objeto de estudo deste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade inibitória de flavonoides metoxilados extraídos *S. paludosum* sobre a atividade da enzima topoisomerase II- α , e seus efeitos citotóxicos sobre a linhagem de glioblastoma humano, (GBM02), *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o metabolismo mitocondrial das células de GBM humano após o tratamento com flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 provenientes da *S. paludosum* em diferentes concentrações;
- Avaliar o metabolismo mitocondrial de células não tumorais de mamíferos, macrófagos peritoneais, após o tratamento com flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 provenientes da *S. paludosum* em diferentes concentrações;
- Avaliar a viabilidade celular do GBM02 através da coloração com azul de tripan;
- Avaliar a ação dos compostos sobre a morfologia celular do GBM02;
- Analisar as alterações provocadas pelos tratamentos no citoesqueleto das células tumorais;
- Investigar a ação dos compostos sobre a capacidade migratória do GBM02;
- Avaliar a ação dos compostos sobre a morfologia nuclear;
- Investigar a ação dos compostos sobre o processo de peroxidação lipídica;
- Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a ação da enzima TOPO II- α no enovelamento do plasmídeo kDNA pHOT1;
- Elaborar um modelo computacional de interação entre a enzima TOPO II- α e os flavonoides;
- Identificar as fases do ciclo celular das células de GBM02, após os tratamentos.

4 METODOLOGIA

4.1 Extração e isolamento dos flavonoides

O isolamento dos flavonoides ocorreu através de uma combinação sistemática de métodos cromatográficos. Utilizou-se como matéria-prima os galhos secos de *S. paludosum*, que após processo de secagem à temperatura ambiente, sob ventilação, tiveram de 1,0 a 1,5 Kg do material seco triturados e extraídos com etanol, até exaustão, obtendo-se 100 a 300 g do extrato etanólico bruto. Em seguida, parte desse extrato (50, 100 ou 200 g) foi utilizada para partição líquido-líquido, com MeOH:H₂O (3:1, 300 mL), hexano (até 11 x 160 mL) e acetato de etila (até 3 x 200 mL). Parte da fração acetato de etila (2,0 a 5,0 g) foi submetida à cromatografia líquida em coluna (CLC) com Sephadex LH-20® e Metanol:Diclorometano (7:3). As frações coletadas foram reunidas de acordo com a similaridade dos seus fatores de retenção (R_f), analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando como eluente CH₂Cl₂:AcOEt (95:5). Este procedimento foi repetido de 4-5 vezes até que as frações com ausência de flavonoides, aqui chamadas de interferentes, foram separadas das frações contendo a mistura de flavonoides. O método de separação dos flavonoides compreendeu, de maneira não limitada, as etapas: (a) aplicação de 200 a 300 mg da mistura de flavonoides em cartuchos de extração em fase sólida (*solid phase extraction* – SPE), (b) obtenção dos grupos de flavonoides, separados de acordo com sua polaridade, contendo 2, 3 ou mais flavonoides em mistura; (c) submissão das frações obtidas a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu Prominence LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan), com detector de arranjo diodos (DAD). Foi utilizada coluna preparativa de 250mm x 21,2mm x 4µm, Phenomenex, temperatura da coluna até 35 °C, fluxo de 15,0 mL/min; na fase móvel foram utilizadas água ultrapura (Eluente A) e MeOH:Acetonitrila (1:1) (Eluente B). O gradiente utilizado foi: 0-5 minutos, 65% de B, 5-15 min, 70% de B, 15-30 min, 75% de B, 30-35 min, 100% de B. Os cromatogramas foram monitorados em um comprimento de onda de 320 nm. Todas as substâncias isoladas foram identificadas por UPLC-DAD-qTOF-MS/MS e comparadas com padrões já isolados (DA SILVA; DE CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009).

4.2 Ensaio de viabilidade celular

4.2.1 Ensaio de viabilidade celular através de brometo de MTT em células tumorais de GBM02

O metabolismo mitocondrial celular foi avaliado através do ensaio da redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT) nas células de GBM02. A linhagem de tumor humano GBM02 foi estabelecida no laboratório do Professor Vivaldo Moura Neto, Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a partir de amostras cirúrgicas, com o consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, protocolo número CEP-HUCFF No. 002/01.

Foram plaqueadas 5×10^3 células por poço em placas de 96 poços e, 24h após a incubação em estufa umidificada a 37°C e 5% CO_2 , as células foram tratadas com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 nas concentrações 1, 10, 50 e 100 μM , temozolomida 150, 250 e 350 μM diluídos em novo meio *Dulbecco's Modified Eagle/F12* (DMEM/F-12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24, 48 e 72h. As células também foram cultivadas em meio de cultura isento de compostos (controle do meio de crescimento) ou com dimetilsufóxido (DMSO) 0,1% e 0,2% (controle dos veículos). As concentrações de temozolomida, o fármaco padrão ouro para o tratamento de GBM, foram escolhidas com base no uso clínico, 200 mg/m^2 por 5 dias. A técnica de MTT foi utilizada para avaliar a viabilidade celular através do componente cromogênico metil-tiazolil-tetrazólio (Sigma). As enzimas mitocondriais das células viáveis na cultura são capazes de metabolizar o MTT, demonstrando, portanto, a atividade respiratória destas células, levando a formação de cristais roxos de formazan. O MTT foi utilizado na concentração de 0,5 mg/mL em meio DMEM/F-12 com SFB à 10%, sendo adicionados 50 μL desta solução por poço da placa de 96 poços. Após incubação por duas horas com o MTT, desprezou-se o sobrenadante e utilizou-se 50 μL de DMSO para lisar as células viáveis que foram capazes de formar cristais de formazan (BALÇA-SILVA et al., 2015).

Antes de proceder a leitura da densidade óptica, a placa foi novamente incubada a 37°C por 20 minutos, a fim de favorecer a dissolução dos cristais formados. A densidade óptica de cada poço foi obtida por espectrofotometria a 530 nm. A concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade celular (IC_{50}) de cada substância nos diferentes tempos foi calculada tendo como base a concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% em relação ao controle DMSO 0,1% (controle do veículo na maior concentração, cujas células foram consideradas 100% viáveis). As substâncias que obtiveram melhores resultados foram selecionadas para prosseguir com os ensaios.

4.2.2 Ensaio de viabilidade celular através de MTT em células não tumorais de macrófagos

Para compreender o efeito destes tratamentos sobre o metabolismo mitocondrial de células não tumorais de mamíferos, macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos *Swiss* com peso corporal variando entre 20-25g através de lavado peritoneal com 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS – 137mM NaCl, 8mM Na₂PHPO₄, 2.7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7.0) frio. As células do exsudato peritoneal foram centrifugadas a 1500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos e o *pellet* foi ressuspensão em meio de cultura. As células foram contadas e plaqueadas (3×10^5 células/poço) em placas de 96 poços com 100 µL de meio de cultura e mantidas na estufa a 37 °C por 24h para aderir à placa. Após este período as células foram tratadas com 1, 10 e 100 µM dos flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 diluídos em meio RPMI-1640 com DMSO. As placas foram mantidas na estufa com 5% de CO₂ a 37 °C, durante 48 h. As células foram cultivadas em meio de cultura isento de compostos (controle do meio de crescimento) ou com DMSO 0,1% (controle do veículo). Em seguida, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas com o MTT (100 µL/poço) durante 1h ao abrigo da luz a 37 °C. A solução de MTT foi removida e as células foram ressuspensas em 100 µL de 0.1% DMSO. A absorbância foi medida usando leitor de microplacas a 550 nm (HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993).

4.2.3 Ensaio de viabilidade celular através da coloração com azul de tripan

Para investigar melhor o efeito do extrato e dos compostos sobre a proliferação celular utilizou-se a técnica de coloração e contagem na câmara de Neubauer com azul de tripan. A contagem de células com o azul de tripan nos permite diferenciar as células viáveis, cujas membranas apresentam-se intactas e impermeáveis ao corante, daquelas não viáveis, cujas alterações na membrana permitem a entrada do corante tornando a célula azulada

Foram plaqueadas $1,5 \times 10^4$ células em placas de 12 poços e, após incubação por 24h em estufa umidificada a 37°C e 5% CO₂, as células foram tratadas com os flavonoides, Sp1, Sp2 e Sp3 a 50 µM e temozolomida 250 µM por 72h. As células foram centrifugadas e ressuspensas com 250 µL de azul de tripan 0,4% (Sigma) diluído em DMEM/F-12, isento de soro fetal bovino, numa concentração de 1:8, conforme sugerido pelo fabricante. A contagem das células viáveis e não viáveis foi realizada utilizando a câmara de Neubauer em três experimentos independentes.

4.3 Análise histológica

A análise morfológica foi realizada através da coloração com o kit comercial Panótico Rápido LB®, o qual é baseado no princípio de coloração estabelecido por Romanowsky, com eozina e azul de metileno. Após 72 horas de tratamento com os flavonoides, Sp1, Sp2 e Sp3 a 50 μM e temozolomida 250 μM por 72h, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com metanol por 2 minutos. Após a fixação, foram coradas conforme metodologia do kit. Em seguida, as lamínulas foram lavadas abundantemente com água destilada, permaneceram secando *overnight* e foram coladas nas laminas com Entelan®. As imagens foram obtidas por dois microscopistas diferentes utilizando microscópio óptico com objetiva de 20x. Para quantificação das células com perfil alongado (protoplasmático) e arredondado (citoplasmático) foram fotografados e analisados 10 campos aleatórios de cada condição em triplicada.

4.4 Imunocitoquímica

O potencial anti-invasivo foi verificado por meio de marcações imunocitoquímica que demonstram a organização dos filamentos de actina no citoesqueleto das células. A actina polimerizada (f-actina) desempenha importante papel nos processos de migração e adesão celular, conduzindo a formação de protrusões na membrana. Para isto, 8×10^3 células foram plaqueadas em lamínulas na placa de 24 poços e, após 24h, foram tratadas com os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 a 50 μM e temozolomida 250 μM e o controle DMSO a 0,1%, diluídos em DMEM/F-12 por 72h. Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS 3 vezes e fixadas por 5 minutos com paraformaldeído 4%. Em seguida, após 3 lavagens com PBS, as membranas celulares foram permeabilizadas com triton 0,3% por 5 minutos e as ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro albumina bovina (BSA) a 5% por 30 minutos. As células foram incubadas com o anticorpo anti-faloidina obtido em coelho, conjugado com o fluoróforo Alexa Flúor 546 (Molecular Probes) na concentração 1:200 diluído em BSA 1% durante 1h e 30min. Após a incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI), para realizar as marcações nucleares, na concentração 1:500 (Thermo Scientific) por 5 minutos, lavadas com 3 vezes com PBS e montadas nas laminas com Fluoromount®. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência na objetiva de 40x (BALÇA-SILVA et al., 2015).

4.5 Migração celular através do *scratch*

O potencial anti-invasivo dos compostos sobre as células do GBM também foi analisado através do ensaio do *scratch*, no qual avalia-se o percentual de fechamento da área do risco realizado na monocamada de células no tempo T₀, imediatamente após a realização do risco e antes de se aplicar os tratamentos, e após 24hs de tratamento. Foram plaqueadas 1x10⁵ células em placa de 24 poços e, após 24h, foi realizado um risco na monocamada de células, no centro do poço, com o auxílio de uma ponteira de 200 µl. Os poços foram lavados para remoção das células desaderidas com meio DMEM/F-12 isento de soro fetal bovino e imediatamente fotografadas (T₀) utilizando um microscópio invertido Nikon TS100 acoplado a câmera digital portátil para microscopia Optikal Sview 3.6.6 em aumento de 5x. Em seguida, as células foram tratadas com os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 a 50 µM e temozolomida 250 µM diluídas em DMEM/F-12 isento de soro fetal bovino e incubadas na estufa umidificada a 37°C e 5% CO₂ até completar 24h (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Ao término da incubação as células foram imediatamente fotografadas no mesmo microscópio em aumento de 5x. A área do risco foi calculada através do *software* ImageJ em T₀ e em T₂₄. A porcentagem de fechamento do risco após 24h foi calculada como uma porcentagem da área do risco em T₀, segundo a fórmula:

$$\% \text{ de fechamento} = 100 - \frac{T_{24} \times 100}{T_0}$$

4.6 Análise da peroxidação lipídica através da determinação do malonaldeído por HPLC-UV

O MDA é frequentemente utilizado como biomarcador padrão da peroxidação lipídica *in vivo*, em virtude da simplicidade do método e baixo custo (NIKI, 2014; SPICKETT et al., 2010). Diversos métodos foram desenvolvidos para determinação do MDA por HPLC em amostras biológicas. Neste estudo, adaptou-se o método descrito por Tatum e cols. (1990).

Antes do início das análises realizou-se a curva de calibração com padrão de MDA, obtido a partir do 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP). O TMP em meio ácido origina MDA, com o percentual aproximado de conversão de 98,4% (TSAKNIS et al., 1998)

Uma solução de TMP hidrolisado foi preparada a partir de 10 µL de TMP diluído em HCl 0,1 M em um tubo de ensaio com tampa. Esta solução foi então aquecida em água fervente, por 5 min, e resfriada em água corrente. Em seguida, aliquotou-se 1 mL da solução de TMP

hidrolisado em um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água milli-Q (Solução B). A curva de calibração foi construída com 9 pontos de concentração (0,2 a 42,0 nM).

Para realização das determinações foi utilizado HPLC-UV com coluna de 5C 18, comprimento 259 mm e 4,6 mm de diâmetro interno, equipada com pré-coluna. O comprimento de onda utilizado para detecção de MDA foi de 270 nm e o tempo de retenção de aproximadamente 2 min e 40 s. Toda análise em temperatura ambiente, foi realizada com fluxo constante de 1 mL/min em sistema isocrático, sendo injetados 20 µL da amostra. O tempo total de leitura utilizado foi de 6 min. Como fase móvel, utilizou-se solução tampão trizma e acetonitrila para HPLC, na proporção de 9:1, respectivamente.

A solução tampão para MDA foi preparada segundo Esterbauer et al. (1984). Inicialmente, 3,6 g de tampão TRIZMA-Base [$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$] foram diluídos em 1 L de água milli-Q. O pH foi então ajustado para 7,4. Este tampão foi armazenado em frasco âmbar, a temperatura ambiente por, no máximo, 7 dias.

Para a realização das análises de MDA fez-se necessário a preparação de uma solução de butil-hidroxitolueno (BHT) a 2%, em etanol 96%, sendo esta solução armazenada, sob refrigeração, por no máximo 7 dias.

Cerca de 200 µL do homogenato celular foram homogeneizados com 400 µL de tampão trizma-base e 40 µL de solução de BHT. Em seguida, adicionou-se 440 µL de acetonitrila grau HPLC. A solução formada foi então centrifugada a 4 °C e 4.000 rpm, por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de unidade filtrante com membrana durapore de 0,22 µm de poro, e homogeneizado com auxílio de vórtex. O volume de 20 µL do filtrado foi injetado no HPLC e a leitura realizada a 270 nm.

Os valores das dosagens do MDA foram expressos em nanomolar (nM), e corrigidos para o número de células (mm^3), obedecendo o fator de correção, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{MDA tecidual real} = \frac{\text{MDA encontrado} \times 1000}{\text{mm}^3 \text{ de células}}$$

4.7 Extração e inibição da topoisomerase II- α

Os flavonoides isolados de *S. paludosum* foram submetidos ao ensaio para avaliar a atividade inibitória da enzima TOPO II- α humana. A enzima foi obtida da TopoGEN (Columbus, OH, EUA) e o DNA superenovelado foi utilizado como substrato para TOPO II- α . O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia do fabricante. As amostras testadas e o etoposídeo foram solubilizadas em DMSO (até 10 %). A reação foi realizada em microtubos com 4 μ L de tampão, 0,5 μ L de pHOT1 (0,125 ng), exceto o que continha o padrão do marcador de DNA linear (pHOT1 linear), 2,0 μ L das soluções das amostras e do padrão etoposídeo diluídas (1mM; DMSO 10 %) e água ultra purificada para se obter um volume final de aproximadamente 20 μ L. Foram adicionados 0,3 μ L de TOPO II- α (3 U) a cada microtubo, com exceção dos padrões do DNA e do marcador de pHOT1 linear. A reação foi então incubada a 37° C por 40 minutos e em seguida adicionou-se 2 μ L de solução de SDS 10 %, seguidos de 2,0 μ L de proteinase K, submetendo-se os tubos a nova incubação a 37° C por 15 minutos. Adicionou-se 2,0 μ L do tampão *loading* e 2,0 μ L do Cybr Gold e então as reações foram aplicadas em gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada a 50 V durante 1 hora e 30 minutos. Em seguida, o gel foi revelado em brometo de etídio (EtBr) a 0,5 μ g/mL e em transiluminador com UV a 302 e 365 nm.

4.8 Modelagem computacional

Para compreender se as condições estruturais e energéticas dos flavonoides e da enzima favorecem uma interação estável, realizou-se a técnica de modelagem molecular através do ensaio do *docking*, a qual prevê a orientação de uma molécula quando esta se liga a uma macromolécula, tal como proteínas, enzimas e DNA para formar um complexo estável. Para isto, a estrutura dos flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 foi desenhada no formato *Smile* e convertida em arquivos tridimensionais *.mol2** utilizando CORINA[®] (Molecular Networks) (MARTINY et al., 2016). O algoritmo mecânico - *Austin Model 1* (AM1) foi utilizado como método para minimização da energia usando o *software* Arguslab[®] v4.0.1 (LAURA et al., 2016; THOMPSON; PLANARIA SOFTWARE, [s.d.]). As estruturas finais foram convertidas no formato *.pdbqt** empregando-se o *software* PyRx[®] - *Virtual Screening Tool Program* (DALLAKYAN, [s.d.]). Todos os ligantes, íons e moléculas de água que estavam presentes na estrutura original da TOPO II- α , que foi obtida a partir do Banco de Dados de Proteínas (PDB, ID: 1ZXN), foram removidas manualmente adicionando-se átomos de hidrogênio (MARTINY

et al., 2016) utilizando-se a interface gráfica para o *software* AutoDock Tools[®] v. 1.5.6 (SANNER, 1999). A estrutura dos ligantes co-cristalizados (adenosina difosfato - ADP) foram extraídas dos arquivos originais da mesma base de dados e reinseridas na enzima (RAZZAGHI-ASL et al., 2015). A validação do método foi interpretada a partir do desvio do quadrado da média (RMSD – *Root-mean-square deviation*) dos átomos dos ligantes nas conformações redocadas e comparadas às estruturas co-cristalizadas (RAZZAGHI-ASL et al., 2015; VERÍSSIMO et al., 2014). Uma caixa de busca (*gridbox*) com dimensões 40 x 40 x 40 Å englobando todo o sítio ativo da enzima ocupado pela molécula do ADP, com coordenadas centradas em *x*: 28.136, *y*: 25.907 e *z*: 28.905 foi admitida, usando-se o *software* PyRx[®] (BOONYALAI et al., 2013). Esta, foi utilizada para avaliar as interações estéricas da proteína e também as interações das interações do tipo van der Waals e/ou de hidrogênio entre os ligantes e a enzima (DU et al., 2000). Todos os resultados foram analisados utilizando-se o *software* AutoDock Tools[®] (SILVA-JÚNIOR et al., 2017; SILVA et al., 2016) Por fim, as imagens dos complexos proteína ligante foram geradas utilizando o *software* PyMol[®] (Schrödinger) (DELANO SCIENTIFIC, 2006).

Cálculo de Teoria do Funcional de Densidade (DFT): O cálculo de DFT foi realizado baseado no paradigma de Hohenberg-Kohn, o qual assume que existe uma correlação funcional entre densidade eletrônica e elétron Hamiltoniano, que permite o cálculo de todas as propriedades fundamentais da molécula sem, necessariamente, ter uma função da onda (SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR; AQUINO, 2017). Assim, os cálculos de DFT foram realizados utilizando-se os modelos de mecânica quântica (MQ) do *software* Spartan'14[®] para determinar a energia de ligação do complexo TOPO II- α /ligante. A análise do potencial dual dos compostos foi realizada através de métodos teóricos, para isto, a estrutura correta dos flavonoides e sua enzima alvo fizeram-se necessárias. A geometria otimizada dos compostos capaz de interagir com o sítio ativo da enzima foi obtida a partir da análise do *docking* acima descrita (SILVA-JÚNIOR et al., 2017). A energia de ligação do complexo enzima/ligante foi calculada aplicando o M06/6-31G(d). A energia de ligação do complexo enzima/ligante foi calculada aplicando o funcional M06/6-31G(d). A energia de ligação da MQ foi obtida aplicando-se a fórmula abaixo, na qual a energia de ligação ($E_{\text{ligação}}$) foi calculada como a diferença entre a energia do complexo ($E_{\text{enzima-ligante}}$) e a soma das energias da enzima (E_{enzima}) e do ligante (E_{ligante}) separadamente (KHOSRAVAN et al., 2016; SILVA-JÚNIOR et al., 2017):

$$E_{\text{ligação}} = E_{\text{enzima-ligante}} - (E_{\text{enzima}} + E_{\text{ligante}})$$

4.9 Análise do ciclo celular

Os efeitos antiproliferativos dos flavonoides podem ser melhor compreendidos através da análise das fases do ciclo celular após 72h de tratamento. As fases G0/G1 representam um período quiescente ou o preparo para a replicação dos cromossomos ($2n$); a fase S representa a síntese/replicação do DNA ($4n$); a fase G2/M representa a preparação para a mitose e a mitose propriamente dita, onde ocorre a separação das cromátides irmãs ($4n$) e a formação de duas células filhas ($2n, 2n$). O ensaio do ciclo celular foi realizado de acordo com as instruções do Kit de Ciclo Celular Muse®. As células foram plaqueadas proporcionalmente em placas de 12 e 6 poços, 80×10^3 e 25×10^3 células, respectivamente e, após 24 h, foram tratadas com os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 a $50 \mu\text{M}$ e temozolomida $250 \mu\text{M}$ e o controle DMSO a 0,1%, diluídos em DMEM/F-12 por 72 h. Após o período de incubação, as células foram desaderidas com tripsina, a qual foi neutralizada com uma solução de soro fetal bovino e PBS a 10%.

Após centrifugação a 1500 rpm por 3 minutos a 4°C as células foram ressuspensas em 1mL de PBS e centrifugadas novamente a 1500 rpm, por 2 minutos, a 4°C . O pellet foi ressuspenso em $50 \mu\text{L}$ de PBS para cada 1×10^6 células. O processo de fixação consistiu em adicionar as células ressuspensas lentamente em etanol 70% no gelo. Os tubos permaneceram congelados em freezer por até 3 meses conforme orientação do fabricante. Após a fixação, $400 \mu\text{L}$ de cada suspensão celular foi centrifugado nas mesmas condições, porém por 3 minutos. O pellet foi ressuspenso em $250 \mu\text{L}$ de PBS a cada 5×10^5 células e centrifugado por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em $200 \mu\text{L}$ de reagente de Ciclo Celular Muse®. Após a incubação durante 30 min à temperatura ambiente e protegido da luz, a aquisição de dados foi realizada por citometria de fluxo em um Muse® Cell Analyzer e analisada usando o *software* Muse™ 1400 Analysis.

4.10 Análise estatística

Para as análises estatísticas utilizou-se o *software* Graphpad Prism 6.0e. Os testes de atividade farmacológica foram analisados a partir de comparações entre as médias utilizando análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tuckey. A avaliação do ciclo celular foi realizada com a comparação de proporções, utilizando o teste de χ^2 (qui-quadrado). As imagens das microscopias foram analisadas utilizando o *software* Fiji IamgeJ, versão 2.0.0/2015, para

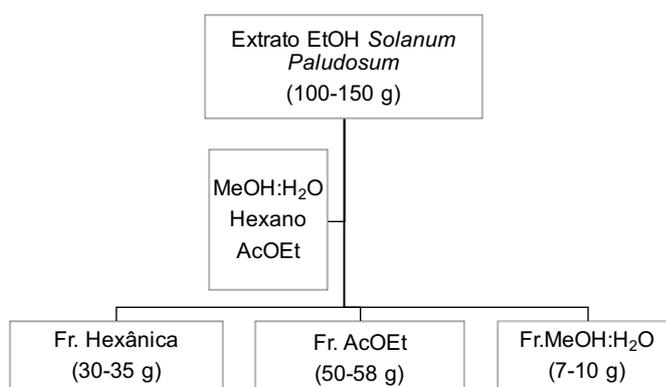
qual foram capturados 10 campos microscópios aleatórios (aumento de 20x). Todas as comparações foram realizadas considerando três experimentos independentes e em triplicatas, e com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%), sendo consideradas estatisticamente significativas as análises com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Extração e isolamento dos flavonoides

O isolamento de flavonoides da espécie *S. paludosum* ocorreu a partir extrato etanólico bruto (100-150 g), obtido dos galhos da planta. As frações hexânica, acetato de etila e metanólica extraídas deste extrato com seus respectivos solventes, apresentaram rendimento de 30-35g, 50-58g e 7-10g, conforme ilustrado na **Figura 5**.

Figura 5 – Esquema para partição do extrato etanólico bruto de *S. paludosum*

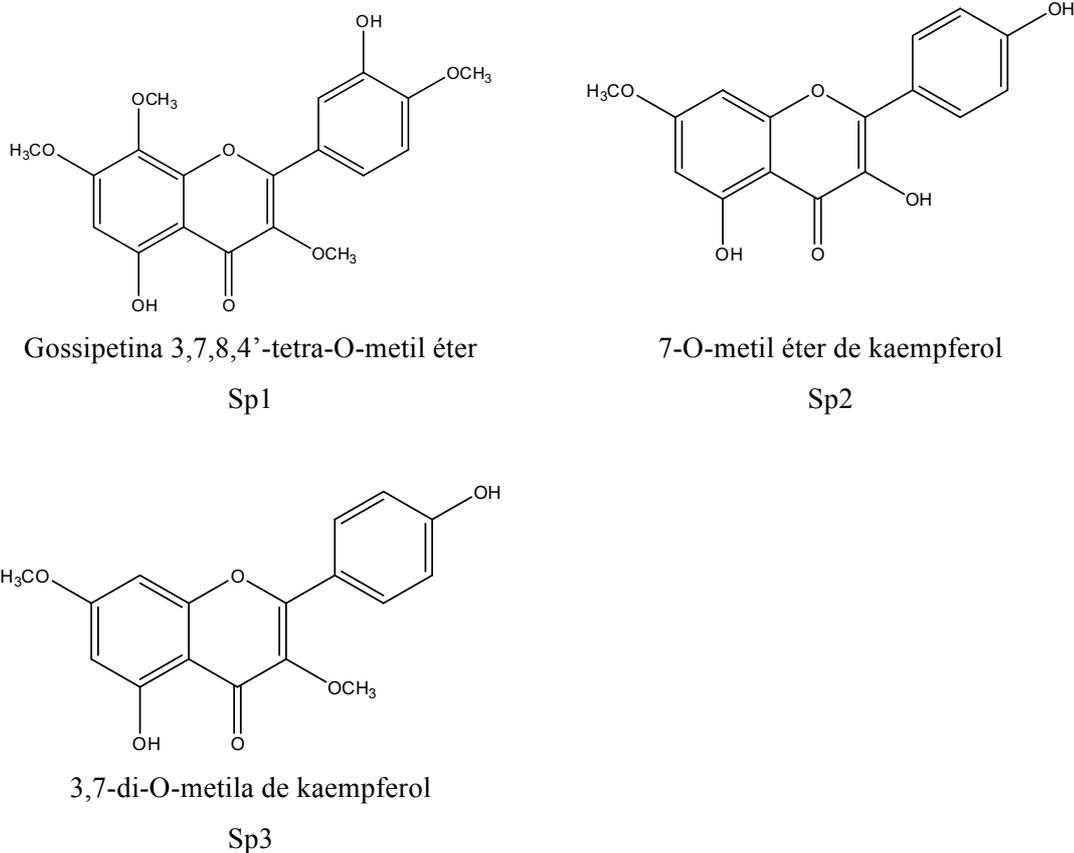


Fonte: Autora, 2018.

Nota: As frações hexânica (Fr. Hexânica), acetato de etila (AcOEt) e metanólica (Fr. MeOH:H₂O) isoladas a partir do extrato etanólico da *S. paludosum*.

Após a separação em fase sólida, todos os flavonoides foram isolados da fração acetato de etila, a qual demonstrou, em estudos prévios, abundância em flavonoides metoxilados, objeto de estudo deste trabalho. As frações hexânica e metanólica foram descartadas. As propriedades químicas e a atividade biológica de flavonoides metoxilados extraídos da *S. paludosum* vêm sendo investigadas pela professora Tania Maria Sarmiento da Silva, do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco Laboratório em colaboração com a professora Magna Suzana Alexandre Moreira, Laboratório de Farmacologia e Imunidade da Universidade Federal de Alagoas desde 2009, a partir do estudo espectroscópico desta espécie (DA SILVA; DE CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2009). Assim, foram selecionados 3,4',7,8-tetra-*O*-metilgossipetina (Sp1), 7-*O*-metilcanferol (Sp2) e 3,7-*O*-dimetilcanferol (Sp3), cujas estruturas estão demonstradas na **Figura 6**, para avaliação dos efeitos antitumorais em linhagens de GBM02.

Figura 6 – Estrutura química dos flavonoides extraídos da *S. paludosum*



Fonte: Autora, 2018.

5.2 Análises de viabilidade celular

5.2.1 Análises de viabilidade celular através do MTT em células tumorais de GBM02

Em células tumorais verificou-se que, comparativamente ao grupo controle tratado com DMSO 0,1%, cujas células foram consideradas 100% viáveis, todos os flavonoides reduziram significativamente a viabilidade celular em todos os tempos testados. O efeito máximo de cada tratamento em 24, 48 e 72 h foi encontrado na concentração de 50 μ M, entretanto, nos 3 tempos, não houve diferença entre a atividade dos flavonoides nas concentrações de 50 e 100 μ M, visto que reduziram igualmente a viabilidade celular do GBM02. Sp1, Sp2 e Sp3 apresentaram maior atividade após 72h de tratamento, reduzindo em $45,1 \pm 0,3$, $46,5 \pm 0,5$ e $46,7 \pm 0,6\%$ ($p < 0,0001$) a atividade metabólica mitocondrial, respectivamente, conforme demonstrado na **Tabela 2**. Comparativamente ao DMSO 0,2%, a TMZ não apresentou atividade significativa. Não foi verificada diferença significativa entre os controles DMSO 0,1% e 0,2%

comparativamente ao meio de cultura, demonstrando que os efeitos sobre a viabilidade celular ocorreram exclusivamente pela atividade dos flavonoides, e não pelo veículo com o qual os compostos foram diluídos.

Tabela 2 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e da temozolomida sobre a da viabilidade celular do GBM02

Substancias (μM)	24 h		48 h		72 h	
	IC ₅₀ ^a	Efeito Máximo (%) ^b	IC ₅₀ ^a	Efeito Máximo (%) ^b	IC ₅₀ ^a	Efeito Máximo (%) ^b
Sp1	>100	17,6±0,5****	>100	31,2±1,0***	>100	45,1±0,3****
Sp2	>100	15,6±0,7***	>100	33,9±0,7****	>100	46,5 ± 0,5****
Sp3	>100	10,8±1,2*	>100	33,2±1,2****	>100	46,7 ± 0,6****
TMZ	>350	ND	>350	ND	>350	ND

Fonte: Autora, 2018.

Nota: ^a Concentração que reduz 50% da viabilidade celular (IC₅₀), calculada através da curva concentração-resposta. ^b Média ± erro padrão da média do efeito máximo sobre a viabilidade, em triplicatas de um experimento representativo. Os valores do efeito máximo foram considerados estatisticamente significativos quando * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo DMSO 0.1% (teste de Tuckey); ND: efeito máximo não determinado até a concentração de 100 μM comparado ao grupo DMSO.

5.2.2 Análises de viabilidade celular através do MTT em células não tumorais de macrófagos

Em células não tumorais, verificou-se que os flavonoides Sp1 e Sp2 não apresentaram atividade sobre o metabolismo mitocondrial de macrófagos peritoneais após 48h de tratamento até a concentração de 100 μM , sugerindo assim que a atividade destes compostos apresenta seletividade para reduzir o metabolismo mitocondrial de células tumorais, em relação as células não tumorais, conforme demonstra a tabela 4. Adicionalmente, a Sp3 reduziu a viabilidade celular em 47,9 ± 8,2% após 48 h de tratamento, na concentração de 100 μM , conforme indicado na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e da temozolomida sobre a da viabilidade celular de macrófagos peritoneais

Substancias	48 h	
	IC ₅₀ ^a	Efeito Máximo (%) ^b
Sp1 μ M	>100	ND
Sp2 μ M	>100	ND
Sp3 μ M	>100	47.9 \pm 8.2*

Fonte: Autora, 2018.

Nota: ^aConcentração que reduz 50% da viabilidade celular (IC₅₀), calculada através da curva concentração-resposta. ^bMédia \pm erro padrão da média do efeito máximo sobre a viabilidade, em triplicatas de um experimento representativo. Os valores do efeito máximo foram considerados estatisticamente significativos quando $*p < 0,05$, (teste de Tuckey); ND: efeito máximo não determinado até a concentração de 100 μ M comparado ao grupo DMSO.

A análise destes resultados permitiu determinar o melhor tempo de tratamento e a concentração que apresentou maior atividade. Considerando que o efeito máximo destes flavonoides foi detectado após 72 h de tratamento, utilizou-se este tempo para continuação deste trabalho. Determinou-se a concentração de trabalho 50 μ M visto que a maior atividade destes compostos ocorreu nesta concentração (não houve diferença significativa entre a atividade metabólica mitocondrial das células tumorais tratadas com flavonoides a 50 ou 100 μ M) e, ainda, esta concentração não apresentou atividade em macrófagos peritoneais de camundongos. A dose de trabalho da TMZ de 250 μ M foi determinada tomando-se como base a utilização clínica de 200 mg/m² por 5 dias, visto que a análise destes resultados demonstrou que não houve diferença significativa entre as 3 concentrações de TMZ testadas e o controle DMSO 0,2%.

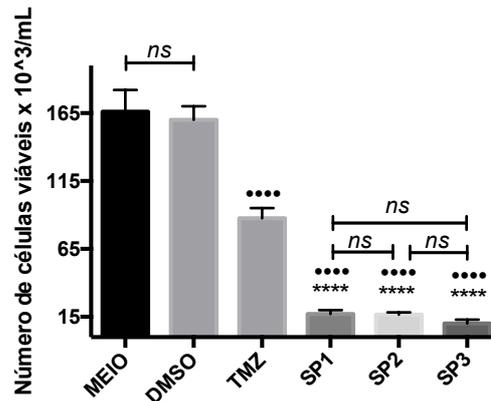
5.2.3 Análises de viabilidade celular através da coloração com azul de tripan

Observou-se que, após 72 h de tratamento, todos as condições induziram redução do número de células viáveis/mL comparativamente ao DMSO, conforme indicado na **Figura 7**. Não houve diferença significativa entre a atividade dos três flavonoides, que demonstraram atividade superior à TMZ, pois mantiveram a aproximadamente o mesmo número de células que foi plaqueado inicialmente. Não houve diferença entre o grupo tratado com o veículo e aquele tratado com o meio de cultura, indicando que o veículo não interferiu na alteração da quantidade células viáveis.

Os resultados obtidos através dos ensaios de viabilidade por MTT demonstraram que os flavonoides induziram uma redução da atividade metabólica mitocondrial, e aqueles com azul

de tripan indicaram redução da capacidade proliferativa, sugerindo que estes compostos podem exercer efeito citostático ou citotóxico.

Figura 7 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a viabilidade celular do GBM02



Fonte: Autora, 2018.

Nota: Proliferação celular após 72 h de tratamento com flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 - 50 μ M e TMZ - 250 μ M. Experimento realizado utilizando a coloração com azul de tripan. As colunas representam a média do número de células viáveis/mL de uma triplicata de três experimentos significativos e as barras representam o erro padrão da média. (*) representa diferenças em relação ao grupo controle; (*) temozolomida (TMZ); (ns) não significativa ($p < 0,0001$ - teste Tuckey).

5.3 Análise histológica

Observou-se durante a microscopia ótica que as células do grupo controle, tratadas com DMSO 0,1%, apresentaram morfologia citoplasmática (citoplasma arredondado, desprovidas de prolongamentos) e protoplasmática (aquelas com prolongamentos alongados), conforme demonstra a **Figura 8**, numa proporção aproximada de 1:1, além de numerosos nucléolos.

Figura 8 – Perfil morfológico das células de GBM02



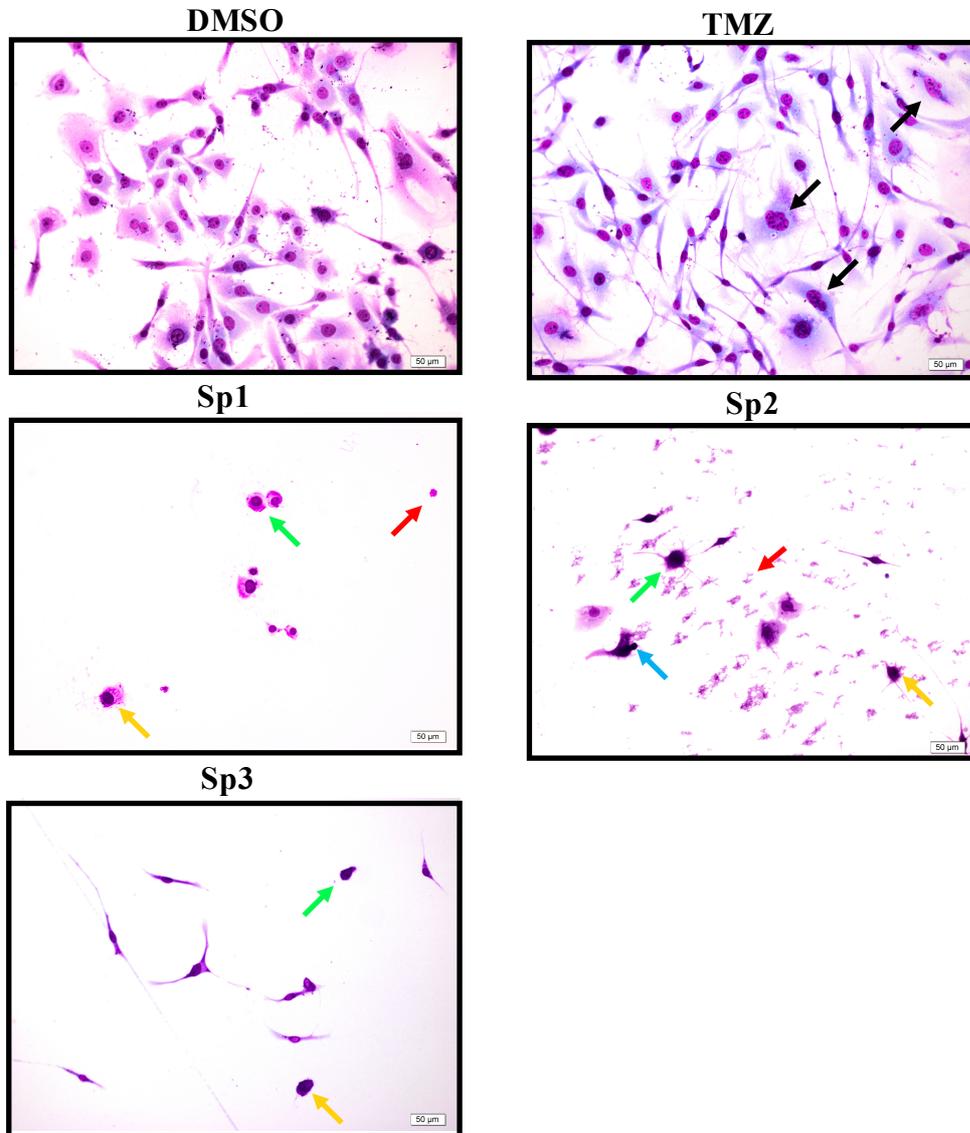
Células com perfil citoplasmático

Células com perfil protoplasmático

Fonte: Autora, 2018.

Nota: As imagens representam o perfil morfológico das células do GBM após 72h de tratamento com DMSO 0,1% em meio DMEM/F12.

Figura 9 – Efeito dos tratamentos com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a morfologia do GBM02



Fonte: Autora, 2018.

Nota: As imagens representam a análise histológica das células de GBM02 após 72 h de tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 – 50 μ M e temozolomida (TMZ) – 250 μ M; as setas coloridas indicam: verdes - redução/perda do conteúdo citoplasmático; vermelhas – debris celulares; amarelas – condensação da cromatina/picnose; azul – extravasamento do conteúdo nuclear; pretas – atipias nucleares.

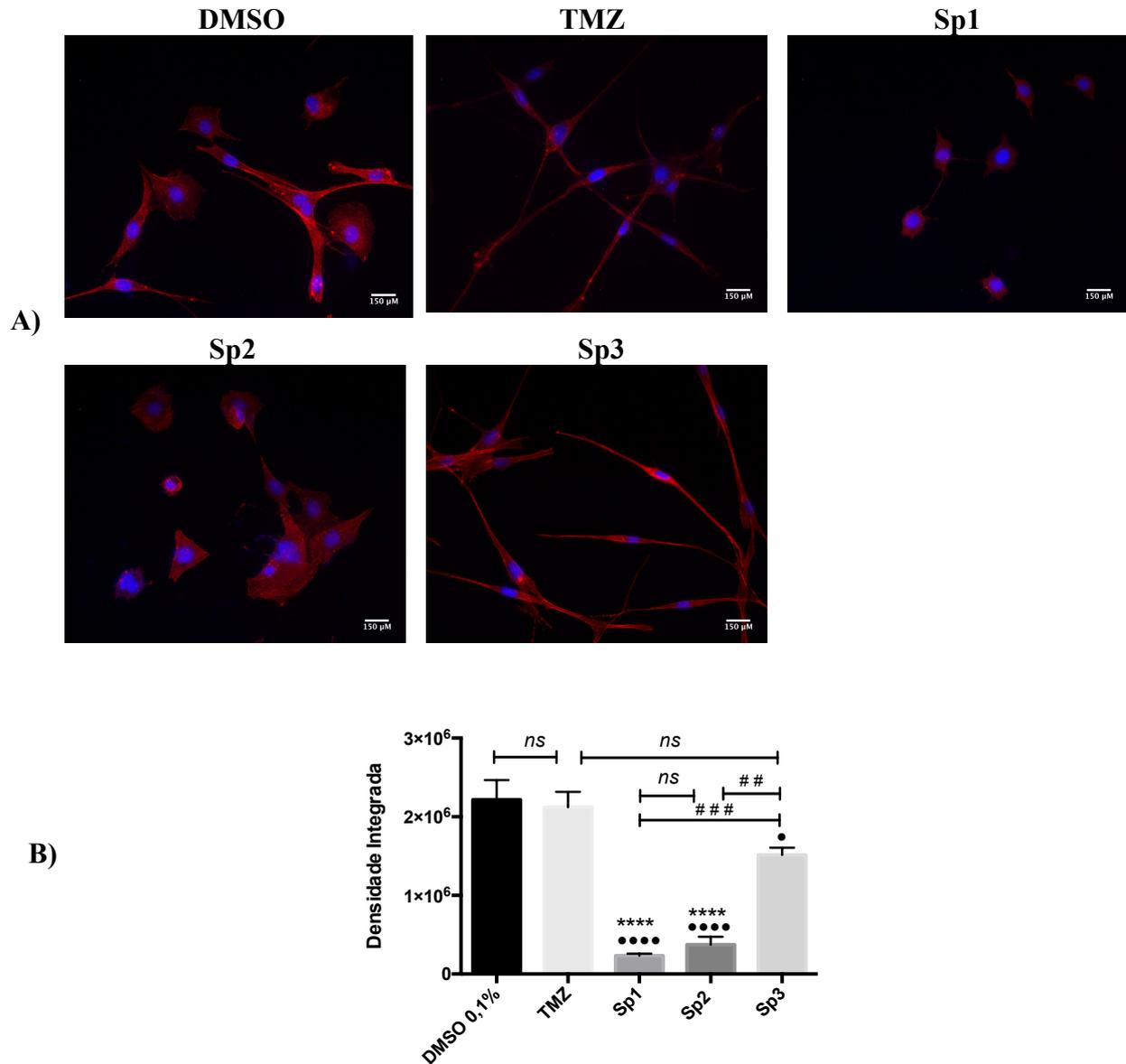
As células tratadas com todos os flavonoides testados apresentaram redução do volume citoplasmático, condensação da cromatina (**Figura 9**) e redução do número de células por campo. Os flavonoides Sp1 e Sp2 apresentaram maior efeito sobre a morfologia celular, visto que, após o tratamento, induziram mudança na relação entre células protoplasmáticas e citoplasmáticas de 1:10 (Sp1) e 1:5 (Sp2), além de promoverem perda/retração do citoplasma, alterando a relação núcleo/citoplasma (setas verdes). Verificou-se ainda a presença de debris,

condensação da cromatina e picnose do núcleo (setas amarelas). A perda citoplasmática em Sp2 levou algumas células à exposição do núcleo e ao extravasamento do conteúdo nuclear (seta azul). As células tratadas com a TMZ apresentaram atípicas nucleares (setas pretas). As células tratadas com TMZ e Sp3 apresentaram um perfil alongado semelhante. Todas as alterações observadas sugerem fortemente que os tratamentos com os flavonoides Sp1 e Sp2 induzem a morte celular nas células do GBM02.

5.4 Imunocitoquímica

Dentre as alterações celulares que ocorrem durante o processo migratório destaca-se a polarização do citoesqueleto e a formação de lamelipódios, nos quais a actina desempenha papel fundamental. Para compreender os efeitos dos tratamentos sobre a organização do citoesqueleto, as células foram coradas com faloidina e analisadas em microscópio de fluorescência. As células do grupo controle, tratadas com DMSO 0,1%, apresentaram um padrão organizado quanto à disposição das fibras de actina no citoesqueleto, verificou-se a presença de fibras polimerizadas ao longo dos diversos prolongamentos celulares que se estendem longitudinalmente e a presença de filopódios e lamelipódios. Após 72 h de tratamento, os flavonoides Sp1 e Sp2 induziram à desorganização das fibras de actina do citoesqueleto, houve redução da formação das fibras longitudinais, dos prolongamentos celulares (**Figura 10A**) e da intensidade da marcação do citoesqueleto (**Figura 10B**), as células assumiram uma morfologia mais citoplasmática do que protoplasmática. Verificou-se que todos os compostos, exceto a TMZ, reduziram significativamente a intensidade da fluorescência comparativamente ao DMSO 0,1%. Os flavonoides Sp1 e Sp2 não apresentaram diferença entre si. O flavonoide Sp1 apresentou efeito estatisticamente mais pronunciado do que o Sp3 (**Figura 10B**). A análise histológica e a análise dos filamentos de f-actina do citoesqueleto sugerem que os tratamentos com os flavonoides induzem um encolhimento do citoplasma ou ao rompimento na membrana celular, verificado através da perda do volume citoplasmático, e à desorganização dos filamentos de actina, verificado através da redução da intensidade da marcação do citoesqueleto, conforme indicado na **Figura 10B**.

Figura 10 – Efeito dos tratamentos com flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a organização dos filamentos de F-actina do GBM02



Fonte: Autora, 2018.

Nota: **A** – representa os efeitos dos flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 – 50 μ M e temozolomida – 250 μ M sobre a organização dos filamentos de f-actina do GBM02, após 72 h tratamento. As células foram fixadas e coradas com o anticorpo Alexa flúor 546 conjugado à faloidina, os núcleos foram corados com DAPI. O vermelho representa a f-actina do citoesqueleto e o azul representa o núcleo. As imagens foram obtidas com aumento de 40x. **B** – representa a análise da densidade integrada (área x média de intensidade dos pixels) dos tratamentos e as barras erro padrão média. (*) diferenças em relação ao controle, (•) em relação à temozolomida (TMZ) e (#) entre os flavonoides; (ns) não significativo.

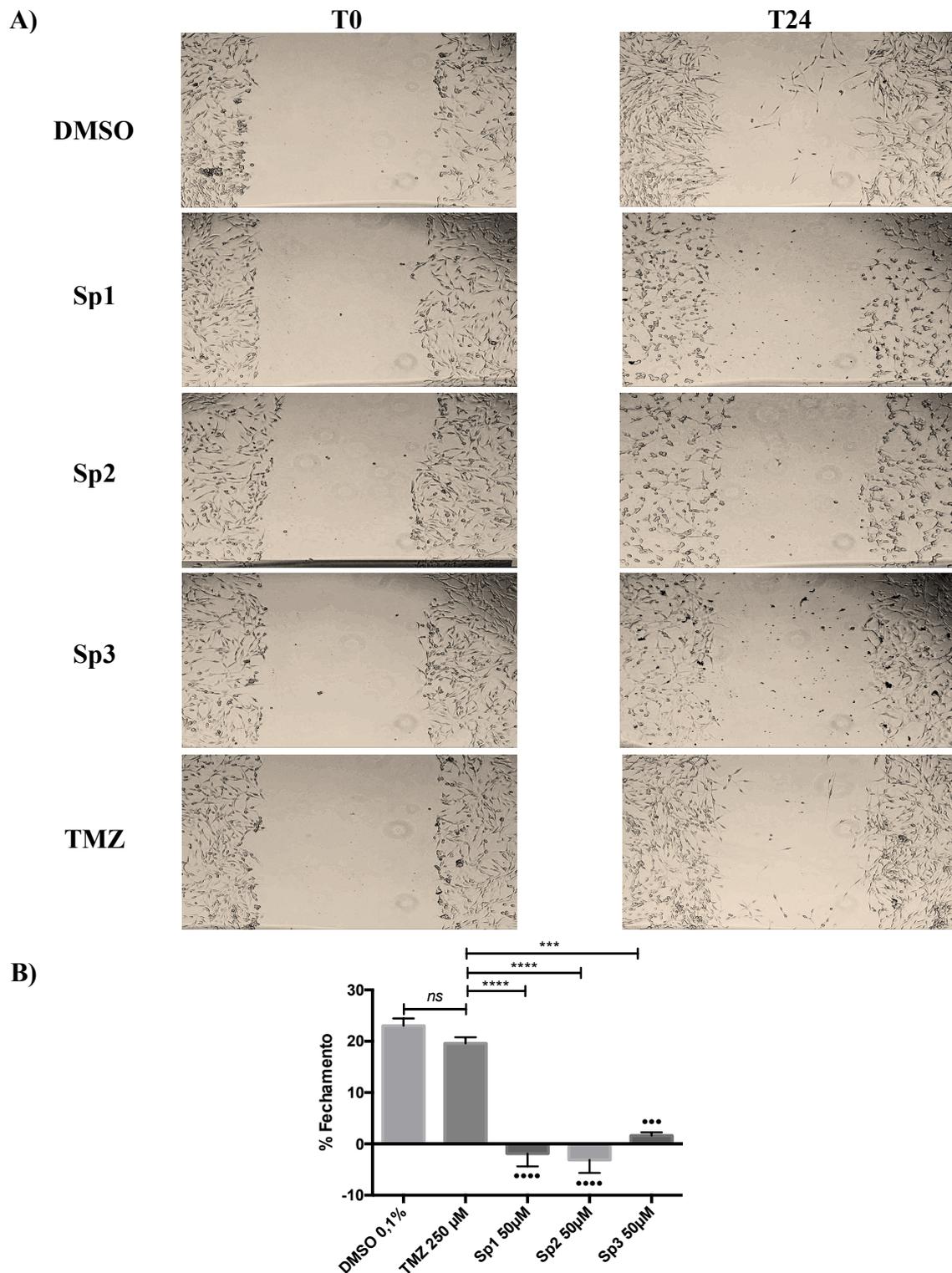
5.5 Análise da mobilidade celular através do ensaio do *scratch*

Após 24 h de tratamento observou-se que todos os compostos, exceto a temozolomida, reduziram significativamente a capacidade migratória tumoral, comparativamente ao DMSO 0,1%, conforme indicado na **Figuras 11**. Observou-se ainda um aumento da área do risco após os tratamentos com Sp1 e Sp2, sugerindo uma possível retração celular. Estes dados podem justificar-se através dos resultados obtidos nas análises histológicas e imunocitoquímica, nos quais verificou-se retração citoplasmática e a desorganização dos filamentos de f-actina, respectivamente, condições que podem contribuir substancialmente para redução da capacidade migratória.

5.6 Análise da morfologia nuclear com DAPI

Dentre os processos de morte celular, destacam-se a necrose e apoptose, os quais provocam alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas bem descritas na literatura. Para compreender os efeitos dos tratamentos com os flavonoides sobre a morfologia nuclear, os núcleos das células foram corados com DAPI (**Figura 12**). Os resultados demonstraram que os flavonoides que induziram maiores alterações morfológicas nucleares que podem estar relacionadas aos processos de necrose ou apoptose foram a Sp1 e Sp2, tais como o extravasamento do conteúdo nuclear (setas vermelhas), a condensação do núcleo e da cromatina (setas amarelas) e a marginação da cromatina condensada (seta branca). As alterações na morfologia nuclear aliadas às alterações no citoesqueleto observadas através das colorações com panótico e faloidina, tais como a perda ou retração do citoplasma, demonstram um forte efeito citotóxico dos produtos acima testados, especialmente Sp1 e Sp2. A TMZ e a Sp3 não induziram alterações destacáveis na morfologia nuclear.

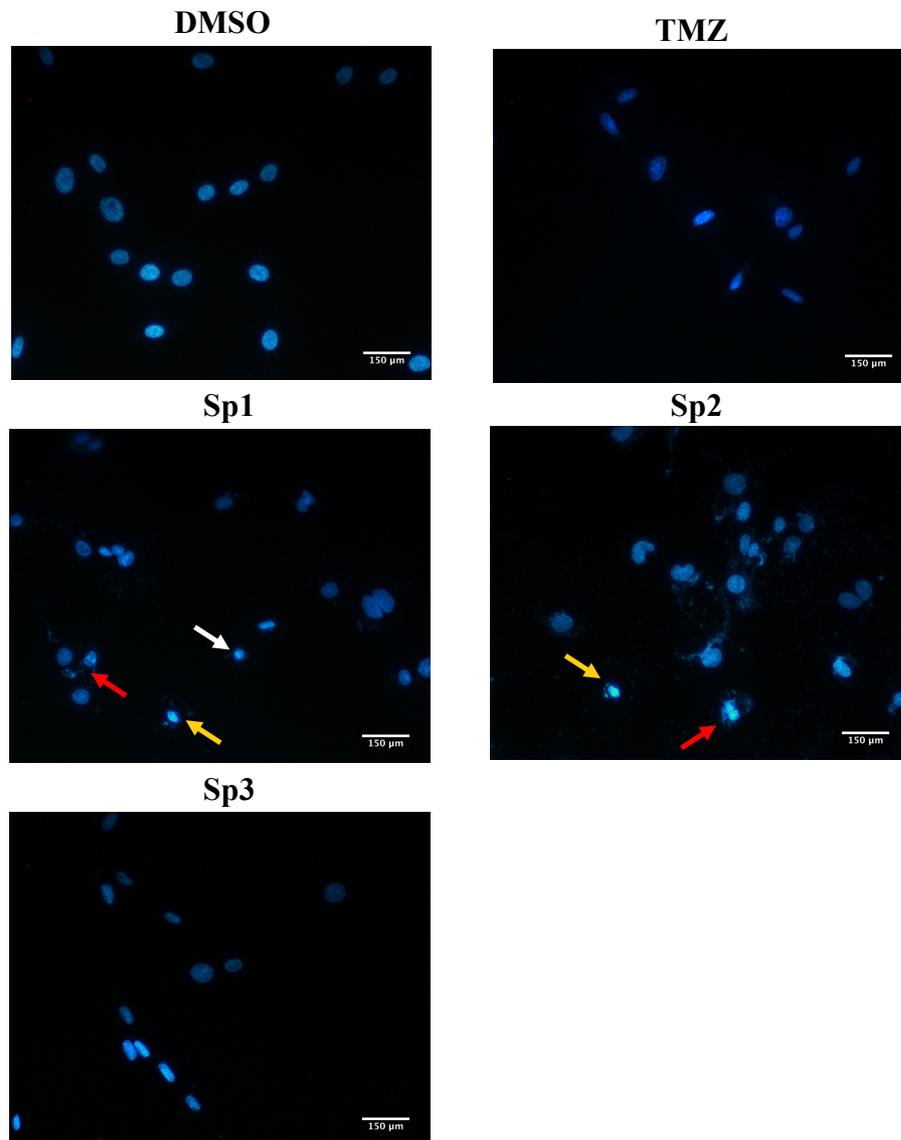
Figura 11 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a capacidade migratória do GBM02



Fonte: Autora, 2018.

Nota: **A** - representa fotografias da linhagem de GBM02 durante o ensaio do *scratch* e **B** – representa o percentual de fechamento do risco nos tempos 0 h (T0) e 24 h (T24) para cada condição. Foram analisadas as condições de confluência das células tratadas com: DMSO 0,1%, temozolomida – 250 µM e os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 – 50 µM. (*) representa as diferenças entre TMZ e (•) entre o DMSO 0,1%. **** $p < 0,0001$.

Figura 12 – Efeito dos tratamentos com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre a morfologia nuclear do GBM02



Fonte: Autora, 2018.

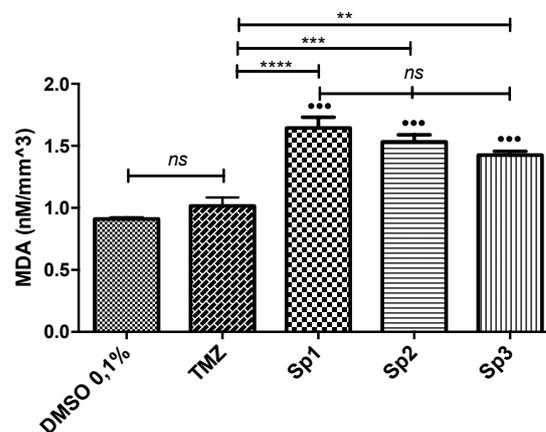
Nota: As imagens representam o efeito dos flavonoides (Sp1, Sp2, Sp3- 50 µM) – 50 µM, e temozolomida (TMZ) – 250 µM sobre a morfologia nuclear após 72 h de tratamentos. O azul representa o núcleo da célula. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência no aumento de 40x. A seta branca demonstra o núcleo com a cromatina margeada e condensada; as amarelas demonstram a condensação do núcleo e as vermelhas indicam o extravasamento do conteúdo nuclear.

5.7 Análise da peroxidação lipídica através da determinação do MDA por HPLC-UV

Um dos possíveis mecanismos que poderiam induzir o processo de permeabilização das membranas citoplasmáticas, observado nos ensaios de viabilidade celular com azul de tripan, ou de permeabilização da membrana nuclear, verificado através da coloração com DAPI, é a

peroxidação das membranas lipídicas. Os resultados demonstraram (**Figura 13**) que o tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 induziram igualmente um aumento na formação do MDA comparativamente ao grupo controle e apresentaram atividade superior à TMZ. Estas análises sugerem que o processo de peroxidação lipídica pode ter contribuído para a permeabilização das membranas aqui observadas, induzindo a morte celular, conforme indicado na **Figura 13**.

Figura 13 – Análise da peroxidação lipídica através da determinação do malonaldeído por HPLC-UV



Fonte: Autora, 2018.

Nota: Análise do efeito dos tratamentos com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3- 50 μM e temozolomida (TMZ) – 250 μM sobre a produção do malonaldeído (MDA), um marcador para peroxidação lipídica, expressa em nM/mm^3 . As barras representam o erro padrão da média, onde (*) mostra diferenças entre a TMZ e (•) entre o DMSO 0,1%. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ e ••• $p < 0,001$.

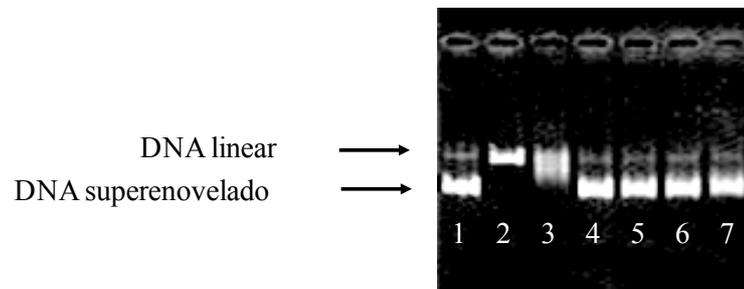
5.8 Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 sobre o envelhecimento do DNA

A ação da enzima TOPO II- α pode ser refletida sobre o estado topológico do DNA. O estado linearizado reflete a ação desta enzima sobre a abertura das fitas duplas de DNA, permitindo desta forma que processo de replicação DNA prossiga. Assim, para investigar os efeitos antiproliferativos dos tratamentos com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 – 10 μM sobre o GBM02, verificou-se o estado de envelhecimento do DNA. Utilizou-se para isto o etoposídeo como inibidor padrão do tipo veneno da TOPO II- α .

A **Figura 14** mostra os efeitos inibitórios dos flavonoides isolados da *S. paludosum* sobre a ação da enzima DNA topoisomerase II- α . Observou-se que todas as amostras (linhas 4 a 7) impediram a degradação do DNA superenovelado (plasmídeo pHOT1), na concentração de

10 μM . Todos os flavonoides apresentaram padrão de banda semelhante ao controle positivo, o etoposídeo (linha 4), portanto a atividade de Sp1, Sp2 e Sp3 deve ser do tipo veneno para TOPO II. Este resultado é muito importante porque um dos mecanismos do potencial antitumoral das amostras pode estar relacionado à inibição da TOPO II- α humano. Utilizou-se a concentração de 10 μM neste experimento visto que a atividade dos compostos foi avaliada em um sistema isolado de DNA, o plasmídeo pHOT1, reduzindo a possibilidade de metabolismo e alteração química ataque dos grupamentos farmacofóricos dos compostos. Ainda, esta foi a concentração mínima inibitória neste sistema.

Figura 14 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 sobre a topologia do plasmídeo kDNA pHOT1



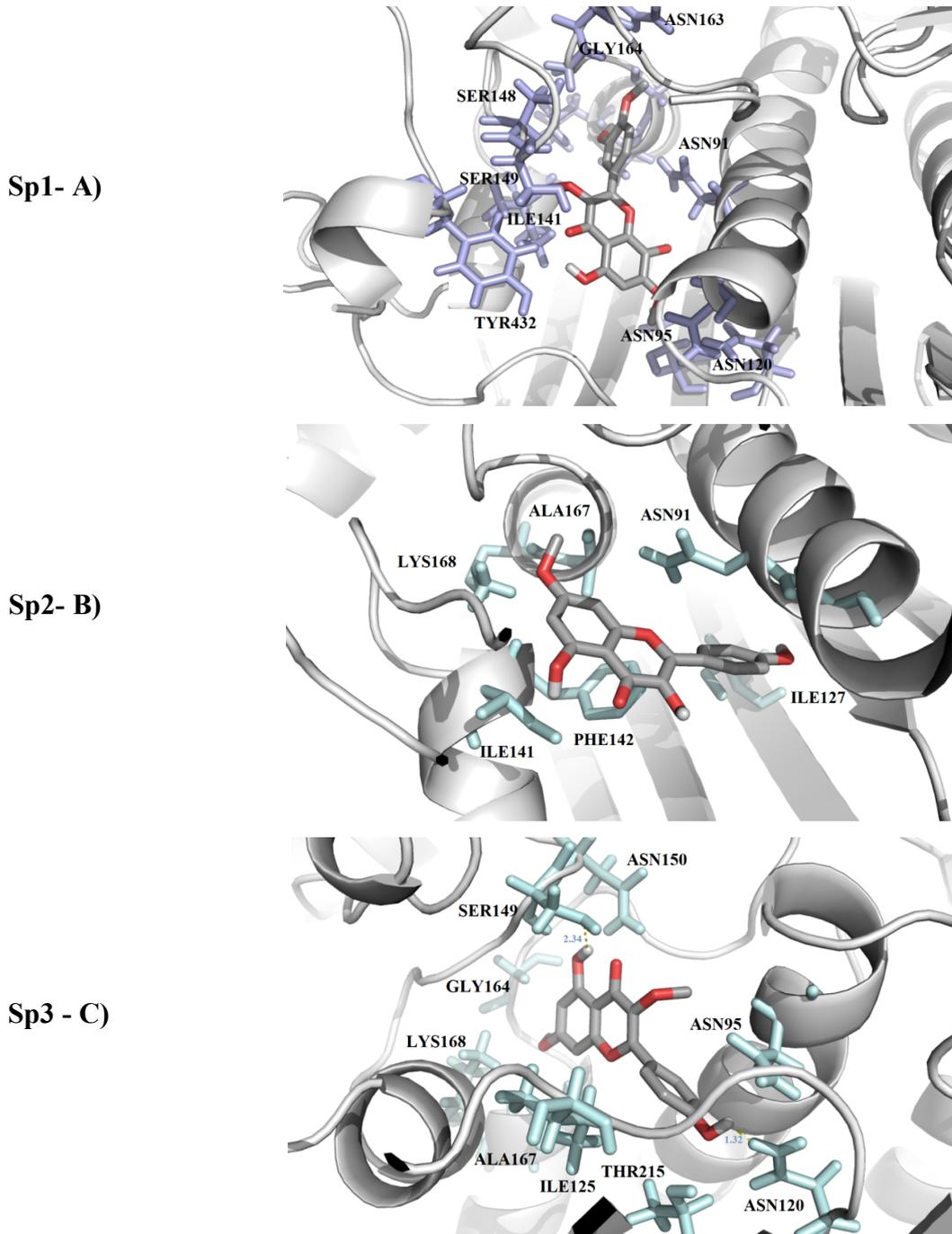
Fonte: Autora, 2018.

Nota: *Linha 1*: DNA pHOT1 (0,125 $\mu\text{g/mL}$); *Linha 2*: Marcador de DNA Linear (pHOT1) (0,125 $\mu\text{g/mL}$); *Linha 3*: DNA pHOT1 (0,125 $\mu\text{g/mL}$) + Topo II (0,3 $\mu\text{L}/3\text{U}$); *Linha 4*: DNA pHOT1 (0,125 $\mu\text{g/mL}$) + Topo II (0,3 $\mu\text{L}/3\text{U}$) + Etoposídeo (10 μM em DMSO 1%); *Linha 5*: DNA pHOT1 (0,125 $\mu\text{g/mL}$) + Topo II (0,3 $\mu\text{L}/3\text{U}$) + Amostra SP01 (10 μM em DMSO 1%); *Linha 6*: DNA pHOT1 (0,125 $\mu\text{g/mL}$) + Topo II (0,3 $\mu\text{L}/3\text{U}$) + Amostra SP02 (10 μM em DMSO 1%); *Linha 7*: DNA pHOT1 (0,125 $\mu\text{g/mL}$) + Topo II (0,3 $\mu\text{L}/3\text{U}$) + Amostra SP03 (10 μM em DMSO 1%); Condições de corrida: 50 V por 1:30 h.

5.9 Análise da interação entre os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 e a enzima TOPO II- α por *Docking* molecular

A estrutura dos flavonoides foi desenhada e otimizada, e posteriormente, importada para a enzima TOPO II- α para a simulação de *docking*. A conformação mais favorável dos flavonoides Sp1, Sp2 ou Sp3 foi analisada (SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR; AQUINO, 2017). De acordo com Boonyalai e cols. (2013), os resíduos de aminoácidos envolvidos na inibição da TOPO II- α são Asparagina 91 e 120 (Asn91 e 120), Isoleucina 125 (Ile125), Leucina 140 (Leu140), Fenilalanina 142 (Phe142), Serina 148 e 149 (Ser148 e 149), e Asparagina 150 (Asn150).

Figura 15 – Interação dos flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 com o sítio de ligação da enzima TOPO II- α



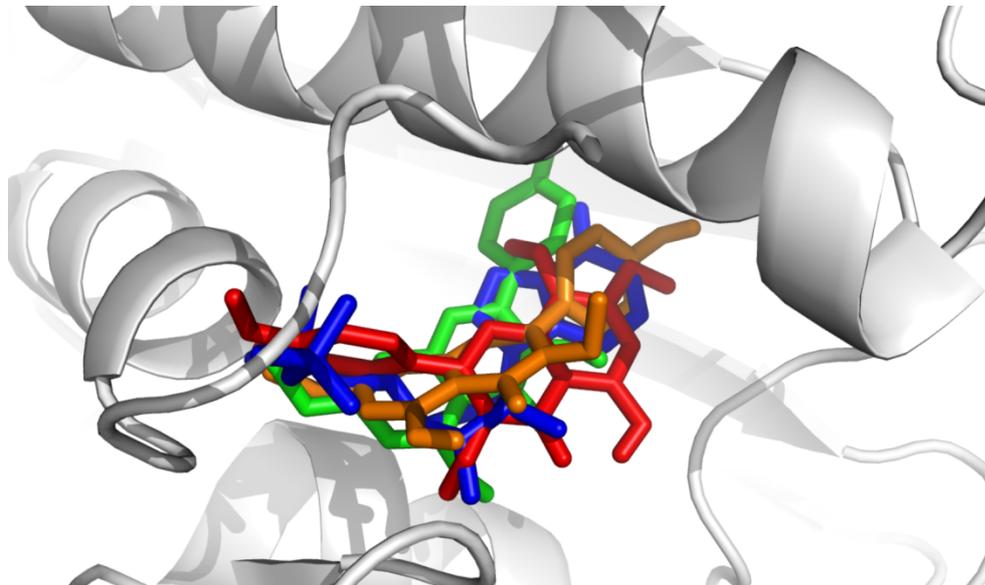
Fonte: Autora, 2018.

Nota: Complexo formado entre a enzima TOPO II- α , representada pelas estruturas em cinza, e os flavonoides Sp1 (A), Sp2 (B) e Sp3 (C) em cinza e vermelho, as quais indicam átomos de Carbono e de Oxigênio, respectivamente.. As estruturas em verde ou lilás representam os aminoácidos Asparagina (ASN), Alanina (ALA), GLY (glicina), ILE (isoleucina), Serina (SER), fenilalanina (PHE) e tirosina (TYR). **A** – Interação da Sp1 com resíduos de ASN 91/120 e SER 148/149 e localização dos anéis A e C do flavonoide entre ASN 91/95 e ILE 141/432; **B** – Interação da Sp2 com resíduos de ASN 91 e PHE 142; **C** – Interação de Sp3 com resíduos de ASN 120/150 e SER 142, e entre as ligações de hidrogênio dos grupamentos hidroxila e ASN 120 (distância de 1.32 Å) e ASN 150 (a 2.34 Å).

Assim, observou-se que o composto **Sp1** interage com 4 aminoácidos importantes para atividade sobre a enzima, sendo estes Asn91 e 120, Ser148 e 149 (**Figura 15A**), não sendo identificadas interações via ligações de hidrogênio; os anéis A e C foram localizados na região entre Asn91 e 95, Ile141 e Tyr432, caracterizando uma interação hidrofóbica. O flavonoide **Sp2** interage com os aminoácidos Asn91 e Phe142 e está orientado em uma posição diferente da **Sp1** (**Figura 15B**); não foram identificadas interações via ligações de hidrogênio, visto que os contatos hidrofóbicos são mais importantes na formação deste complexo. O **Sp3** interage com resíduos de Asn120 e 150, e Ser149 (**Figura 15C**) e interage via ligações de hidrogênio entre grupamentos hidroxila e a Asn120 e 150, com distâncias de 1,32 e 2,34 Å, respectivamente. Todos estes resultados são similares àqueles observados por Boonyalai e cols. (2013).

Adicionalmente, a análise do *cluster* revelou que os compostos **Sp1**, **Sp2** e **Sp3** são orientados da mesma forma que a molécula de ADP, com poucas interações via ligações de hidrogênio, semelhante aos resultados obtidos por Boonyalai e cols. (2013). Observou-se ainda que o composto **Sp1** apresenta um modo de ligação semelhante à molécula de ADP, enquanto a **Sp3** demonstrou a forma de ligação diferente dentre **Sp1** e **Sp2**.

Figura 16 – Interações entre Sp1, Sp2, Sp3 e a molécula de ADP no sítio ativo da TOPO II- α



Fonte: Autora, 2018.

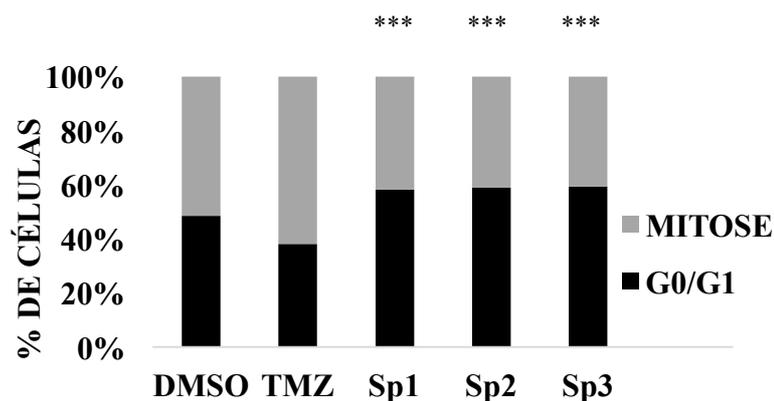
Nota: Em azul: ADP; verde: Sp1; vermelho: Sp2; laranja; Sp3.

Cálculo do DFT: utilizou-se o modelo de MQ para calcular corretamente a energia de ligação, visto que o docking não é capaz de prever as energias de ligação com precisão. Para isto, os complexos otimizados da enzima/ligante foram selecionados e suas energias de ligação foram determinadas. Adicionalmente, a estas estruturas, os complexos foram otimizados utilizando-se o mesmo nível de teoria para calcular a energia de ligação. Posteriormente, as energias relativas foram corrigidas aplicando-se o ponto de energia zero (do inglês, *zero point energy* – ZPE) (KHOSRAVAN et al., 2016; SILVA-JÚNIOR et al., 2017). A energia relativa de ligação para Sp1, Sp2 e Sp3 foram estimadas como valores negativos -12.4, -10.8, e -8.4 kcal·mol⁻¹, respectivamente. Estes valores sugerem um alto potencial de ligação destes compostos com a enzima TOPO II- α .

5.10 Efeito dos tratamentos com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre o ciclo celular do GBM02

Após 72 h de tratamento todos os flavonoides e a fração flavonoídica aumentaram significativamente a proporção de células na fase G0/G1 e reduziram significativamente a proporção de células nas fases S e G2/M, comparativamente ao controle demonstrando que esses produtos inibem o processo mitótico, conforme indicado na **Figura 17**.

Figura 17 – Efeito do tratamento com os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 e temozolomida sobre o ciclo celular do GBM02



Fonte: Autora, 2018.

Nota: Ciclo celular após 72h de tratamento com flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 – 50 μ M e temozolomida (TMZ) – 250 μ M. As colunas pretas representam a proporção de células na fase G0/G1 do ciclo celular e as colunas azuis claras representam a proporção de células nas fases S e G2/M. *** p < 0,0001 (teste do qui-quadrado).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os flavonoides extraídos da *S. paludosum*, Sp1, Sp2 e Sp3 apresentaram ação citotóxica, induzindo a inibição da enzima TOPO II- α , a peroxidação lipídica e atividade anti-migratória sobre a linhagem de GBM humano após 72h de tratamento.

Os flavonoides Sp1 (Gossipetina – 3,7,8,4'-tetra-O-metil éter), Sp2 (7-O-metil éter de kaempferol) e Sp3 (3,7-di-O-metila de kaempferol) extraídos das partes aéreas da *S. paludosum* apresentaram estruturas semelhantes à gossipetina, uma flavona hexahidroxilada, e ao kaempferol, um flavonol terahidroxilado. A principal diferença entre a estrutura destes compostos foi a presença de grupamentos metoxila (O-CH₃) em substituição a hidroxila (OH), resultado de um processo de metilação oriundo do metabolismo secundário das plantas. A Sp1 assemelha-se à gossipetina, entretanto apresenta as substituições -CH₃ nas posições 3,7,8,4'; a Sp2 e Sp3 assemelham-se ao kaempferol, entretanto ambas possuem o grupamento -CH₃ na posição 7 do anel A, sendo que a Sp3 ainda possui um grupamento -CH₃ na posição 3 do anel C, conforme indicado na **Figura 6**.

O processo de metilação de flavonoides parece incremental do ponto de vista da química medicinal, visto que a forma metilada apresenta maior estabilidade metabólica, facilita o transporte através de membranas lipídicas (lipofilicidade), facilita a absorção e melhora a biodisponibilidade oral (KOIRALA et al., 2016). Wen e Walle (2006) verificaram uma maior biodisponibilidade com os flavonoides metoxilados comparativamente aos hidroxilados em presença da fração hepática humana S9, que é um *pool* de enzimas hepáticas mitocondriais utilizadas para testes de metabolismo de drogas. Neste mesmo trabalho, os estudos revelaram maior permeabilidade dos compostos metoxilados à monocamada de células humanas de adenocarcinoma de cólon (WEN; WALLE, 2006). Não foi possível neste estudo avaliar comparativamente a atividade dos compostos metoxilados com seus análogos hidroxilados, entretanto acredita-se que o processo de metoxilação dos flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 possa tornar esses compostos mais permeáveis à membrana celular, conferindo vantagens e facilitando sua ação dentro da célula.

Os ensaios de viabilidade celular demonstraram que os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 reduziram a atividade metabólica mitocondrial e a quantidade de células viáveis após 72 h de tratamento. Apesar dos ensaios com MTT e da coloração com azul de tripan não esclarecerem se os efeitos destes compostos são do tipo citostático ou citotóxico, estudos anteriores confirmam a ação de diferentes flavonoides, tais como a rutina, apigenina, crisina e quercetina sobre a viabilidade celular de linhagens de GBM através do MTT e por azul de tripan. Estes

estudos também demonstram os efeitos antiproliferativos destes flavonoides determinados através dos métodos da redução da incorporação da timidina e bomodeoxiuridina (BrdU) (SANTOS et al., 2011; WENG; HO; LIN, 2005), sugerindo que esta classe de compostos pode induzir o efeito antiproliferativo de uma forma padrão. Acredita-se que estes compostos apresentem atividade antiproliferativa e citotóxica, sendo que esta última pôde ser inferida através da análise morfológica.

As análises histológicas e as marcações com DAPI efetivamente confirmaram o efeito citotóxico dos tratamentos com flavonoides, especialmente do Sp1 e Sp2, sobre a linhagem de GBM02, os quais induziram um padrão morfológico típico de morte celular, como a retração ou destruição citoplasmática, picnose e extravasamento do conteúdo celular, entretanto não foi possível quantificar, a partir destes estudos, os processos de morte por apoptose e/ou necrose induzidos por estes tratamentos. Tu e cols. (2016) descreveram alterações morfológicas induzidas pela apoptose em linhagem de células de câncer cervical tratadas com o kaempferol compatíveis com aquelas encontradas em nossos resultados, tais como encolhimento celular, arredondamento e diminuição do número de células. Estas alterações foram acompanhadas por uma destruição das redes de microtúbulos e microfilamentos de tubulina, que desempenham papel importante nos processos de divisão e migração celular (TU et al., 2016).

O processo de migração celular compreende várias etapas. Inicialmente, um sinal externo inicia o processo, no qual as células adotam uma morfologia mais polarizada e alongada. Na parte anterior da célula, a polimerização actina conduz a formação de protusões da membrana, que podem ser planas, os lamelipódios, ou em forma de dedos, os filopódios, na direção na qual a célula se deslocará. Na extremidade dos lamelipódios ocorre a formação de pontos de adesão que conectam a matriz extracelular (MEC) ao citoesqueleto da actina, permitindo a ancoragem das protrusões do citoesqueleto na MEC e, conseqüentemente, o arraste do corpo celular através da despolimerização da actina na parte oposta à direção da migração (CLAINCHE; CARLIER, 2008). Em células tumorais, as metaloproteinases também contribuem com o processo de migração tumoral mediando a proteólise dos constituintes da MEC (FORSYTH et al., 1999; SANTOS et al., 2015). A organização dos filamentos de actina, portanto, assume um papel de fundamental importância para os processos de adesão e migração celular.

Os resultados demonstraram que os tratamentos com os flavonoides induziram a desorganização dos filamentos de actina, a redução da intensidade das marcações imunocitoquímicas e dos filopódios, especialmente com os flavonoides Sp1 e Sp2, sugerindo uma possível destruição dos filamentos de actina. As análises histológicas corroboraram

fortemente esses resultados, demonstrando que os tratamentos induziram também uma alteração morfológica nas células, as quais ficaram mais arredondadas, adotando um perfil não compatível com o padrão alongado necessário para a migração celular. As substâncias Sp1 e Sp2 induziram um padrão morfológico compatível com um processo de morte, como a retração e a perda citoplasmática e a picnose. Possivelmente estes compostos induziram a redução da capacidade migratória devido a um processo de morte avançado já estabelecido. Não houve diferença entre os efeitos dos tratamentos sobre a organização dos filamentos de actina induzidos por Sp1 e Sp2, entretanto, houve diferença entre a Sp1 e Sp3. A estrutura química dos flavonoides Sp2 e Sp3 são bem semelhantes, ambos apresentam a O-H na posição 4' do anel B, entretanto a Sp3 possui uma substituição do O-H pelo O-CH₃ na posição 3 do anel C. Possivelmente esta substituição da hidroxila na Sp3 induziu apenas um efeito brando na ação deste composto sobre a organização dos filamentos de actina, visto que as diferenças entre este e a Sp2 não foram significativas.

A análise da capacidade migratória tumoral demonstrou que os flavonoides Sp1, Sp2, Sp3 à 50µM reduziram a mobilidade do GBM. Os compostos Sp1 e Sp2 aumentaram a área do *scratch*, possivelmente devido a um processo de retração citoplasmática relacionado à morte celular, enquanto a Sp3 reduziu a área de risco, mas manteve a morfologia alongada das células, um padrão bastante semelhante à temozolomida. Este efeito sobre a redução da mobilidade do GBM também foi descrito por outros estudos com flavonoides, como a crisina, o kampferol, a rutina e o luteolim (CANTERO, 2006; SANTOS et al., 2011).

Na tentativa de avaliar os mediadores ou sistemas envolvidos neste efeito citotóxico, verificou-se o processo de peroxidação lipídica que é um processo de destruição da membrana celular resultante da ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) sobre lipídios que possuem dupla ligação, especialmente os ácidos graxos poliinsaturados (AYALA; MUNOZ; ARGUELLES, 2014), o que resulta na formação de diversos marcadores, dentre eles o MDA. Esta biomolécula é frequentemente utilizada como biomarcador padrão da peroxidação lipídica, em virtude da simplicidade do método e baixo custo (NIKI, 2014; SPICKETT et al., 2010). As análises de MDA demonstraram que, após 72 h de tratamento, os flavonoides aumentaram 83% (Sp1), 71% (Sp2) e 55% (Sp3) as concentrações de MDA comparativamente ao controle, sugerindo que o processo de peroxidação lipídica pode estar envolvido na ação citotóxica destes compostos. Apesar de não ter sido identificada a espécie reativa que iniciou este processo, ou a redução das defesas antioxidantes, o MDA, que é uma aldeído mutagênico, também pode interagir com proteínas, inibir a síntese e induzir danos ao DNA e ao ácido ribonucleico (RNA), além de gerar outros subprodutos que podem amplificar

seus efeitos (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; BIRD; DRAPER, 1980; ESTERBAUER; ECKL; ORTNER, 1990).

O processo de peroxidação lipídica ocorre quando espécies reativas atacam lipídios que contenham dupla ligação, particularmente os ácidos graxos poliinsaturados. Esta reação se inicia através da remoção de um hidrogênio do carbono da molécula lipídica formando radicais lipídicos (L^\bullet), que reagem com o O_2 , produzindo o radical peroxila (LOO^\bullet). Este radical remove mais um hidrogênio de uma molécula lipídica formando o radical hidroperoxila ($LOOH$) e um novo radical L^\bullet , propagando desta forma a reação. Como consequência deste processo, a membrana lipídica pode perder a fluidez e a integridade, alterando sua função natural de barreira. Estes radicais também podem interagir com proteínas de membrana, receptores e lipídios que funcionam como transdutores de sinais, a exemplo dos derivados do difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP_3), os quais estão relacionados aos processos de sobrevivência e proliferação celular (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; BIELSKI; ARUDI; SUTHERLAND, 1983; YADAV; RAMANA, 2013).

A capacidade antioxidante dos flavonoides de sequestrar espécies reativas de oxigênio (EROs) está relacionada à sua capacidade de doar hidrogênios (FL-O-H), para inativar a espécie reativa (R^\bullet), formando um radical fenoxil (FL-O $^\bullet$). Este radical é mais estável e pode se estabilizar neutralizando outro radical e gerando a uma quinona mais estável (Flavonoide-quinona). Algumas regras acerca da configuração e da quantidade de O-H podem predispor sua capacidade redutora, a exemplo da presença da hidroxila nas posições 3' e 4' do anel B e 3 e 5 dos anéis A e C que aumentam sua capacidade antioxidante. Em algumas situações, tais como em presença de metais de transição ou em grandes concentrações, os flavonoides apresentam ação pró-oxidante. Da mesma forma, algumas regras podem predizer sua capacidade pró-oxidante, a exemplo da quantidade de hidroxilas que é diretamente proporcional ao seu efeito pró-oxidante, pois contribui para o aumento da produção de radicais hidroxila ($^\bullet OH$), através da reação de Fenton. Cabe ressaltar que a substituição da hidroxila pelo grupo metil ou por glicosídeos reduz sua capacidade tanto pró-oxidante quanto antioxidante (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; FUKUMOTO; MAZZA, 2000; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

O aumento da produção de EROs é sabidamente um dos mecanismos estudados que induz a apoptose em linhagens de GBM após o tratamento com flavonoides. Sharma e cols. (2007) verificaram que o tratamento com 50 μM de kaempferol por 24, 48, 72 e 96h reduziu a viabilidade celular em 36% e 46% (72 e 96h respectivamente) comparativamente ao grupo

tratado com DMSO 0,1%, nas linhagens LN229, U87MG e T98G de GBM, e induziu a apoptose através do aumento da produção de EROs e redução da expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase 1 (SOD-1) e da tioredoxina 1 (TRX-1), promovendo a redução do potencial de membrana mitocondrial e plasmática, aumentando desta forma a fluidez das membranas celulares. Por sua vez, Sahu e cols. (1994) verificaram que o kaempferol induziu um aumento da peroxidação lipídica concomitante à degradação do DNA proveniente de células extraídas do fígado de ratos, de forma dose dependente, até 2 mM.

Estudos prévios demonstram que a gossipetina ou (hexahidroxi-flavona) reduz a viabilidade celular, retarda a progressão do ciclo celular em G0/G1, é um potente antioxidante, apresenta efeitos protetores à ação da ciclofosfamida, um agente alquilante que provoca danos ao DNA através da intercalação de um grupo alquil e reduz a formação de EROs provocada pela radiação gamma (KHAN et al., 2013; LEE et al., 2017; USTUNSOY; AKAL; ALPSOY, 2016).

Os três flavonoides estudados induziram igualmente ao aumento da produção de MDA. Este fato confirma que, apesar destes flavonoides apresentarem estruturas químicas diferentes, tanto na disposição quanto na quantidade de grupos metoxila e hidroxila, seus efeitos sobre a peroxidação lipídica foram semelhantes. O composto Sp1 apresenta 4 metoxilações em sua estrutura, possivelmente reduzindo sua capacidade reativa em relação aos outros flavonoides testados, que possuem apenas 1 (Sp2) e 2 (Sp3) grupamentos metoxilas, sugerindo que, possivelmente, outros mecanismos também possam estar envolvidos na geração de espécies reativas ou na redução das defesas antioxidantes que induzam a peroxidação lipídica e a formação do MDA.

Apesar da concentração e do tempo de tratamento utilizados neste estudo serem idênticas àquelas utilizada por Sharma e cols. (2007), os flavonoides diferem estruturalmente do kaempferol devido a presença dos grupamentos metoxila. Assim, os dados analisados nos ensaios de peroxidação lipídica aliados à análise estrutural destes flavonoides demonstram que, mesmo Sp1, Sp2 e Sp3 possuam capacidade reativa reduzida pelos processos de metoxilação, houve um aumento da produção de MDA e morte celular, portanto, sugere-se que os fortes efeitos citotóxicos aqui encontrados possam ser decorrentes do aumento da produção de espécies reativas e da peroxidação lipídica aliados à outros mecanismos. Para compreender a contribuição do processo oxidativo iniciado por espécies reativas de oxigênio no sobre efeitos citotóxicos destes tratamentos, estudos posteriores devem ser realizados adicionando-se, por exemplo, o antioxidante n-acetilcisteína, a fim de verificar a relação entre a formação de EROs e a viabilidade celular destas células.

Outro possível mecanismo de ação estudado que poderia justificar os efeitos citotóxicos destes compostos seria inibição da enzima TOPO II- α . Sua atividade está relacionada a diversos processos celulares, tais como o relaxamento e a decatenação do DNA superenovelado, através da abertura e do religamento da fita dupla do DNA, desempenhando um importante papel nos processos de replicação celular. Esta enzima também atua no relaxamento e na condensação dos cromossomos, interferindo na estrutura das cromátides e no processo de segregação cromossômica (BAUER et al., 2012; HOLM et al., 1989; NITISS, 2009a).

Diante da importante função desta enzima para o processo de replicação e para integridade do genoma, diversos compostos antitumorais têm sido utilizados a fim de inibir a TOPO II- α . O etoposídeo é um agente inibidor da topoisomerase II- α utilizado clinicamente na terapia de câncer de mama, pulmão, testículo, bexiga e na leucemia. O mecanismo de ação deste composto sobre a enzima é do tipo veneno, pois induz a quebra permanente da fita dupla de DNA, impedindo seu religamento, estabilizando assim o complexo de clivagem e, conseqüentemente, induzindo a abertura da fita do DNA, a qual abandona a configuração superenovelada e assume a linear. Devido ao seu conhecido mecanismo de ação, do tipo veneno, o etoposídeo tem sido amplamente utilizado como inibidor padrão da TOPO II- α em ensaios experimentais, induzindo a formação da banda linear, visto por meio de eletroforese, conforme foi demonstrado na **Figura 14** (OSHEROFF, 1989; VAN MAANEN et al., 1988). O acúmulo do complexo de clivagem e da abertura da fita de DNA, caso não sejam reparados pela célula, induzem a morte celular por apoptose (MONTECUCCO; BIAMONTI, 2007; NAM; DOI; NAKAYAMA, 2010).

Em nossos estudos, todos os flavonoides isolados da *S. paludosum* apresentaram efeito inibitório sobre a enzima TOPO II- α sobre o plasmídeo kDNA em 10 μ M, exibindo um padrão de inibição semelhante àquele induzido pelo controle positivo, o etoposídeo. Os efeitos de flavonoides sobre a topologia do DNA são bem descritos na literatura. A genisteína, em linhagem de câncer de colon, induz a quebra do DNA a partir de 10 μ M através da ação da topoisomerase II (15); a luteolina e a quercetina também demonstram atividade sobre a enzima topoisomerase II em linhagem de fibroblastos de ovário de hamster (CANTERO, 2006).

Bandele e Osheroff (2007) correlacionaram a estrutura de diferentes flavonoides à atividade inibitória do tipo veneno sobre a enzima TOPO II- α e estabeleceram uma relação entre a estrutura-atividade dos mesmos, dentre eles o kaempferol. Os autores propuseram um modelo no qual a estrutura do anel B determina a capacidade do flavonoide atuar como veneno da TOPO II- α , de maneira dependente ou independente do estado redox, ou seja, a adição de um agente redutor não interfere na atividade dos compostos sobre a enzima. Os autores

demonstraram que a presença da 4'-OH no anel B do flavonoide possibilita a interação com a enzima na interface entre a enzima e o DNA, independente do estado redox, e que a adição simultânea da hidroxila nas posições 3'-OH e 5'-OH aumentam a susceptibilidade da atividade do tipo veneno ser dependente do estado redox. A estrutura do anel C é de fundamental importância para a interação do flavonoide com a enzima, a presença da dupla ligação entre C2-C3, do C4-ceto grupo no anel C, e da presença da 5-OH no anel A são fundamentais para a ligação do flavonoide com a enzima (BANDELE; OSHEROFF, 2007).

Os flavonoides Sp2 e Sp3 satisfazem todos os quesitos de relação estrutura-atividade sugeridos para exercerem atividade sobre a enzima de maneira independente do estado redox, confirmando nossos resultados obtidos através inibição do plasmídeo. A Sp1 atende aos requisitos necessários nos anéis A e C que garantem a ligação à enzima, entretanto não satisfaz as regras relativas ao anel B referentes à relação entre inibição da enzima e estado redox, pois possui um grupamento metoxila 4'-OCH₃ em substituição à hidroxila 4'-OH, e apenas uma hidroxila na posição uma 3'. Apesar desta diferença estrutural, a atividade da Sp1 sobre a ação da TOPO II- α foi semelhante àquela verificada por Sp2, Sp3, e etoposídeo, portanto, o processo de metoxilação 4'-OCH₃ e da única 3'-OH no anel B não interferiu na sua forma de ação, comparativamente aos outros compostos testados, sugerindo que a atividade destes flavonoides sobre a enzima TOPO II- α é do tipo veneno e independe do estado redox, pois inibiram a enzima mesmo com o aumento da produção do MDA.

Os resultados teóricos obtidos na análise de *docking* molecular e do cálculo da energia de ligação do sistema confirmaram os resultados experimentais e reforçam a hipótese de que a interação dos flavonoides com a TOPO II- α pode ser o principal mecanismo biológico de ação destes compostos na linhagem de glioblastoma humano, visto que interagiram com resíduos de aminoácidos importantes para o funcionamento da enzima e apresentaram um alto potencial de ligação com TOPO II- α . Ainda, os três flavonoides apresentam uma forma de ligação à enzima semelhante ao ADP, uma molécula endógena, fato este que é favorável à atividade inibitória destes compostos.

Através das análises do ciclo celular verificou-se que os tratamentos inibiram a síntese de DNA e os processos de replicação, aumentando a proporção de células em G0/G1 e reduzindo em S/G2/M. Este fato confirma que o DNA é um alvo molecular destes compostos. Lesões na estrutura do DNA levam a célula a ativar mecanismos que protegem a integridade do genoma. Os mecanismos de checagem do DNA durante o ciclo celular visam parar a progressão no ciclo a fim de reparar o dano antes que a célula finalize a mitose, evitando que ocorra a distribuição do material genético alterado às células filhas. Após o reparo do DNA, a

célula pode retomar o ciclo celular ou, caso o dano seja permanente, iniciar o processo de apoptose, conforme sugerido nas análises de imagem. As quinases ataxia telangiectasia mutada (ATM) e ataxia telangiectasia mutada relacionada a Rad3 (ATR) são subfamílias de quinases funcionalmente pertencentes à família da PI3K, ativadas em situações de dano ao DNA provocado por diferentes agentes genotóxicos, induzindo a fosforilação de p53 em resposta ao estresse (KASTAN; BARTEK, 2004; KHANNA et al., 1998; TIBBETTS et al., 1999).

O p53 é uma fosfoproteína envolvida nos processos de controle da progressão do ciclo celular, apoptose e estresse oxidativo, seja diretamente interagindo com proteínas, ou como fator de transcrição, ativando genes que codificam proteínas relacionadas a estes eventos. Quando ativado em resposta ao estresse, medeia a transcrição de p21, uma conhecida proteína inibidora da quinase dependente de ciclina tipo 2 (Cdk2) a qual interage com o complexo ciclina E/Cdk2 inibindo a atividade deste complexo, parando desta forma a progressão do ciclo em G1 (ABBAS; DUTTA, 2009; KASTAN; BARTEK, 2004; PUCCI; KASTEN; GIORDANO, 2000). O p53 desempenha papel fundamental nos mecanismos de checagem do ciclo celular induzidos por lesão ao DNA levando ao retardo ou a parada em G0/G1 (DASIKA et al., 1999; KASTAN; BARTEK, 2004). Attarid e cols. (2004) demonstraram em cultura de fibroblastos embrionários modificados com oncogenes que o etoposídeo induziu a parada da progressão do ciclo celular em G1 de maneira dependente de p53. Em baixas concentrações (2 μ M) o efeito do etoposídeo é mais pronunciado na parada do ciclo em S/G2 do que G1, entretanto a 75 μ M ocorre um aumento significativo em G1, sugerindo que maiores concentrações de etoposídeo induzem maiores danos ao DNA, aumentando ainda mais o recrutamento de p53.

Caso a integridade do DNA não seja restaurada, inicia-se o processo de apoptose. P53 pode induzir a apoptose através da via transcricional, ativando genes que codificam proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2, tais como o modulador de apoptose regulado pelo p53 (PUMA – *p53 upregulated modulator of apoptosis*), proteína X associada a BCL-2 (Bax – *BCL-2-associated X protein*) e o antagonista e homólogo a BCL-2 (Bak – *BCL-2 homologous antagonist/killer*) (KRUISWIJK; LABUSCHAGNE; VOUSDEN, 2015; NAKANO; VOUSDEN, 2001; PFLAUM; SCHLOSSER; MÜLLER, 2014) ou no citosol, onde interage com membros da família Bcl-2 induzindo a formação de poros na membrana externa da mitocôndria provocando e a liberação do citocromo C (CHIPUK et al., 2004; VASEVA; MOLL, 2009). O tratamento com o flavonoide kaempferol em linhagem de câncer de ovário e de cólon humanas desencadeia a apoptose através da ativação de p53, o qual induz o aumento da expressão de proteínas pro-apoptóticas (LI et al., 2009; LUO et al., 2011; POLYAK; XIA; ZWEIER, 1997). O p53 também pode induzir a apoptose provocando um desequilíbrio nas

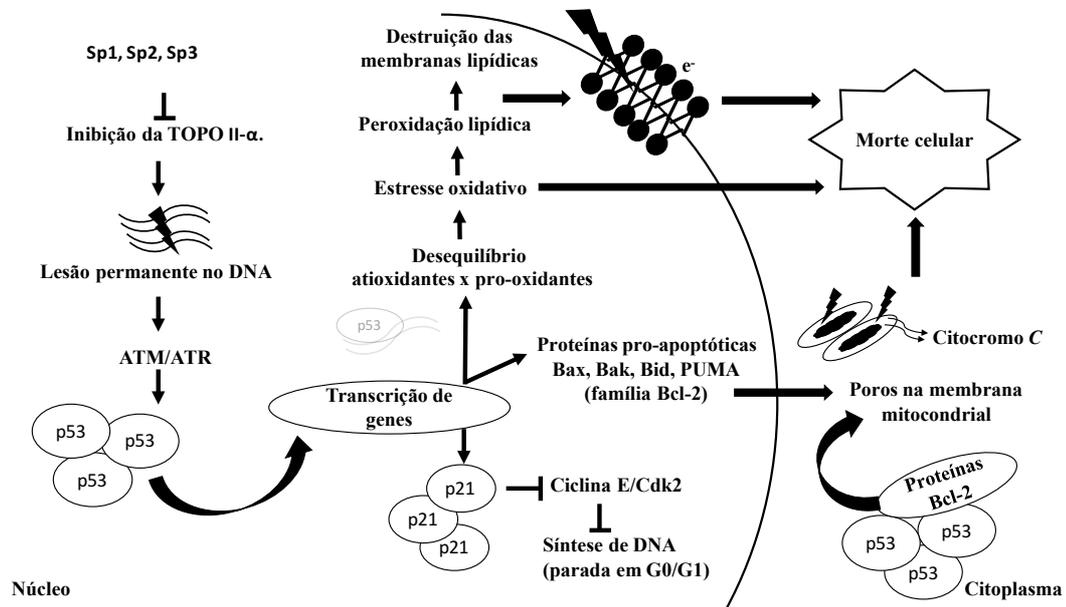
enzimas antioxidantes e induzindo o estresse oxidativo (HUSSAIN et al., 2004; POLYAK; XIA; ZWEIER, 1997). Polyak e cols. (1997) verificaram que este mediador pode induzir a apoptose em células câncer colorretal humano através da transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas no processo de estresse oxidativo, aumentando a produção de EROs e induzindo danos a mitocôndria.

Os tratamentos com os flavonoides (50 μ M) e etoposídeo (40 μ M) duraram 72hs, expondo as células a um maior tempo de tratamento e a concentrações maiores das substâncias, induzindo um dano maior no DNA. Possivelmente este fato provocou um maior recrutamento de p53 e, conseqüentemente, a parada em G0/G1, conforme sugerido por Polyak e cols. (1997).

Podemos sugerir a partir destes dados que a inibição da enzima TOPO II- α pelos flavonoides testados induziu danos permanentes ao DNA e conseqüentemente a parada do ciclo em G0/G1 através do aumento da produção do mediador p53, o qual regula a progressão do ciclo orquestrando os processos de checagem de DNA em G0/G1. A ativação deste mediador possivelmente induziu a apoptose provocando danos a mitocôndria e aumentando a produção de espécies reativas, as quais podem danificar as membranas celulares e induzir a peroxidação lipídica, conforme demonstrado em nossos resultados, esquematizado na **Figura 18**. Estudos posteriores devem ser realizados para identificar e quantificar a proteína p53 em todas as condições aqui analisadas, através de *Western Blot*, e o processo de morte celular confirmado por citometria de fluxo através dos marcadores anexina e iodeto de propídeo, os quais poderão revelar o processo de morte inicial ou avançado (necrose).

Em 2005, a *U.S Food and Drug Administration* aprovou a utilização da temozolomida (Temodar®) como fármaco padrão ouro para o tratamento de GBM o qual representou um aumento modesto na sobrevida dos pacientes (COHEN; JOHNSON; PAZDUR, 2005; STUPP et al., 2005). Atualmente, devido à falta de opções de fármacos disponíveis no mercado com boa tolerabilidade e que sejam eficazes no tratamento deste tipo de tumor, a temozolomida se mantém como tratamento padrão, entretanto, em virtude da baixa sobrevida dos pacientes, o desenvolvimento de protótipos antitumorais se faz extremamente necessário.

Figura 18 – Possíveis mecanismos citotóxicos decorrentes do tratamento com Sp1, Sp2 e Sp3 em células de glioblastoma humano, decorrentes de lesão no DNA induzida pela inibição da TOPO II- α



Fonte: Autora, 2018.

Nota: Sp1, Sp2 e Sp3 induzem lesão permanente no DNA através da inibição da enzima TOPO II- α . As quinases ATM e ATR são ativadas em situação de estresse e induzem a fosforilação de p53, o qual pode atuar na via transcripcional, induzindo a expressão de proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2, que atuam promovendo a integridade da membrana mitocondrial; p53 medeia a transcrição de p21, o qual inibe o complexo ciclina E/Cdk2 induzindo a parada da progressão do ciclo celular em G0/G1 e induz um desequilíbrio entre defesa antioxidante e formação de espécies reativas, induzindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica. O p53 pode atuar no citosol, interagindo com proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 liberando proteínas pro-apoptóticas, como Bax e Bak, que atuam permeabilizando a membrana mitocondrial. A formação de espécies reativas, a permeabilização da membrana mitocondrial e a subsequente liberação do citocromo C e a lesão irreversível no DNA podem induzir a morte celular.

As propriedades antitumorais de flavonoides têm sido amplamente relatadas na literatura, entretanto, sua eficácia não tem superado a ação daqueles utilizados na terapêutica. Por outro lado, Sp1, Sp2 e Sp3 apresentaram atividade superior ao fármaco padrão, conforme demonstrado em todos os experimentos acima descritos. Assim, acredita-se que estes compostos possam servir como modelo estrutural para o desenho e desenvolvimento de novos protótipos de fármacos para o tratamento do GBM. Estudos posteriores devem ser realizados para confirmar suas propriedades anticancerígenas *in vivo*, possivelmente através de modelos de xenotransplante com células de tumores humanos em camundongos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados aqui descritos demonstraram que os flavonoides Sp1, Sp2 e Sp3 extraídos da *S. paludosum* apresentaram efeito citotóxico em linhagem de glioblastoma humano. Verificou-se que os prováveis mecanismos de ação destes compostos é a inibição da TOPO II- α , pois se ligam à resíduos de aminoácidos críticos para o funcionamento desta enzima com alto potencial de ligação. Sugere-se que esta atividade possivelmente tenha levado à parada ou a redução da progressão do ciclo celular em G0/G1, iniciando o processo de morte. Como consequência deste processo, identificou-se a perda da viabilidade celular através da redução do metabolismo mitocondrial e do número de células viáveis. A atividade citotóxica destes flavonoides também foi confirmada através da análise do padrão morfológico nuclear e citoplasmático, que se revelou típica de morte, com extravasamento do conteúdo nuclear, picnose e encolhimento citoplasmático, e do aumento da peroxidação lipídica. O processo de morte celular possivelmente levou à desorganização dos filamentos de F-actina e, consequentemente, à redução da capacidade migratória tumoral do GBM. Todos estes resultados demonstraram efeito superior à temozolomida nos ensaios acima descritos. Estudos posteriores deverão ser realizados para investigar outros mecanismos moleculares responsáveis pela redução da malignidade do GBM, entretanto a inibição da TOPO II- α explica parcialmente os efeitos destes flavonoides descritos neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; DUTTA, A. **P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities** *Nature Reviews Cancer*, v.9, n.6, p.400-414, 2009.
- ATTARDI, L. D.; DE VRIES, A.; JACKS, T. Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene*, v. 23, n. 4, p. 973–980, 2004.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. **Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2014, Article ID 360438, 2014. doi:10.1155/2014/360438.
- BALÇA-SILVA, J. et al. Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic inhibition of PKC-pan in GBM cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1850, n. 4, p. 722–732, 2015.
- BANDELE, O. J.; OSHEROFF, N. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II alpha and II beta. *Biochemistry*, v. 46, n. 20, p. 6097–108, 2007.
- BARNES, S.; PETERSON, T. G.; COWARD, L. Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 59, n. 22 S, p. 181–187, 1995.
- BAUER, D. L. V et al. DNA catenation maintains structure of human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 22, p. 11428–11434, 2012.
- BHATTACHARYYA, J. Isolation of solasodine from the fruits of *Solanum asperum* and *Solanum paludosum*. *Journal of Natural Products*, v. 47, n. 6, p. 1059–1060, 1984.
- BHATTACHARYYA, J. et al. Alkaloids of the root-bark of *Solanum paludosum* Moric. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 37, n. 3, p. 228–229, 2009.
- BIELSKI, B. H.; ARUDI, R. L.; SUTHERLAND, M. W. A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry*, v. 258, n. 8, p. 4759–61, 1983.
- BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells: Growth, morphology, and synthesis of macromolecules. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 6, n. 4, p. 811–823, 1980.
- BOONYALAI, N. et al. Biophysical and molecular docking studies of naphthoquinone derivatives on the ATPase domain of human Topoisomerase II. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 67, n. 2, p. 122–128, 2013.
- BRAGANHOL, E. et al. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anti-cancer drugs*, v. 17, n. 6, p. 663–71, 2006.
- BURDEN, D. A.; OSHEROFF, N. **Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme** *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and*

Expression, v.1400, n. 1-3, p. 139-154, 1998.

CANTERO, G. Topoisomerase II inhibition and high yield of endoreduplication induced by the flavonoids luteolin and quercetin. **Mutagenesis**, v. 21, n. 5, p. 321–325, 1 set. 2006.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749–760, 1997.

CARDENAS, H. et al. Dietary apigenin exerts immune-regulatory activity in vivo by reducing NF- κ B activity, halting leukocyte infiltration and restoring normal metabolic function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, 2016.

CHEN, C. H. et al. Synergistic anti-cancer effect of baicalein and silymarin on human hepatoma HepG2 Cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 638–644, 2009.

CHEN, S. H.; CHAN, N.-L.; HSIEH, T. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. **Annual review of biochemistry**, v. 82, p. 139–70, 2013.

CHIPUK, J. E. et al. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. **Science**, v. 303, n. 5660, p. 1010–1014, 2004.

CHOW, L. M. L. et al. Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb Pathways Induces High-Grade Astrocytoma in Adult Brain. **Cancer Cell**, v. 19, n. 3, p. 305–316, 2011.

CLAINCHE, C. LE; CARLIER, M.-F. F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 489–513, 2008.

COHEN, M. H.; JOHNSON, J. R.; PAZDUR, R. Food and Drug Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 19 Pt 1, p. 6767–71, 2005.

CORDERO-HERRERA, I. et al. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 10–19, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Natural products: A continuing source of novel drug leads** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

DA SILVA, T. B. C. et al. Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 199, 2016.

DA SILVA, T. M. S.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* Agra & Nee e *S. paludosum* moric. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1119–1128, 2009.

DAI, C. et al. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas from and oligoastrocytomas neural progenitors and astrocytes in vivo. **Genes and Development**, v. 15, n. 15, p. 1913–1925, 2001.

DALLAKYAN, S. **PyRx - Python Prescription**, [s.d.].

DASIKA, G. K. et al. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7883–99, 1999.

DE FÁTIMA AGRA, M.; DE FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114–140, 2007.

DELANO SCIENTIFIC, L. **PyMOL program** California, 2006.

DEWEESE, J. E.; OSHEROFF, N. The use of divalent metal ions by type II topoisomerases. **Metalomics : integrated biometal science**, v. 2, n. 7, p. 450–9, 2010.

DU, X. et al. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. **Chemistry and Biology**, v. 7, n. 9, p. 733–742, 2000.

DUBOIS, L. G. et al. Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, n. December, p. 418, 2014.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

ESTERBAUER, H. et al. Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 319–28, 1984.

ESTERBAUER, H.; ECKL, P.; ORTNER, A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 238, n. 3, p. 223–233, 1990.

FORSYTH, P. A et al. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. **British journal of cancer**, v. 79, p. 1828–1835, 1999.

FORTERRE, P. et al. Origin and evolution of DNA topoisomerases. **Biochimie**, v. 89, n. 4, p. 427–446, 2007.

FUJII, N. et al. Induction of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by the plant naphthoquinones plumbagin and shikonin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2589–2594, 1992.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3597–3604, 2000.

GALVAO, R. P. et al. Transformation of quiescent adult oligodendrocyte precursor cells into malignant glioma through a multistep reactivation process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 40, p. E4214-23, 2014.

GONÇALVES, J.; JUNIOR, J. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, n. 6, p. 845–850, 1994.

HEGI, M. E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 10, p. 997–1003, 2005.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. **Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships** **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.10, p.572-584, 2002.

HOLM, C. et al. DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 0270–7306; 1, p. 159–168, 1989.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M. E.; OLIVER, R. T. D. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, n. 1, p. 89–96, 1993.

HUSSAIN, S. P. et al. p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis. **Cancer Research**, v. 64, n. 7, p. 2350–2356, 2004.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

JACQUES, T. S. et al. Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. **The EMBO journal**, v. 29, n. 1, p. 222–235, 2010.

Jurubeba-roxa (Solanum paludosum) Planta Medicinal. Disponível em: <<https://www.vegetall.com.br/jurubeba-roxa-solanum-paludosum/>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. **Cell-cycle checkpoints and cancer** **Nature**, v.432, n.7015, p.316-323, 2004.

KENIG, S. et al. Topoisomerase II β mediates the resistance of glioblastoma stem cells to replication stress-inducing drugs. **Cancer cell international**, v. 16, p. 58, 2016.

KHAN, A. et al. Gossypetin, a naturally occurring hexahydroxy flavone, ameliorates gamma radiation-mediated DNA damage. **International Journal of Radiation Biology**, v. 89, n. 11, p. 965–975, 2013.

KHAN, M. T. H. et al. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, n. 3, p. 383–389, 2009.

KHANNA, K. K. et al. ATM associates with and phosphorylates p53: Mapping the region of interaction. **Nature Genetics**, v. 20, n. 4, p. 398–400, 1998.

KHOSRAVAN, A. et al. The effects of fluorine substitution on the chemical properties and inhibitory capacity of Donepezil anti-Alzheimer drug; Density functional theory and Molecular docking calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 71, p. 124–134, 2016.

KIM, K.; VANCE, T. M.; CHUN, O. K. Greater flavonoid intake is associated with improved

CVD risk factors in US adults. **British Journal of Nutrition**, p. 1–8, 2016.

KIRKEGAARD, K.; WANG, J. C. Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. **Journal of Molecular Biology**, v. 185, n. 3, p. 625–637, 1985.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro-Oncology**, v. 1, n. 1, p. 44–51, 1999.

KOIRALA, N. et al. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 86, p. 103–116, 2016.

KORKINA, L. G.; AFANAS'EV, I. B. Antioxidant and Chelating Properties of Flavonoids. **Advances in Pharmacology**, v. 38, n. C, p. 151–163, 1996.

KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. P53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 393–405, 2015.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. **Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview** *The Scientific World Journal*, v.2013 Published online 2013 Dec 29. doi: 10.1155/2013/162750 2013.

LAURA, D. et al. Identification of Protein Palmitoylation Inhibitors from a Scaffold Ranking Library. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 19, n. 4, p. 262–274, 2016.

LEE, M. S. et al. Anti-prostate cancer potential of gossypetin via inducing apoptotic and autophagic cell death. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 12, p. 2578–2592, 2017.

LI, W. et al. Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via the Ataxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 177, n. 2, p. 121–127, 2009.

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

LIMA, F. R. S. et al. **Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1826 n. 2, p. 338-349, 2012.

LINDBERG, N. et al. Oncogenic signaling is dominant to cell of origin and dictates astrocytic or oligodendroglial tumor development from oligodendrocyte precursor cells. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 44, p. 14644–51, 2014.

LINDSLEY, J. E.; WANG, J. C. Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 23, p. 10485–10489, 1991.

LINDSLEY, J. E.; WANG, J. C. On the coupling between ATP usage and DNA transport by

- yeast DNA topoisomerase II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 11, p. 8096–8104, 1993.
- LLAGUNO, S. A. et al. NIH Public Access. **Cancer**, v. 15, n. 1, p. 45–56, 2010.
- LOUIS, D. N. et al. **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system** *Acta Neuropathologica*, v.114, n.2, p.97-109, 2007.
- LOUIS, D. N. et al. **The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary** *Acta Neuropathologica*, v.131, n.6, p. 803-820, 2016.
- LUO, H. et al. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. **Food Chemistry**, v. 128, n. 2, p. 513–519, 2011.
- MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143–148, 2002.
- MARTINY, V. Y. et al. Blind Pose Prediction, Scoring, and Affinity Ranking of the CSAR 2014 Dataset. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 6, p. 996–1003, 27 jun. 2016.
- MCCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 623, n. 1–2, p. 83–97, 2007.
- MONTECUCCO, A.; BIAMONTI, G. **Cellular response to etoposide treatment** *Cancer Letters*, v. 252, n.1, p. 9-18, 2007.
- MONTEIRO, F. S. et al. Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 895–900, 2012.
- NAKANO, K.; VOUSDEN, K. H. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. **Molecular Cell**, v. 7, n. 3, p. 683–694, mar. 2001.
- NAM, C.; DOI, K.; NAKAYAMA, H. Etoposide induces G2/M arrest and apoptosis in neural progenitor cells via DNA damage and an ATM/p53-related pathway. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 4, p. 485–493, 2010.
- NEWLANDS, E. S. et al. Temozolomide: A review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–61, 1997.
- NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 2, p. 809–17, fev. 2014.
- NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 5, p. 327–337, 2009a.
- NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 5, p. 338–350, 2009b.

- OSHEROFF, N. Effect of Antineoplastic Agents on the DNA Cleavage/Religation Reaction of Eukaryotic Topoisomerase II: Inhibition of DNA Religation by Etoposide. **Biochemistry**, v. 28, n. 15, p. 6157–6160, 1989.
- OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. **Neuro-Oncology**, v. 15, n. SUPPL.2, 2013.
- OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. suppl_5, p. v1–v88, 2017.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 2016.
- PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science (New York, NY)**, v. 321, n. 5897, p. 1807–1812, 2008.
- PATRIDGE, E. et al. **An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives** **Drug Discovery Today**, v. 21, n.2, p. 204-207, 2016.
- PEREIRA, I. S. P.; RODRIGUES, V. F.; VEJA, M. R. G. Flavonoides do Gênero Solanum. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 4–26, 2016.
- PERRY, A.; WESSELING, P. Histologic classification of gliomas. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l: s.n.]. v. 134p. 71–95.
- PFLAUM, J.; SCHLOSSER, S.; MÜLLER, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. October, p. 1–15, 21 out. 2014.
- POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J. L. letters to nature REF NO : 569 A model for p53-induced apoptosis. **Nature**, v. 389, n. September, p. 300–305, 1997.
- PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids** **Fitoterapia**, v.82, n.4, p.513-523, 2011.
- PUCCI, B.; KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cell Cycle and Apoptosis. **Neoplasia**, v. 2, n. 4, p. 291–299, 2000.
- RAVISHANKAR, D. et al. **Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy** **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n.12, p. 2821-2831, 2013.
- RAZZAGHI-ASL, N. et al. Molecular docking and quantum mechanical studies on biflavonoid structures as BACE-1 inhibitors. **Structural Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 607–621, 2015.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids** **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RICHMOND, T. J.; DAVEY, C. A. The structure of DNA in the nucleosome core. **Nature**, v.

423, n. 6936, p. 145–150, maio 2003.

RUSSO, P.; DEL, B. A.; CESARIO, A. Flavonoids acting on DNA topoisomerases: Recent advances and future perspectives in cancer therapy. **Current Medicinal Chemistry**, **19 (31)** (pp 5287-5293), 2012. **Date of Publication: November 2012.**, n. Netherlands RF-81 LG-English PT-Journal: Review DD-20121212, p. 5287–5293, 2012.

SAHU, S. C.; GRAY, G. C. Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Letters**, v. 85, p. 159–164, 1994.

SALTI, G. I. et al. Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 6, p. 796–802, 2000.

SANNER, M. F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 17, p. 57–61, 1999.

SANTOS, B. L. et al. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 404–411, 2011.

SANTOS, B. L. et al. Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 123–138, 2015.

SARMENTO SILVA, T. M. et al. Flavonoids and an alkalamide from *Solanum paludosum* Moric. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 5, p. 479–481, 2002.

SCHERER, H. J. Cerebral astrocytomas and their derivatives. **American Journal of Cancer**, v. 40, n. 2, p. 159–198, 1940.

SCHIAVANO, G. F. et al. Inhibition of breast cancer cell proliferation and in vitro tumorigenesis by a new red apple cultivar. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.

SHARMA, V. et al. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 9, p. 2544–53, 2007.

SILVA-JÚNIOR, E. et al. Dynamic Simulation, Docking and DFT Studies Applied to a Set of Anti-Acetylcholinesterase Inhibitors in the enzyme β -Secretase (BACE-1): An Important Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 13, n. 3, p. 1–9, 2017.

SILVA-JÚNIOR, E.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.; AQUINO, T. Quantum Mechanical (QM) Calculations Applied to ADMET Drug Prediction: A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 18, p. 1–16, 2017.

SILVA, M. M. et al. Interaction of β -carboline with DNA: Spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1558–1568, 2016.

SILVA, M. M. et al. Interaction between bioactive compound 11a-N-tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA : Spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 223–233,

2017.

SILVA, T. M. S. et al. Molluscicidal activity of some Brazilian Solanum spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 419–425, 18 jun. 2005.

SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 3, p. 345–354, 2006.

SINHA, S. et al. Effects of dexamethasone on peritumoural oedematous brain: a DT-MRI study. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 75, p. 1632–1635, 2004.

SIQUEIRA, S. et al. Biological activities of *Solanum paludosum* Moric. Extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, n. 3, p. 391–397, 2011.

SISSI, C.; PALUMBO, M. Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, p. 702–711, 2009.

SONABEND, A. M. et al. Convection-enhanced delivery of etoposide is effective against murine proneural glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 9, p. 1210–1219, 2014.

SPICKETT, C. M. et al. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. **Free radical research**, v. 44, p. 1172–1202, 2010.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, p. 987–96, 2005.

STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009.

TATUM, V. L.; CHANGCHIT, C.; CHOW, C. K. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Lipids**, v. 25, n. 4, p. 226–229, abr. 1990.

THOMPSON, M.; PLANARIA SOFTWARE, L. **ArgusLab 4.0.1**, [s.d.].

TIBBETTS, R. S. et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. **Genes and Development**, v. 13, n. 2, p. 152–157, 1999.

TSAKNIS, J. et al. Rapid high-performance liquid chromatographic method of determining malondialdehyde for evaluation of rancidity in edible oils. **Analyst**, v. 123, n. February, p. 325–327, 1998.

TU, L. Y. et al. The mechanism of kaempferol induced apoptosis and inhibited proliferation in human cervical cancer SiHa cell: From macro to nano. **Scanning**, v. 38, n. 6, p. 644–653, 2016.

USTUNSOY, S.; AKAL, Z. U.; ALPSOY, L. Protective Role of Gossypetin against Cyclophosphamide Toxicity in Human Lymphocyte Culture In vitro. **Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 88–92, 2016.

VAN MAANEN, J. M. S. et al. **Mechanism of action of antitumor drug etoposide: A review** *Journal of the National Cancer Institute*, v.80, n. 19, p.1526-1533, 1988.

VASEVA, A. V.; MOLL, U. M. **The mitochondrial p53 pathway** *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v.1787, n.5, p.414-420, 2009.

VERHAAK, R. G. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.

VERÍSSIMO, M. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti- *Trypanosoma cruzi* agents : Structural design , synthesis and pharmacological evaluation. v. 86, p. 48–59, 2014.

VOLOGODSKII, A. V.; COZZARELLI, N. R. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Seruel.*, v. 23, p. 609–643, 1994.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 3, n. 6, p. 430–440, 2002.

WEN, X.; WALLE, T. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 34, n. 10, p. 1786–1792, 2006.

WENG, M.-S.; HO, Y.-S.; LIN, J.-K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical pharmacology*, v. 69, n. 12, p. 1815–27, 2005.

YADAV, U. C. S.; RAMANA, K. V. **Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013:690545. doi: 10.1155/2013/690545. Epub 2013 Apr 17. 2013.

ZONG, H.; PARADA, L. F.; BAKER, S. J. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 5, p. 1–13, 2015.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo publicado com co-autoria no período do doutorado

frontiers in
CELLULAR NEUROSCIENCEREVIEW ARTICLE
published: 12 December 2014
doi: 10.3389/fncel.2014.00418

Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier

Luiz Gustavo Dubois^{1†}, Loraine Campanati^{2†}, Cassia Rigby¹, Isabella D'Andrea-Meira¹,
Tania Cristina Leite de Sampaio e Spohr¹, Isabel Porto-Carreiro¹, Cláudia Maria Pereira³, Joana
Balça-Silva⁴, Suzana Assad Kahn¹, Marcos F. DosSantos², Marcela de Almeida Rabello Oliveira⁵,
Adriana Ximenes-da-Silva⁵, Maria Celeste Lopes⁴, Eduardo Faveret¹, Emerson Leandro Gasparetto¹
and Vivaldo Moura-Neto^{1,2*}

¹ Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer, Rua do Rezende, Rio de Janeiro, Brazil

² Laboratório de Morfogenese Celular, Instituto de Ciências Biomédicas da, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde (ECS), Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), Duque de Caxias, Brazil

⁴ Centro de Neurociência e Biologia Celular, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

⁵ Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

Edited by:

Ramon Santos El-Bachá,
Universidade Federal da Bahia,
Brazil

Reviewed by:

Ulkan Kiliç, Bezmialem Vakif
University, Turkey
Andrey Turchinovich, German
Cancer Research Center, Germany

***Correspondence:**

Vivaldo Moura-Neto, Instituto
Estadual do Cérebro Paulo
Niemeyer, Rua do Rezende, 156,
Rio de Janeiro RJ 20231-092, Brazil
e-mail: vivaldo@icb.ufrj.br;
vivaldomouraneto@globo.com

[†] These authors have contributed
equally to this work.

Astrocytes, members of the glial family, interact through the exchange of soluble factors or by directly contacting neurons and other brain cells, such as microglia and endothelial cells. Astrocytic projections interact with vessels and act as additional elements of the Blood Brain Barrier (BBB). By mechanisms not fully understood, astrocytes can undergo oncogenic transformation and give rise to gliomas. The tumors take advantage of the BBB to ensure survival and continuous growth. A glioma can develop into a very aggressive tumor, the glioblastoma (GBM), characterized by a highly heterogeneous cell population (including tumor stem cells), extensive proliferation and migration. Nevertheless, gliomas can also give rise to slow growing tumors and in both cases, the afflux of blood, via BBB is crucial. Glioma cells migrate to different regions of the brain guided by the extension of blood vessels, colonizing the healthy adjacent tissue. In the clinical context, GBM can lead to tumor-derived seizures, which represent a challenge to patients and clinicians, since drugs used for its treatment must be able to cross the BBB. Uncontrolled and fast growth also leads to the disruption of the chimeric and fragile vessels in the tumor mass resulting in peritumoral edema. Although hormonal therapy is currently used to control the edema, it is not always efficient. In this review we comment the points cited above, considering the importance of the BBB and the concerns that arise when this barrier is affected.

Keywords: glioblastoma, blood-brain barrier, miRNA, exosomes, neural stem cells, tumor-related epileptic seizures, brain tumor related edema

THE BLOOD-BRAIN BARRIER

It has been one hundred years since Edwin E. Goldmann discovered the blood-brain barrier (BBB). Using trypan-blue dye intravenous injections in several animals, he observed that it spread throughout the body, except for the brain and spinal cord, which remained unstained. When trypan blue was injected into the subarachnoid space at the lumbar level, or in the cisterna magna in young rabbits, the Central Nervous System (CNS), including the choroid plexus (CP), were stained (Goldmann, 1909; Bentivoglio and Kristensson, 2014), confirming the presence of a previously unknown barrier between the blood and CNS structures.

CHOROID PLEXUS

The CP is a structure present in the CNS that also functions as a tissue barrier. It is responsible for the synthesis of the cerebrospinal fluid (CSF) and its major proteins, metabolites and a diversity of other molecules. Anatomically, the CP is a group of thin membranes located inside the lateral, third and fourth

ventricles. It is basically composed of a monolayer of specialized epithelial cells derived from the ependyma that cover the ventricles walls. This monolayer coats a highly perfused stroma containing permeable fenestrated blood vessels, fibroblasts, dendritic cells and macrophages (Redzic et al., 2005). Its degree of vascularization exceeds in 10 times those of the brain parenchyma (Keep and Jones, 1990).

One of the best-described CP-secreted molecules is insulin-growth factor 2 (IGF2), which promotes neuronal proliferation and survival in the developing mouse cortex (Lehtinen et al., 2011). The presence of tight junctions along the basolateral membrane limits the exchange between the CSF and the CP connective tissue, preventing the passage of blood-derived cells and proteins (Vorbrodt and Dobrogowska, 2003). Tight junctions, combined with the expression of several transmembrane transporters, make CP cells the effectors of the blood-CP-CSF barrier (Spector, 2010). The CP is also responsible for the synthesis and generation of nearly two-thirds of the CSF total volume via the secretion of water, ions and macromolecules

ANEXO B – Submissão de patente durante o período do doutorado

24/10/2017 870170081418
18:39

29409161709024916

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 022956 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: coordenacao.nit@ufrpe.br;secretaria.inovatec@ufrpe

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 24/10/2017 às 18:39, Petição 870170081418

Anexo C: Aprovação do Comitê de Ética da UFAL para uso de camundongos Swiss



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO
PROJETO Nº 01/2015

TÍTULO: Avaliação de protótipos de fármacos leishmanicidas.

RESPONSÁVEL: Magna Suzana Alexandre Moreira

OBJETIVO: Este projeto visa à obtenção de protótipos que representem uma nova estratégia terapêutica contra doenças negligenciadas com características multifatoriais, com comprometimento imune e/ou infeccioso.

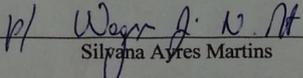
SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 22.06.2015 a 22.06.2016

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo	Swiss	140

Maceió, 16 de junho de 2015.



Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1120858

Os efeitos biológicos da *S. Paludosum* são objeto de estudo do Laboratório de Farmacologia e Imunidade desde 2014, quando foram iniciados estudos *in vitro* a fim de investigar a atividade leishmanicida destes compostos, tanto em linhagens de macrófago J774, quanto em células de mamíferos provenientes do lavado peritoneal de camundongos. Estes estudos ainda não foram publicados, entretanto encontram-se em fase de submissão.