

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Doutorado em Imunologia

**Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e
viabilidade de células de glioblastoma**

Bruno Penas Seara Pitanga
Orientadora – Dr^a Silvia Lima Costa

Salvador – Bahia

2012

BRUNO PENAS SEARA PITANGA

**Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e
viabilidade de células de glioblastoma**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Imunologia na Universidade Federal da Bahia como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Silvia Lima Costa

Salvador – Bahia
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

P681 Pitanga, Bruno Penas Seara

Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e
viabilidade de células de glioblastoma / Bruno Penas
Seara Pitanga. – Salvador, 2012.

87 f.

Orientadora: Profª Drª Silvia Lima Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Imunologia. 2. Glioblastoma. 3. Microglia. 4.
Flavonoides. I. Costa, Silvia Lima. II. Universidade
Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 577.27



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DO DOUTORANDO Bruno Penas Seara Pitanga.

Aos dezessete dias do mês de dezembro do ano de 2012 às 14 horas no auditório Ophélia Gaudenzi no 3º andar do Instituto de Ciências da Saúde, se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Silvia Lima Costa orientadora, Dr. Vivaldo Moura Neto, Dr. Alexander Henning Ulrich, Dr. Ivana Lúcia Oliveira Nascimento Nascimento, Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado: "Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e viabilidade de células de glioblastoma". Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o Doutorando teve a sua defesa de Tese APROVADA emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, e lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pelo Doutorando* e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, dezessete de dezembro de dois mil e doze.

Prof. Dra. Silvia Lima Costa
 Orientadora

Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich
 Banca Examinadora

Prof. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo
 Banca Examinadora

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto
 Banca Examinadora

Prof. Dra. Ivana Lúcia Oliveira Nascimento
 Banca Examinadora

Bruno Penas Seara Pitanga
 Doutorando

Prof. Dra. Silvia Lima Costa
 Coordenadora do PPGIm
 ICS/UFBA

10º Tabelionato de Notas de Salvador BA
 Avenida Princesa Isabel, nº 225 - Barra
 Belª Rosemary Carvalho Muniz - (71) 3036-8900
AUTENTICAÇÃO
 Confere com o original a mim apresentado
 Salvador-BA, 28 de Dezembro de 2012.
 Em Testº da verdade.

VALDILIO SANTOS DE SANTANA-ESCREVENTE
 Custas R\$: 3,00



AOS MEUS QUERIDOS ALUNOS.

*"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original."*

ALBERT EINSTEIN

Agradecimentos

Essa parte do trabalho considero a mais difícil, pois não poderei esquecer ninguém, mas levando em consideração minha escassa memória...

Onde começar? Acho que no começo do doutorado, talvez antes, no final do mestrado. Lembrei. Início os agradecimentos reverenciando meus queridos amigos espirituais que tanto se esforçam para minha orientação. Sei que muitas vezes não dou ouvidos aos seus conselhos, pois necessito de verdadeiros gritos celestiais para aceitar seus ensinamentos.

Voltando ao início, já que estamos falando em orientação, minha querida Sílvia Lima Costa, pessoa que conheci durante uma festa na casa de sua família, na época namorava com Milena Lima (prima da Sílvia), fui apresentado a ela, depois de dois dias, estava lá no laboratório de neuroquímica e biologia celular, claro que não foi tão simples, precisei da indicação da Dr^a Susie Vieira (professora genética). E assim comecei (...) tenho por Sílvia uma eterna gratidão, por ter apostado, orientado e me inserido no contexto acadêmico e científico. Considero uma alma fantástica, sei que posso contar em qualquer momento, inclusive para assuntos extra-acadêmicos. Muito obrigado, Sílvia!

Lembro de pessoas incríveis que convivi este período, mas a primeira mentora que aparece na minha mente é Maria de Fátima Dias Costa (Fau), simplesmente encantadora. Aprendi ética, compromisso, lealdade e principalmente autocontrole, aprendi valores que não são ensinados teoricamente, mas vivenciados através de observação, por isso refletia sobre suas atitudes, gestos, hábitos e percebi o quando eu ainda era imaturo. A você Fau devo todos esses ensinamentos que certamente me acompanharão e jamais serão esquecidos. Muito obrigado!

Agradeço também ao professor Ramon El-Bachá, sua genialidade me inspira, não poderia ter pedido um co-orientador melhor! Falar em Ramon é lembrar de Diego Madureira, sua bondade sempre me comoveu. Embora provavelmente eu tenha atrasado seus experimentos em alguns meses, por conta de um infeliz western blot, nossas conversas sobre neurofarmacologia, dentre outras, foram essenciais para meu raciocínio.

Tenho um enorme carinho por Paulo Coelho, exemplo de luta e esperança. Com ele aprendi a importância de viver a vida plenamente sem se preocupar com a atenção alheia, foram vários momentos de risadas que faziam esquecer por alguns instantes a complexidade do trabalho que resolvemos assumir, muitas vezes era necessária a intervenção de nossa orientadora para acalmar nossos ânimos. Valeu amigo!

Nunca esqueceria Deise Vilas-Boas, com sua energia radiante e resplandecente conseguiu me envolver com muita paz e tranquilidade durante momentos importantes de decisões.

Depois vêm as pessoas que revisaram o manuscrito. Essa tese seria incomparavelmente pior se não fosse por Suzana Braga de Souza, Cátia Suse, Balbino Lino e o Prof. Claudio de Oliveira Romão que corrigiram de forma fantástica erros neste trabalho.

Agradeço ainda aquelas almas pacientes que me ajudaram com maestria em todos os procedimentos e experimentos. Realmente tudo de bom que eu possa dizer sobre essas pessoas não será suficiente, quem são; Giselle Faria, Thyago Cardim, Rute Lima, Erica Viana, Noelio Menezes, Cristina Menezes, Victor Diogenes, Marquinhos (*“e a luta continua”*), Alex Barbosa, Rosaline Guedes, Ravena, Tais Adelita, Mona, Gregory, Rosan, Sr. Carlos e Diego Menezes.

Meus familiares, que apesar de não saberem nada sobre o tema desse trabalho, sempre me incentivaram, utilizando palavras de força quando necessário. Agradeço então a todos vocês, em especial a meus pais, Francisco Pitanga e Verena Pitanga, pelas boas vibrações direcionadas para conclusão desse trabalho, certamente foram absorvidas com muito carinho. Agradeço ainda, a minhas avós Regina Penas Seara e Zuleide Pitanga pelos momentos de descontração propiciados durante a construção desse trabalho, sou muito grato por esses momentos que foram cruciais para continuar essa tese.

Tenho uma dívida impagável com Gustavo Rodrigues, que contribuiu enormemente para a construção desse trabalho. Apesar de não entender muito sobre o tema, sempre buscava em sua biblioteca mental conhecimentos acerca do glioblastoma para ajudar na escrita, foram incontáveis vezes que suas orientações serviram para compor a revisão dessa tese. Às vezes quando ficava angustiado com minha escrita, ele me animava. E, quando esquecia quanto trabalho ainda restava, ele me lembrava. Cada frase é melhor por causa de suas críticas, ajuda e amor. Valeu Gu!

Jamais esqueceria os meus financiadores; inicialmente a CAPES, que pagou minha bolsa sempre pontualmente, sem jamais atrasar. Bolsa que apesar do valor irrisório, foi muito importante para manter meus estudos. Agradeço também ao CNPq. A Universidade Federal da Bahia por ter me acolhido durante esses seis anos (mestrado e doutorado) e, ao Instituto de Ciências da Saúde (ICS), em especial ao Programa de Pós-graduação em Imunologia (PPGIIm), local onde materializa a figura de Dilceia, que pessoa carinhosa, a Dil, agradeço por saber usar as palavras certas nas horas adequadas, esse programa é considerado bom pela CAPES e, esse conceito certamente reflete o excelente trabalho da secretaria desse curso. Dil, muito obrigado por tudo, que Deus te abençoe!

Por fim, a UFRJ em especial a Flavia Lima e Flavia Gomes, pelo acolhimento durante missão de estudos nesta instituição.

Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e viabilidade de células de glioblastoma

RESUMO:

A capacidade reduzida da resposta imunológica no microambiente do glioblastoma é principalmente devido à interação microglia/glioma e está relacionada à sua agressividade. Nossos estudos anteriores demonstraram que os flavonoides derivados de plantas podem atuar como inibidores de crescimento de linhagens celulares humanas de glioblastoma, em especial o flavonoide rutina inibe o crescimento e apresenta capacidade morfogênica, ainda estimula a liberação de agentes imunomoduladores como TNF e NO por astrócitos e microglia em culturas primárias de ratos. O objetivo desse estudo foi verificar a viabilidade de linhagens celulares de glioblastoma humano tratadas com flavonoides, bem como caracterizar essas células quanto à expressão de proteínas do citoesqueleto e morfologia, ainda, investigar se os flavonoides rutina e quercetina, nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, podem modular a resposta imunológica em co-cultura microglia/glioma. Como demonstrado através do teste MTT, após 72h de exposição com os flavonoides, ocorreu inibição dose-dependente da viabilidade das células TG1, U251 e GL15. A caracterização dessas linhagens revelou marcação conjunta de GFAP, beta III tubulina e Nestina em diferentes intensidades e localização. Além disso, verificamos diminuição da capacidade de formação de esferóides em culturas de células TG1 tratadas com rutina. Em culturas de célula C6 a viabilidade não foi afetada após a exposição direta aos flavonoides rutina e quercetina nas concentrações de 50 - 100 μ M por 48h. O teste azul de tripan revelou uma redução dessa viabilidade em ambos os flavonoides testados diretamente. Já durante exposição indireta de meios provenientes de culturas de microglia tratadas com rutina, observamos redução na viabilidade em C6. Além disso, observamos um aumento na expressão de OX-42 em culturas de microglia após a exposição com flavonoides rutina e quercetina, indicando sua ativação. Foi realizado em co-culturas microglia/glioma a marcação para isolectina B4, verificamos que o flavonoide rutina induziu aumento na proliferação de microglia após contagem das células isolectina positivas. Ainda, o teste ELISA realizada em culturas microgliais mostrou que os níveis de TNF

foram aumentados em culturas tratadas com rutina 100 μ M ou quercetina 50-100 μ M. A dosagem de nitrido mostrou aumento significativo somente após tratamento com quercetina 100 μ M. Através da citometria verificamos redução de pSTAT3 e NF κ B em culturas de C6 e a análise ultraestrutural revelou figura de mielina, vacúolo fagocítico durante interação microglia/glioma. Verificamos ainda que houve aumento na intensidade da marcação de células apoptóticas quando tratadas com quercetina 100 μ M em gliomas, já com rutina ocorreu sutil marcação de anexina também em gliomas. Para quantificação dos vacúolos autofágicos em gliomas, utilizamos o corante fluorescente laranja de acridina. Em rutina 100 μ M observamos aumento na intensidade de fluorescência, já o tratamento com quercetina verificamos aumento discreto na formação dos vacúolos autofágicos. Diversos estudos demonstram que o perfil de resposta Th1 está associado com um melhor prognóstico em pacientes com câncer. Esses achados sugerem que quercetina e rutina podem induzir mudanças no perfil regulatório da resposta microglial durante a interação com glioma, no entanto o flavonoide rutina mostrou um potencial melhor como imunomodulador. O entendimento da interação microglia/glioma será útil na elaboração de novas terapias baseadas na resposta imune contra o glioblastoma.

Palavras chaves: Glioblastoma, Microglia, Flavonoides.

Flavonoid effects on microglial activation and survival of glioblastoma cells

SUMMARY:

The reduced ability of the immune response in the microenvironment of glioblastoma is due to the interaction microglia/glioma and is related to aggressiveness. Our previous studies have demonstrated that flavonoids derived from plants may act as inhibitors of growth of human glioblastoma cell lines, in particular the flavonoid rutin inhibits growth and presents morphogenic capacity in these cells, also stimulate the release of immunomodulatory agents such as TNF and NO by astrocytes and microglia in primary cultures of rat. The aim of this study was to assess the viability of human glioblastoma cell lines treated with flavonoids and characterize these cells for expression of cytoskeletal proteins and morphology also investigated whether flavonoids rutin and quercetin, at concentrations of 50 μ M and 100 μ M, can modulate the immune response through co-culturing microglia/glioma. As shown by MTT assay after 72h exposure to flavonoids occurred dose-dependent inhibition of cell viability in lines TG1, U251 and GL15. The characterization of these lines revealed joint marking of GFAP, beta III tubulin and nestin in different intensities and location. Furthermore, we found reduced ability to form spheroids in cultures of TG1 cells treated with rutin. The viability cell in C6 culture was not affected by direct exposure to the flavonoids rutin and quercetin in concentrations of 50 - 100 μ M for 48h. The trypan blue test revealed reduction in viability in both flavonoids tested directly. Already during indirect exposure of medium from cultures of microglia treated with rutin, a decrease in viability in C6 cells was observed. Furthermore, an increase in the expression of OX-42 in microglia cultured after exposure to flavonoids rutin and quercetin, indicating its activation. Microglia/glioma co-cultures marked to isolectina B4, showed that the flavonoid rutin induced increase in the proliferation of microglia cell after count of isolectin positive. Also, the ELISA test performed in microglial cultures showed that the TNF levels were increased in cultures treated with rutin 100 μ M or quercetin 50-100 μ M. The dosage of nitride showed significant increase only after treatment with 100 μ M quercetin. The flow cytometry revealed that pSTAT3

and NF κ B in cultured C6 were decreased after treatment with flavonoids and ultrastructural analysis revealed myelin figure, phagocytic vacuole and interaction microglia/glioma. We also verified that there was increase in apoptotic glioma cells when treated with quercetin 100 μ M. Autophagic vacuole were quantified in glioma cells by fluorescent dye acridine orange. In the treatment with rutin 100 μ M we observed increase of fluorescence intensity. Several studies showed that the profile of Th1 response is associated with a better prognosis in cancer patients. These findings suggest that quercetin and rutin can induce changes in the regulatory profile of microglial response during interaction with glioma, however the flavonoid rutin showed a better potential as immunomodulator. The understanding of the interaction microglia/glioma will be useful in developing of new therapies based on the immune response against glioblastoma.

Kew word: Glioblastoma, Microglia, Flavonoid

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Análise do efeito dos flavonoides rutina (Rut) ou quercetina (Qct) (50-100 μ M) sobre a viabilidade de células gliais..... | 30 |
| Figura 2 – Análise da ação dos flavonoides rutina e quercetina sobre a morfologia e ativação de microglia em co-cultura microglia/C6 através da coloração com isolectina B4/DAPI e marcação imunocitoquímica para proteína OX-42 (CD11b)..... | 31 |
| Figura 3 - Microscopia por contraste de fases em diferentes culturas tratadas com flavonoide rutina e quercetina por 48h..... | 32 |
| Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão realizada após tratamento de co-culturas microglia/C6..... | 33 |
| Figura 5 - Análise de vias de morte em linhagens de células C6 em condições controle (0,5% DMSO) e após 72 h de tratamento com rutina ou quercetina (100 μ M)..... | 34 |
| Figura 6 - Liberação de fatores tróficos pelas células microglicais em condições controle (0,5% DMSO) e após tratamento com rutina ou quercetina (50 e 100 μ M)..... | 35 |
| Figura 7 - Análise por citometria em fluxo da expressão de pSTAT3, STAT3 e NF κ B em linhagens de células C6 em condições controle (0,5% DMSO) e após 4 h de tratamento com rutina ou quercetina (100 μ M)..... | 36 |
| Figura 8 - A estrutura química de flavonoides estudados conforme base de dados <i>PubChem Substance and Compound</i> | 56 |
| Figura 9 - Efeitos de diferentes flavonoides em concentrações crescentes (1-100 μ M) sobre a viabilidade de células de glioblastoma humano da linhagem GL-15, após 72h de tratamento..... | 57 |
| Figura 10 - Efeitos de diferentes flavonoides em concentrações crescentes (1-100 μ M) sobre a viabilidade de células de glioblastoma humano da linhagem U251, após 72h de tratamento..... | 58 |
| Figura 11 - Efeitos de diferentes flavonoides em concentrações crescentes (1-100 μ M) sobre a viabilidade de células de glioblastoma humano da linhagem TG1, após 72h de tratamento..... | 59 |
| Tabela 1 - Cálculo do IC50 de flavonoides hidroxilados e metoxilados, sob as células tumorais da linhagem TG1, U251 e GL-15..... | 60 |
| Figura 12 Imonocitoquímica (ICQ) das proteínas do citoesqueleto de nestina, GFAP e beta III tubulina em células da linhagem GL-15 e U251 ainda, análise | |

da cromatina celular pela coloração com DAPI após tratamento com DMSO 0,5%.....61

Figura 13 – (A) Análise por *Time lapse microscopy* da adesão, migração e formação de esferas após 15 min e 15 h da dissociação mecânica de esferas de células TG-1 e tratamento com flavonoides rutina ou quercetina (100 μ M). (B) Imunocitoquímica (ICQ) das proteínas do citoesqueleto de GFAP, beta III tubulina e nestina em células tronco tumoral da linhagem TG1 e análise da cromatina celular pela coloração com Hoechst 33258 após tratamento com rutina e quercetina (100 μ M) por 6 dias. Controle DMSO 0,5%.....62

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Albumina Sérica Bovina

DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetil Sulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

EGTA - Ácido etileno glicol tetracético

GFAP - Proteína ácida do gliofilamento

GMB – Glioblastoma multiforme Humano

KOH - Hidróxido de potássio

MTT - 3-(3-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio

NO – Oxido nítrico

PBS - Tampão fosfato salino

QCT - Querctina

RUT – Rutina

SDS - Duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Gel de poliácridamida com duodecil sulfato de sódio

SNC – Sistema nervoso central

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema nervoso central

TBS - Tampão tris salino

TBS-T - Tampão tris salino com Tween 20

UI - Unidade internacional

μM – Micromolar

Th – T auxiliares

MHC – Complexo de histocompatibilidade maior

HLA – Antígeno leucocitário Humano

MC – Meio condicionado

C6 – Linhagem de células de glioma murino

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 | Glioblastomas desafiando a ciência: as terapias atuais são eficientes? | 3 |
| 2.2 | Busca de novos agentes terapêuticos contra gliomas malignos: flavonoides como bons candidatos | 5 |
| 2.3 | Células do sistema nervoso central e suas interações | 7 |
| 2.4 | Diálogo microglia/glioblastoma: uma interação vantajosa? | 10 |
| 2.5 | Aspectos relevantes e atualizações sobre a imunologia de tumores | 12 |
| 3 | CAPÍTULO 1: Artigo Científico I | 14 |
| 3.1 | Introdução | 16 |
| 3.2 | Materiais e métodos | 18 |
| 3.3 | Resultados | 26 |
| 3.4 | Discussão | 37 |
| 3.5 | Referencias | 41 |
| 4 | CAPÍTULO 2 Artigo Científico II | 46 |
| 4.1 | Introdução | 48 |
| 4.2 | Materiais e métodos | 49 |
| 4.3 | Resultados | 53 |
| 4.4 | Discussão | 63 |
| 4.5 | Referências | 66 |
| 5 | CONCLUSÃO GERAL | 71 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |
| 7 | ANEXOS (produção científica) | 87 |

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme humano classificado pela organização mundial de saúde como sendo de grau IV é o tipo mais comum dos tumores primários encefálicos em adultos (FURNARI, 2007), com incidência de 3 a cada 100.000 indivíduos (RADHAKRISHNAN, 1995). A sobrevivência média dos pacientes diagnosticados com esse tumor, mesmo após terapia agressiva, incluindo cirurgias, radioterapia e quimioterapia é de apenas 12 - 15 meses. Sua elevada recorrência é a maior justificativa para o avanço de novas terapias antitumorais que possam aumentar a qualidade e sobrevida dos pacientes (STUPP, 2005).

Recentemente, foi criada a hipótese que a população de células do glioblastoma são renovadas por uma subpopulação de células, as chamadas células tronco tumorais, responsáveis ainda pela iniciação desse tumor (KELLY, 2007). Essas células apresentam papel crucial na sobrevivência, progressão e resistência à quimioterapia, uma vez que promovem a angiogênese tumoral e metástases, além de resistirem a hipoxia (CHENG, 2010). As células tumorais conseguem criar estratégias para escapar da resposta imune do hospedeiro, promovendo uma resposta Th2 no microambiente tumoral (BRIAN, 2008), o que contribui para malignidade do tumor (BADIE, 2001).

O papel da microglia, os macrófagos residentes do SNC, (KOSTIANOVSKY, 2008) na biologia de gliomas ainda está pouco elucidada. Apesar de seu potencial citotóxico, essas células podem infiltrar significativamente na massa tumoral e parecem favorecer o crescimento do tumor e não a sua erradicação. Uma vez que as células do glioblastoma são imunogênicas (KOSTIANOVSKY, 2008; BADIE, 2001) e secretam citocinas imunossupressoras (BADIE, 2001), a ativação controlada da microglia e de sua propriedade antitumoral dentro do tumor pode fornecer uma arma adicional de defesa nas imunoterapias contra os tumores cerebrais. Recentemente, o estudo desenvolvido por Mora e colaboradores (2008), revelou que células da microglia ativadas com lipopolissacarídeo foram capazes de secretar fatores protéicos que diminuíram a proliferação e migração de células de duas linhagens de glioma resistentes ao TNF-alfa, induzindo morte de maneira específica e preservando astrócitos e neurônios em co-culturas.

Os flavonoides, um grupo de moléculas presentes em diferentes gêneros de plantas, tem despertado o interesse na comunidade científica devido a diversidade de atividades biológicas apresentadas, incluindo atividade neuroprotetora (DAJAS *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2005; MERCER *et al.*, 2005) e antitumoral (YANG *et al.*, 2001; LAMBERT *et al.*, 2007; CABRERA *et al.*, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre a ação dessas moléculas no tecido cerebral e seu potencial farmacológico na terapia de glioblastomas. Nossos estudos preliminares *in vitro*, sobre efeitos de flavonoides extraídos de plantas nativas do estado da Bahia, revelaram que a rutina, extraída da *Dimorphanda mollis*, a agathisflavona, extraída de *Caesalphyia pyramidalis*, bem como quatro flavonoides extraídos de *Croton betulaster*, inibiram o crescimento e modificaram o fenótipo de células de glioblastoma multiforme humano da linhagem GL-15. Esses flavonoides também induziram a ativação de células gliais normais (astrócitos e microglia) e a liberação de fatores tróficos como TNF-alfa e óxido nítrico (SILVA, 2007). Santos (2011) demonstrou que o flavonoide rutina apresenta a capacidade de inibir o crescimento e induzir a diferenciação em culturas de células de glioblastoma, sugerindo que esse composto possa ser considerado como um possível candidato para o tratamento de gliomas malignos.

Finalmente, o presente estudo trará novas perspectivas para o tratamento do glioblastoma, pois investigará os efeitos *in vitro* de flavonoides naturais purificados de plantas do Estado da Bahia, e moléculas de síntese, em células de glioblastoma, com o objetivo de esclarecer seus mecanismos de ação. Ainda, fornecerá resultados sobre a ativação das células gliais (microglia) induzida por flavonoides na regulação de fatores imunomodulatórios, visando elucidar a contribuição da microglia para a potencialização dos efeitos antitumorais dos flavonoides contra gliomas malignos. Por fim, determinará o potencial antitumoral de flavonoides contra as células tronco tumorais em sistemas isolados de cultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Glioblastomas desafiando a ciência: as terapias atuais são eficientes?

Os cânceres do SNC são as mais devastadoras das neoplasias malignas já descritas, cerca de vinte mil novos casos de neoplasias primárias do SNC são diagnosticadas por ano nos Estados Unidos. Os tumores do sistema nervoso central são a segunda maior causa de neoplasias malignas durante a infância e, essa incidência em adultos aumenta com a idade (LOUIS *et al.*, 2002). O INCA (Instituto Nacional do Câncer) estima que no Brasil ocorram 9270 novos casos, desses, 400 estão estimados para o estado da Bahia, em 2012, para ambos os gêneros. Dados que reforçam a importância de políticas públicas nacionais para o controle e prevenção dessa doença.

Os tumores cerebrais representam um verdadeiro desafio a ciência, devido a sua complexidade. A terapia mais utilizada para os tumores cerebrais atualmente é a remoção cirúrgica. Contudo esta terapia apresenta grande restrição, já que não é possível a retirada completa do tumor infiltrante. Neste caso, existe grande possibilidade de recidiva, o que confere alta malignidade a esses tumores que infelizmente, são insensíveis aos tratamentos clássicos utilizados como rotina em outras neoplasias, tais como a rádio e quimioterapia (LOUIS *et al.*, 2000).

Dentre os tumores cerebrais, o glioblastoma multiforme humano é classificado pela organização mundial de saúde como sendo de grau IV. É o tipo mais comum dos tumores primários cerebrais em adultos (FURNARI, 2007). A sobrevivência média dos pacientes diagnosticados com esse tumor, mesmo após terapias agressivas, incluindo cirurgias, radioterapia e quimioterapia é de apenas 12 - 15 meses, em função da sua elevada recorrência (STUPP, 2005). Esse tipo de câncer se manifesta sem a presença de uma lesão precursora (glioblastoma primário). Já os glioblastomas secundários desenvolvem-se lentamente de astrocitoma difuso grau II ou astrocitoma anaplástico (grau III) (OHGAKI & KLEIHUES, 2007).

A designação grau IV é caracterizada citologicamente pela malignidade, atividade mitótica e necrose, freqüentemente associados com rápida evolução e desfecho fatal. Embora não seja uma regra geral, a rápida disseminação e infiltração no tecido adjacente e a propensão de atingir a região cranioespinhal são comuns às

neoplasias de grau IV, infelizmente as mais comuns e agressivas (DEORAH, 2006). O prognóstico de pacientes com tumor grau IV depende em grande parte da disponibilidade de tratamentos efetivos. A maioria de pacientes com glioblastoma, particularmente os idosos, vão a óbito após um ano (LOUIS *et al*, 2007). Em um grande estudo retrospectivo, Scott e colaboradores (1998) estimaram que 2,2% da *coorte* sobreviveu por mais de dois anos. Globalmente, a taxa de sobrevida em cinco anos é inferior a 10%, com uma taxa de mortalidade final de cerca de 100% (GROVES, 2002).

Uma hipótese, que vem ganhando muita força na comunidade científica, evidencia a população de células tronco tumorais como agente principal da agressividade e recidiva desses tumores (SELL, 2004). Essas células possuem alta capacidade de proliferação e são resistentes às terapias convencionais (BAO, 2006). Além disso, elas promovem a angiogênese, mantêm o crescimento tumoral e são resistentes a hipóxia (CHENG, 2010).

Frequentemente requer ressecção cirúrgica agressiva, radioterapia e altas doses de agente alquilantes na quimioterapia, como temozolomida (TMZ), nitrosureia e bis-cloronitrosureia (também conhecido como carmustina) (GERMANO *et al.*, 2010). Atualmente, o tratamento em humanos é multimodal, havendo resistência terapêutica e dificuldade da droga em acessar o SNC. A imunoterapia celular ou vacina contra o tumor tem pouco efeito nos pacientes com glioblastoma. Um dos mecanismos dessa falha é a produção do fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor beta*, TGF- β) pelo glioblastoma, o que causa profunda imunossupressão (LOUIS *et al.*, 2007).

Várias alterações genéticas e anomalias cromossômicas são comumente encontradas em gliomas e, em alguns casos, estas mutações correlacionam-se com grau clínico. Uma dessas alterações é a freqüente deleção 10q22-25, uma região cromossômica importante para a supressão tumoral, encontrada apenas no gliomas de grau IV. Todas estas anomalias levam à ruptura do ciclo celular (HOLLAND, 2011). Aliado a isso, essas células mantêm seu maquinário de reparo do DNA íntegro, aumentando a resistência aos quimioterápicos. Apesar das tentativas terapêuticas combinando cirurgia, radioterapia e quimioterapia, gliomas de alto grau recorrem em mais de 90% dos casos, tanto próximo ao sítio original como em novas

áreas (GERMANO, 2010). O somatório destas alterações contribui para a biologia e resistência destes tumores.

Essas características têm desafiado a neuro-oncologia e estimulado pesquisa de novos alvos terapêuticos que possam contribuir para a redução da agressividade dos glioblastomas e interrupção do processo de proliferação tumoral (GERMANO *et al.*, 2010). O uso de linhagens celulares secundárias como a linhagem GL-15, U251 de glioblastoma multiforme humano e C6 de glioma de rato permitem o estudo *in vitro* da viabilidade celular e mecanismos moleculares de ação, representando uma ferramenta importante na prospecção de novos fármacos (CASTIGLI *et al.*, 2000, 2006).

2.2. Busca de novos agentes terapêuticos contra gliomas malignos: flavonoides como potenciais candidatos.

O uso de plantas como recurso terapêutico vem sendo descrito em toda história da humanidade (CORRÊA & QUINTAS, 2001). No Brasil, mais de 300 espécies de plantas medicinais são usadas pela população, pesquisas realizadas nas universidades e institutos de pesquisas revelam substâncias ativas no combate ao câncer, AIDS, com propriedades analgésicas, como vermífugos, antibióticos dentre outros (ALMEIDA, 2005).

Um grupo de moléculas que tem despertado o interesse na comunidade científica são os flavonoides, pois estudos atestam comprovada ação antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica, antitumoral, vasodilatadora, neuroprotetora, entre outras (YUNES, 2001; JANBAZ *et al.*, 2002; MERCER *et al.*, 2005, CAMPOS 2007). Os flavonoides são pigmentos hidrossolúveis presentes nos vacúolos das células vegetais e que representam o maior grupo de compostos fenólicos naturais. O termo flavonoide engloba um grupo de compostos polifenólicos complexos derivados de benzo-gama-pirona, os quais são estruturalmente constituídos de 15 átomos de carbono (C₁₅) no seu esqueleto fundamental (YOKOZAWA *et al.*, 1997) e apresentam uma estrutura comum, caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado. Por serem amplamente distribuídos no reino vegetal (geralmente na forma solúvel de heterosídeos, presentes em todas as

angiospermas), os flavonoides fazem parte, obrigatoriamente, da dieta humana (YUNES, 2001).

Na família dos flavonoides, já foram descritos mais de 4.000 compostos fenólicos, os quais se subdividem em flavanóis, flavanonas, flavonas e antocianidinas (HARBONE, 1988 apud YUNES, 2001). Dentro de cada grupo, podem ocorrer diferenças individuais resultantes de variações no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificações nos núcleos (especialmente, o pirônico), e pelo grau de metilação e glicosilação. Essas características afetam várias propriedades dos flavonoides, particularmente a hidrofobicidade das moléculas e atividade antioxidante (YUNES, 2001).

É sabido que a barreira hematoencefálica desempenha um papel regulatório limitando a passagem de pequenas moléculas polares e de macromoléculas da circulação cerebrovascular para o encéfalo (YOU DIM et al, 2004). Alguns estudos tem apontado a capacidade dos flavonoides em atravessar a barreira hematoencefálica. Suganuma e colaboradores (1998) registraram a presença da epigallocatequina galato no encéfalo de camundongos, após administração oral. Peng e colaboradores (1998) identificaram tanto o flavonoide naringenina como seu metabolito glucoronídeo no córtex cerebral de ratos após injeção intravenosa de naringenina (20mg/kg). Outro estudo utilizando a via intravenosa detectou hesperetina no encéfalo de rato (TSAI & CHEN, 2000). Foi demonstrada a presença do epicatequina glucoronídeo e 3'-O-metil epicatequina glucoronídeo no encéfalo de ratos, após ingestão oral (ABD EI MONSEN *et al.*, 2002; YOU DIM *et al.*, 2004). Outro estudo apontou a permeabilidade da hesperetina, da naringenina e seus respectivos conjugados glucuronídios, bem como das antocianidinas cianidina-3-rutinosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, utilizando um modelo de barreira hematoencefálica *in vitro* (YOU DIM *et al.*, 2003 e 2004).

As maiorias dos efeitos fisiológicos dos flavonoides já evidenciados no SNC são geralmente atribuídas a sua propriedade antioxidante e remoção de radicais livres. No entanto, evidências emergentes têm contribuído para sustentar a hipótese de que os mecanismos de ação dessas moléculas ultrapassam a propriedade antioxidante. Como exemplo, o flavonoide epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

demonstrou a propriedade em inibir a fibrilogênese de agregados de ambas proteínas alfa-sinucleína e beta-amiloide, uma característica das doenças de Parkinson e Alzheimer, respectivamente (EHRNHOFER *et al.*, 2008). Recentemente, nosso grupo demonstrou que o flavonoide rutina atua diretamente em células gliais induzindo sua ativação, indução da sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) e liberação da citocina TNF α (SILVA *et al.*, 2008).

O potencial antitumoral de flavonoides para o tratamento de tumores cerebrais tem sido igualmente alvo de investigação. Recentemente, Son e colaboradores (2007) evidenciaram a indução de apoptose pelo flavonoide silibinina, extraído de *Silybum marianum*, em células de glioblastoma.

Os resultados obtidos até o momento, em nosso grupo, sobre a ação antitumoral de flavonoides, destaca a importância da investigação dos efeitos dessas moléculas isoladas ou em combinação com outros fármacos e com agentes quimioterápicos tradicionais, em busca de alternativas terapêuticas mais eficientes para os gliomas malignos. Nossos estudos, sobre os efeitos de flavonoides no crescimento de células de glioblastoma apontam igualmente um potencial antitumoral destas moléculas contra gliomas malignos. Os trabalhos, desenvolvidos por Silva, Freitas e Souza (2007) apontam a ação antitumoral do flavonoide rutina, extraído de *Dimorphandra mollis* e de quatro flavonoides extraídos de *Croton betulaster* em glioblastoma multiforme humano da linhagem GL-15. O biflavonoide aghatisflavona, extraído de *Caesalpinia pyramidalis*, revelou-se igualmente ativo, inibindo a proliferação das células GL-15 e induzindo as células remanescentes à diferenciação, através da regulação de MAPKs. Outro estudo do nosso grupo, utilizando culturas primárias de astrócitos e microglia demonstrou a toxicidade e potencial de ativação do flavonoide rutina em células gliais caracterizados pela indução do neuromediador NO e da citocina pró-inflamatória TNF α (SILVA, 2005; SILVA *et al.*, 2008).

2.3. Células do sistema nervoso central e suas interações

O SNC apresenta origem ectodérmica e duas classes principais de células: os neurônios e as células da glia ou neuroglia. Esta última sendo constituída de três

tipos de células: os astrócitos, a microglia e os oligodendrócitos (HATTEN, 1985; SWANSON *et al.*, 1997). A interação neurônio-glia é importante para a homeostase do sistema nervoso central. Essa complexa relação pode ser observada em ambos os grupos de animais, invertebrados e vertebrados, indicando uma importante característica evolutiva na conservação dessas interações e seus papéis (MURAI, 2007).

Os neurônios são distintos da glia pelos seus processos polarizados especializados, os axônios e os dendritos, os quais podem propagar potenciais de ação, fazer junções sinápticas com outros neurônios e liberar neurotransmissores (MOREST & SILVER, 2003). Os neurônios são capazes de excretar quimiocinas com função na proliferação, migração astrocitária e microglial, atividade neuroprotetora e eletrofisiológica (HAAS, 2006).

Dentre as células da glia, os oligodendrócitos são importantes para a mielinização dos neurônios presentes no sistema nervoso central (GRAÇA, 2001) e mais recentemente tem sido demonstrado seu importante papel na liberação de fatores que promovem sobrevivência neuronal (GOMES, 2001). A microglia e os astrócitos por outro lado, são importantes células para a resposta imune inata uma vez que são capazes de produzir uma variedade de mediadores pró-inflamatórios contra diversos estímulos microbianos (GURLEY, 2008). Além dessa função, os astrócitos são importantes por fornecerem suporte nutricional e estrutural para neurônios e por participarem de outras funções, tais como detoxificação (TARDY, 1991), remoção de neurotransmissores extracelulares (HEBER, 2006), e ainda, direcionar o crescimento dos neuritos, servindo como guia (COSTA *et al.*, 2002).

A interação neurônio-glia controla vários processos do desenvolvimento nervoso, tais como, neurogênese (LIM & ALVAREZ-BUYLLA, 1999), mielinização (BARRES, 1997), formação de sinapse (PFRIEGER & BARRES 1997), migração neuronal (ANTON *et al.*, & RAKIC 1997), proliferação (GOMES *et al.*, & NETO 1999), diferenciação (GARCIA-ABREU & CAVALCANTE 1995) e sinalização neuronal (ALVAREZ-MAUBECIN & VAN BOCKSTAELE 2000). Essa interação é mantida através de fatores solúveis, produzidos pelas células gliais e neurônios. Deste modo, a glia fornece elementos essenciais para a propriedade sináptica (VOLTERRA & MELDOLESI 2005), proliferação, crescimento e diferenciação neuronal, em

contrapartida os neurônios contribuem para proliferação e sobrevivência das células gliais (GOMES *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que neurônios cultivados junto com astrócitos deficientes de Ca^{+2} , não apresentaram crescimento dos axônios e neuritos, o que sugere uma relação neurônio/glia através de moléculas sinalizadoras (KAZUNORI KANEMARU, 2007).

Durante a sinapse, a glia pode responder às atividades neurais capturando, processando, reciclando os neurotransmissores, e liberando neuromoduladores (MURAI, 2007). Como exemplo, podemos citar o papel essencial de astrócitos maduros na rápida remoção do glutamato extracelular na fenda sináptica (SHIBATA, 1997), o que é essencial para a homeostasia do sistema nervoso central, pois previne a morte neuronal por excesso do neurotransmissor, a chamada excitotoxicidade (ROTHMAN, 1986; TARDY 1991).

Uma importante função dos astrócitos nas interações neurônio-glia, consiste em promover a ligação entre os neurônios e a microcirculação cerebral (HARDER, 2002). Haja vista sua posição acessória na barreira hematoencefálica exercendo um importante papel na transferência de xenobióticos para as células neurais. Deste modo, esses agentes são inicialmente absorvidos pelos astrócitos, e posteriormente transferidos para os neurônios (OGURA, 2002), indicando uma função dos astrócitos na regulação da permeabilidade aos xenobióticos. Estas células desempenham um papel fundamental na detoxificação cerebral através de complexos enzimáticos altamente ativos do sistema citocromo P450. A presença de isoformas de citocromos P450 no SNC tem sido descrita em diferentes espécies, inclusive em ratos (GHERSI-EGEA *et al.*, 1988; NICHOLSON & RENTON, 1999) e em células de glioblastoma de origem astrocitária (GENG & STROBEL, 1998). Ainda que a atividade dos citocromos P450 presentes no encéfalo correspondam a 1-10% daquela verificada no fígado (STROBEL *et al.*, 1995). Tem sido demonstrado que a atividade desses sistemas enzimáticos pode ser modulada, e está associada a vários fenômenos no SNC, tais como a neurotransmissão, modulação neuroendócrina, e especialmente neurotoxicidade, participando amplamente na transformação de xenobióticos (WARNER & GUSTAFSSON, 1995; STROBEL *et al.*, 1995; GENG & STROBEL, 1998, MINN *et al.*, 2000).

A interação neurônio-microglia é de suma importância para a homeostasia do SNC. Neurônios de rato quando estimulados com mitógenos, favorecem a proliferação da microglia, mediada pela secreção de TGF- β 2 (DOBBERTIN, 1997). Esse efeito pode sugerir que os neurônios estimulam a proliferação da microglia durante do desenvolvimento. Outro mediador importante na interação neurônio-microglia é o fator ativador de plaquetas (PAF), um mediador fosfolipídico que desempenha vários papéis na função neuronal e desenvolvimento do encéfalo. Aihara (2000) demonstrou que neurônios em cultura sintetizam PAF após a estimulação com ácido glutâmico. A microglia que expressa receptores PAF funcionais apresenta uma intensa resposta quimiotática, com isso PAF é considerado um mensageiro importante na interação neurônio-microglia.

Por outro lado, através da liberação pela microglia de fatores solúveis pró-regenerativos como IL-6 e o TGF β ou pro-inflamatórios como TNF α (STREIT *et al.*, 1988 *apud* STREIT *et al.*, 1999), estas células tanto podem facilitar a sobrevivência dos neurônios como induzir a ativação dos astrócitos, e induzir a lesão neuronal (GIULIAN *et al.*, 1994). Tais citocinas agem como mediadores em danos celulares, induzindo proliferação de astrócitos e de células microgliais (HAO *et al.*, 2002). O óxido nítrico (NO) é importante fator produzido pela microglia e astrócitos ativados. Considerado como potente mensageiro biológico, o NO é um radical livre de vida curta que medeia uma variedade de funções, incluindo homeostasia vascular, neurotransmissão, ação microbicida, atividade antitumoral e citotoxicidade (DAWSON & SNYDER 1994; MANNING *et al.*, 2001).

2.4. Dialogo microglia / glioblastoma: uma interação vantajosa?

Vinte anos se passaram desde que foi proposto o conceito de rede imunológica no SNC (GRAEBER, 1990). Na época, um dos principais livros didáticos de neuropatologia questionou a existência da microglia e sugeriu o abandono do termo (DOLMAN, 1991). Obviamente, isso não aconteceu e mais de 10.000 artigos sobre “microglia” tem sido publicado desde então, conforme os bancos de busca *Pub Med da United State National Library of Medicine e National Institutes of Health* dos Estados Unidos da América PNS. O termo “microglia” está bem estabelecido e é reconhecido por sua capacidade de estimular o sistema imunológico inato no encéfalo e medula espinhal (STREIT, 1995).

Microglia são pequenas células classificadas no grupo das células gliais localizadas no SNC. No entanto, ao contrário das outras células gliais, apresenta origem mesodérmica. A hipótese mais aceita afirma que a fonte mais provável para todos ou a maioria dos macrófagos encefálicos são os monócitos. Essas células parecem migrar para o encéfalo de vários locais durante a embriogênese e podem continuar a entrar, pelo menos, através dos vasos sanguíneos, no adulto (KAUR, 2001). Elas apresentam as mesmas funções dos macrófagos periféricos, no entanto, quando migram para o sistema nervoso central mostram diferenças morfológicas (ZHANG, 2007) principalmente, em relação aos receptores de membrana e sinais bioquímicos (para revisão consultar, GUILLEMIN, 2004).

Trabalhos voltados para imunologia de tumores relatam a importância da microglia no controle de tumores cerebrais (KOSTIANOVSKY, 2008), no entanto essas células tornam-se hiporresponsivas no microambiente tumoral (HUSSAIN, 2006). Um esforço importante na área da imunologia do câncer tem sido o de compreender como as células cancerosas conseguem desativar o sistema imunológico existente no local da origem do tumor (BLATTMAN, 2004). Estes efeitos são tipicamente locais, pois com exceção daqueles no estágio final da doença, pacientes com câncer não são imunodeficientes (YU, 2007). No entanto, o mecanismo pelo qual esse estado é induzido ainda não foi bem esclarecido.

Kostianovsky (2008) demonstrou que as células do glioblastoma inibem a capacidade da micróglia para produzir as citocinas pró-inflamatórias (TNF) e estimulam a secreção de interleucina 10 (IL-10), fenômeno correlacionado com aumento da expressão de STAT3 (proteína relacionada com produção de citocinas regulatórias). Além disso, observou-se que HLA de classe II e a expressão de moléculas de co-estimulação CD80 em monócitos são suprimidos na presença das células do glioblastoma. Curiosamente, a maioria destes eventos são compartilhados, embora em menor grau, com astrócitos não transformados, sugerindo que estas últimas células criam um ambiente regulador impedindo a ativação de monócitos/microglia.

Estudos atuais apontam as células tronco tumorais como elemento chave na imunossupressão observada no microambiente tumoral (BRIAN, 2008). A descoberta de moléculas de membrana específicas de células tronco, como CD200

e CD133, podem fornecer pistas para a esse escape imunológico. Evidências apontam que esses marcadores diminuem o perfil de resposta Th1 e amplificam a Th2 localmente, favorecendo a proliferação tumoral, uma vez que, a resposta Th2 estimula moléculas regulatórias e imunossupressoras (BRIAN, 2008). Finalmente, Zeppernick (2008), observou uma correlação inversa entre a expressão de CD133 e a sobrevida do paciente. Com isso, um tumor rico em células tronco tumorais promove rápida migração do tumor, podendo piorar o prognóstico do paciente. Desta forma, moléculas que destruam ou diferencie essas células em perfis saudáveis são promissoras e desejáveis nas terapias anti-tumorais.

2.5. Aspectos relevantes e atualizações sobre a imunologia de tumores

O conceito da vigilância imune foi postulado por Macfarlane Burnet na década de 1950. Esse conceito diz que uma das funções fisiológicas do sistema imunológico é reconhecer e destruir os clones de células transformadas, antes que elas se desenvolvam em tumores, e eliminar os tumores depois de formados (ABBAS, 2008). No entanto, hoje observamos que o sistema imunológico pode facilitar o crescimento do tumor (CHOW, 2011).

Diversos estudos demonstram que o perfil de resposta Th1 está associado com um melhor prognóstico em pacientes com câncer (GALON, 2008). Dieu-Nosjean e colaboradores observaram a importância da resposta Th1 para a destruição tumoral. Pacientes com resposta a citocinas inflamatórias em células B, T-CD4 e T-CD8, polarizadas para o perfil Th1 em câncer de pulmão, apresentaram melhora. Por outro lado, pacientes que apresentaram alta resposta regulatória no ambiente tumoral, como por exemplo, expressão genética de marcadores Th17 obtiveram piores prognósticos (BINDE, 2011).

Conforme já mencionado, os monócitos migram para o SNC durante o desenvolvimento embrionário e neste local se diferenciam em microglia. Estudos desenvolvidos por Hussain e colaboradores (2006) demonstraram que a microglia isolada de pacientes com glioblastoma multiforme apresentaram redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como, diminuição da capacidade citotóxica. Essa característica é devida a células transformadas, que através do

contato físico com as células imunológicas, estimulam sua senescência (WAGNER, 1999).

Estudos *in vitro* demonstraram uma regulação negativa de expressão de CD80, MHC classe II e moléculas co-estimulatórias em microglia presente em glioma (SCHARTNER, 2005 & HUSSAIN, 2006). Um possível mecanismo de ação dessa resposta é a expressão de proteínas de sinalização imunossupressoras. O papel da STAT3 parece ser crucial nesse processo. Estudos afirmam que o aumento na liberação de IL-10 em microglia cultivada junto com glioblastoma está diretamente relacionado com aumento da expressão de STAT3 (YU, 2007). Com isso, estratégias terapêuticas que visem o bloqueio da atividade de STAT3 podem ser promissoras para o tratamento do glioblastoma (HUSSAIN, 2007).

Segundo Curran (2012), outra célula efetora que vem despertando interesse entre os imunologistas de tumores são os eosinófilos. Em resposta a vários estímulos, os eosinófilos são capazes de produzir grânulos citotóxicos, moléculas neuromediadoras, e citocinas pró-inflamatórias, bem como fatores pró-fibróticos e angiogênicos envolvidos na eliminação do patógeno. Estas diversas propriedades biológicas revelam o eosinófilo como uma célula capaz de influenciar a resposta imune inata e adaptativa. Foi observado também que a migração de eosinófilos para o cérebro ocorre em resposta à lesão cerebral e ainda, após alguns procedimentos terapêuticos para o glioblastoma. Embora os eosinófilos tenham sido identificados em várias doenças do sistema nervoso central, o potencial dos eosinófilos na eliminação do GBM está apenas começando e mais estudos são necessários (CURRAN, 2012).

Uma melhor compreensão da relação imune com os tumores torna-se necessário. Uma vez que, as drogas utilizadas atualmente em terapias oncológicas além de destruir as células cancerosas também afetam as células saudáveis. Torna-se indispensável o estudo de drogas imunoregulatórias, pois sua ação será direcionada somente para as células transformadas, utilizando o sistema imunológico como principal vetor terapêutico, sem prejuízos às células normais. No entanto, como vimos, existem muitas incertezas nesse tema, tornando-o de suma importância entre os imunologistas e oncologistas.

3 - ARTIGO CIENTÍFICO I – Investigação do efeito dos flavonoides rutina e quercetina na indução da ativação microglial e regulação na interação microglia/glioma.

Resumo

INTRODUÇÃO E OBJETIVO: Estudos mostram que a interação entre microglia e glioblastoma desencadeia resposta imune reguladora, responsável pela agressividade e invasão de glioblastoma. Nossos estudos têm sugerido que a rutina, um flavonoide extraído das sementes da planta *Dimorphandra mollis*, atuam como inibidor do crescimento das linhagens celulares de glioblastoma humano e promove a liberação de agentes imunoregulatórios. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da rutina e quercetina, no crescimento e viabilidade das células de glioblastoma isolados de rato (C6) durante interação microglia/glioma. **MÉTODOS E RESULTADOS:** Observamos que os flavonoides quercetina e rutina não reduziram o metabolismo mitocondrial de células de glioma. No entanto, uma redução na percentual de células viáveis de 4% e 10%, foi observada após o tratamento com 50 μ M e 100 μ M rutina, respectivamente, quando comparado com o controlo (0,5% DMSO), como revelado pelo tripan de azul. Além disso, as células OX-42 positivas em culturas de microglia foram elevados após a exposição flavonoides, indicando a ativação e proliferação da microglia. Coloração da isolectina B4 em co-cultura de microglia e glioblastoma mostraram que a rutina induz aumentou na proliferação de células da microglia. O meio condicionado derivado de culturas microgliais tratadas com flavonoides alterou a morfologia e celularidade das células C6. O meio de cultura de microglia apresentaram níveis aumentados de TNF em culturas tratadas com 100 μ M de rutina ou de 50 e 100 μ M de quercetina. Verificou-se uma redução de pSTAT3 e NFkB através da citometria de fluxo e a análise ultraestrutural revelou figura de mielina em células tumorais e vacúolo fagocitário durante interação microglia/glioma. Aumento na intensidade de fluorescência após marcação da anexina foi observada após tratamento com quercetina (100 μ M). Flavonoide rutina (100 μ M), induziu aumentou na formação de vacúolos autofágicos utilizando o corante fluorescente laranja de acridina, enquanto que o tratamento com quercetina induziu um ligeiro aumento na formação de vacúolos autofágicos. **CONCLUSÕES:** Estes resultados sugerem que os flavonoides quercetina e rutina podem induzir alterações no perfil regulamentario de resposta microglial durante a interação com glioma. O entendimento da interação microglia-glioma será útil na elaboração de novas imunoterapias contra glioblastoma.

Palavras chaves: Flavonoides, Glioma e Microglia

3 – MANUSCRIPT I - Investigation of effect of flavonoids rutin and quercetin in microglial activation and regulation in interaction microglia/glioma.

Abstract

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: Studies showed that the interaction between microglia and glioma are involved in the regulatory immune response, responsible for aggression and invasion of glioblastoma. Our previous studies have been suggesting that rutin, a flavonoid extracted from seeds of the Brazilian plant *Dimorphandra mollis*, act as inhibitor of growth of human glioblastoma cell lines and promotes the liberation de immuneregulatory agentes. The aim of this study is evaluate the effect of flavonoids rutin and quercetin on growth and viability of glioblastoma cells rat isolated (C6), and during interaction microglia/glioma. **METHODS AND RESULTS:** We found that the flavonoids quercetin and rutin do not reduced mitochondrial metabolism of glioma cells. However, a reduction in the percentage of viable cells of 10% and 4%, was observed after treatment with 50 μ M and 100 μ M of rutin, respectively, compared to control (0.5% DMSO) as shown by the trypan blue. In addition, the microglia OX-42 positive were elevated after exposure with rutin flavonoids, indicating the activation and proliferation of microglia. Conditioned medium derived from microglial cultures treated with flavonoids changed the cellularity and morphology of the C6 glioma culture, also reduction on the proportion of viable cells after treatment with rutin. Medium microglia cultures showed increased levels of TNF in cultures treated with 100 μ M of rutin or 50 - 100 μ M of quercetin. We verified a reduction of pSTAT3 and NFkB by flow cytometry and ultrastructural analysis revealed myelin figure in tumor cell and phagocyte vacuole during interaction microglia/glioma. Increase in the intensity of annexin stained apoptotic cells were found in the treatment with quercetin (100 μ M). The flavonoid rutin (100 μ M) increased the fluorescence intensity of autophagic vacuole with the fluorescent dye acridine orange, whereas treatment with quercetin induced a slight increase in the formation of autophagic vacuoles. **CONCLUSIONS:** These findings suggest that flavonoids rutin and quercetin can induce changes on regulatory profile of glial response during glioma interaction. The understanding of microglia-glioma interaction will be helpful in designing novel immune-based therapies against glioblastoma.

Key words: Flavonoids, Glioma, Microglia

3.1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) humano é o mais comum e letal dos tumores primários malignos do cérebro em adultos. Classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como astrocitoma grau IV (Furnari, 2007), com uma incidência de 3 a cada 100.000 indivíduos (Radhakrishnan, 1995). Suas características histopatológicas incluem atipia nuclear, pleomorfismo celular, atividade mitótica, trombose vascular, proliferação microvascular e necrose (Ohgaki e Kleihues, 2007), e estão relacionadas com a evolução do tumor.

A sobrevivência média dos pacientes diagnosticados com este tumor, mesmo após tratamento agressivo, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, é de apenas 12-15 meses, devido a sua elevada recorrência (Stupp, 2005). Por isso, o interesse na investigação de novos medicamentos alternativos para o tratamento deste tumor. A conduta terapêutica atualmente adotada para o tratamento do glioblastoma é multimodal, geralmente consistindo na combinação de cirurgia com radioterapia e quimioterapia, esta última constituída essencialmente de drogas citotóxicas, como as nitroso-uréias que são pouco ativas, com um aumento da sobrevida dos pacientes somente de alguns meses (Hildebrand *et al.*, 1997). A eficácia terapêutica é limitada como reflexo da propriedade infiltrante dos glioblastomas, o que torna uma ressecção total impossível sem que haja dano neurológico ao paciente (Hildebrand *et al.*, 1997; Vandier *et al.*, 1998). Novos agentes terapêuticos têm sido sugeridos, dentre eles os retinóides e citocinas (Defer *et al.*, 1997; Vandier *et al.*, 1998; Chamou-Guerin *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2001), mas a eficácia clínica destes agentes ainda está em discussão.

Recentemente, estudos demonstraram que a população celular do glioblastoma é renovada por uma subpopulação de células, conhecidas como células-tronco do tumor (Kelly, 2007). Estas células têm um papel fundamental na progressão, sobrevivência e resistência à quimioterapia, uma vez que promovem a angiogênese, metástase, além de suportarem (ou de também resistirem) a hipóxia (Cheng, 2010). Adicionalmente, essas células podem criar estratégias de fuga da resposta imune do hospedeiro através do estímulo de uma resposta Th2 no microambiente tumoral (Brian, 2008), caracterizada por liberação de citocinas regulatórias característica que igualmente contribui para a malignidade do tumor

(Badie, 2001) e oferece um novo paradigma para desenvolvimento de estratégias terapêuticas originais. Assim, novas estratégias para o tratamento do glioblastoma devem apontar para a erradicação de ambas as populações de células, as tronco e não tronco (Cheng, 2010), ou promover a diferenciação das células tronco para um fenótipo normal. Outra abordagem terapêutica pode ser a modulação de células do sistema imunológico do cérebro para estimular a liberação de fatores tróficos, de maneira controlada, dirigida para as células tumorais, sem danificar o tecido saudável.

Na biologia dos gliomas, o papel da microglia, os macrófagos residentes do SNC (Kostianovsky, 2008) ainda são incertos. Apesar do seu potencial citotóxico, essas células podem infiltrar-se na massa tumoral e parecem promover o crescimento do tumor e não a sua erradicação, uma vez que as células do glioblastoma são imunogênicas e secretam citocinas imunossupressoras (Badie, 2001; Kostianovsky, 2008). A ativação controlada de microglia e sua propriedade antitumoral dentro do tumor podem fornecer uma importante arma de defesa adicional em imunoterapias contra tumores cerebrais. Recentemente, estudo realizado por Mora *et al.* (2009) demonstrou que as células microglicais ativadas por lipopolissacarídeo foram capazes de secretar fatores proteicos que reduziram a proliferação e migração de duas linhagens de células de glioblastoma resistentes ao fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e ao ligante indutor de apoptose reacionado ao TNF-alfa (TRAIL), e ainda, induziram morte específica, preservando neurônios e astrócitos em co-culturas.

Um grupo de moléculas que têm despertado interesse da comunidade científica são os flavonoides, presentes nos diferentes gêneros de plantas, pois têm apresentado inúmeras atividades biológicas, incluindo neuroproteção (Dajas *et al.*, 2003, Kang *et al.* 2005, Mercer *et al.*, 2005) e atividade antitumoral (Yang *et al.*, 2001, Lambert *et al.*, 2007, Cabrera *et al.*, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre a sensibilidade do tecido cerebral a estas moléculas, bem como, seu potencial farmacológico para o tratamento do glioblastoma.

Estudos recentes do nosso grupo *in vitro*, revelaram que a rutina, um flavonóide extraído *Dimorphanda mollis*, inibe o crescimento e modifica o fenótipo de células tumorais da linhagem GL-15 (Santos *et al.*, 2011). Além disso, em outro

estudo, foi constatado que rutina pode induzir a ativação de células gliais normais (astrócitos e microglia), levando a liberação de fatores tróficos como o TNF-alfa e óxido nítrico (NO) (Silva *et al*, 2008). Ainda, o papel cooperativo de astrócitos e microglia no efeito antitumoral de flavonoides para glioblastoma já foi demonstrado, mas ainda está pouco elucidado (dado não publicado), o que estimulou nosso interesse em aprofundar essa investigação.

Neste contexto, neste estudo objetivamos investigar se os flavonoides rutina e seu derivado aglicona quercetina são capazes de modular o crescimento de células de glioblastoma provenientes de ratos (linhagem C6) e estimular uma resposta inflamatória contra essas células durante a interação glioma/microglia, com vista a elucidar seus mecanismos de ação e potencial terapêutico para tumores cerebrais malignos.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Drogas

O flavonoide rutina foi obtido sob a forma de pó no Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica (Universidade Federal da Bahia, Brasil) e o dihidrato de quercetina foi obtido da Sigma-Aldrich (98% de pureza). Os flavonoides foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100% e mantidos no escuro à temperatura de -20°C. As diluições finais de cada um dos flavonoides foram preparadas no momento do tratamento. Diluições seriadas foram adotadas e as células foram tratadas durante o período de 4 h, 48 h ou 72 h, a depender do teste escolhido. Os controles foram tratados com DMSO diluído no meio de cultura com o volume equivalente ao utilizado nos grupos tratados (0,5%) e não mostrou nenhum efeito significativo nos parâmetros analisados em comparação com as células que não receberam diluentes.

3.2.2. Cultura primária de microglia

As culturas foram preparadas a partir de hemisférios cerebrais de ratos Wistar, obtidos junto ao Biotério do Departamento de biointeração do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (Salvador, BA, Brasil) e, realizadas de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências da Saúde com protocolo nº027/2012.

3.2.3. Culturas de células tumorais (C6)

As células da linhagem C6 derivada de glioblastoma de rato (Benda, 1968) foram cultivadas em placas de poliestireno de 100 mm ϕ (TPP, Trasadingen, Switzerland) em meio Dulbecco's modificado (DMEM, Cultilab, SP, Brasil) suplementado com penicilina a 1%, estreptomicina a 1%, e 10% de soro fetal bovino (Cultilab, SP, Brasil REF) e mantidas em estufas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Depois de atingir a confluência de 70%, as células aderentes foram descoladas das placas e recolhidas utilizando solução de tripsina/EDTA (0,05% de tripsina, EDTA a 0,02% em PBS isento de Ca²⁺ + / Mg²⁺ +) durante cinco minutos, e plaqueadas em novas placas em função da análise experimental.

3.2.4. Obtenção de células microgliais

Células da microglia foram obtidas a partir de ratos Wistar com um dia de idade. Os córtex foram dissociadas mecanicamente e as células dispostas em frascos de cultura de 75 cm² em meio DMEM/F12 suplementado com 6,25 µg/mL gentamicina, 2 mM L-glutamina, 0,011 g/L piruvato, 3,6g/L de HEPES, 12 mL/L de glicose 50% e 10% soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY). Após 7 dias, metade do meio foi substituído e as células foram mantidas em cultura mista glial até o dia 14. Aos 14 dias, as células microgliais foram removidas a partir da cultura mista glial por meio de um agitador rotativo a 400g durante 3 horas, o sobrenadante foi recolhido e semeadas em placas de cultura. As células foram contadas numa câmara de Neubauer e plaqueadas a uma densidade de 3 x 10⁶ (Lima, 2001). Posteriormente, as microgliais foram cultivadas em conjunto com células tumorais C6

(2:1 Microglia: célula C6) durante 1 semana. A interação microglia/glioma foi acompanhada através de microscópio invertido ao longo de três dias para observar a sua inativação.

3.2.5. Tratamento de células C6 com meio condicionado (MC) proveniente de microglias tratadas com flavonoides.

Para preparar MC de culturas de microglia essas células foram tratadas com os flavonoides rutina ou quercetina a 50 e 100 μM , durante 48 horas. Após esse tempo, o meio de cultura foi então recuperado, centrifugado a 1000 RPM durante 10 min, para a eliminação dos resíduos celulares eventuais, e imediatamente utilizado ou armazenado em alíquotas a -20°C para uso posterior. Em paralelo, células de glioblastoma de rato (C6) foram cultivadas em placas de 3,5 cm de diâmetro, densidade de 1×10^6 , em meio DMEM contendo 10% de SFB, e tratadas durante 48 h com MC de culturas microgliais, com acima descrito (Gomes *et al.* 1999, Lima, *et al.*, 2007).

3.2.6. Avaliação da citotoxicidade pelo teste do MTT e azul de tripan

O teste do MTT, (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, baseia-se no princípio da conversão do substrato de cor amarelo (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas, em cristais de formazan, de cor violácea (Hansen *et al.*, 1989).

As células microgliais e C6 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, e expostas aos flavonoides 50 e 100 μM , o teste do MTT foi realizado após 48 h. Três horas antes do término do tempo de exposição, o meio de cultura contendo as drogas foi removido e substituído pela solução de MTT (100 μl /poço) a uma concentração final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluído em DMEM ou DMEM F12 (Sigma, St Louis, MO). Para completa dissolução dos cristais de formazan, após as três horas de contato com o MTT, foi acrescido um volume de 100 μL /poço de um tampão contendo 20% de duodecil sulfato de sódio (SDS), 50% de dimetilformamida (DMF), pH 4,7, mantendo-se as placas por 12 horas a 37°C . A absorvância óptica de cada amostra foi medida usando um espectrofotômetro (Theratio Plate) em comprimento

de onda de 492 nm. Os experimentos foram realizados no mínimo em octuplicata em três experimentos independentes e os resultados apresentados como a porcentagem da viabilidade (media e desvio padrão) em relação ao controle.

Outro ensaio de citotoxicidade realizado foi coloração com o agente de exclusão azul de tripan (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Uma solução recém preparada de 10 µL de azul de tripan (0,4 %) em água destilada foi misturada com 10 µL de cada suspensão celular durante 5 min, e colocadas em câmeras de Neubauer para contagem ao microscópio de células não-viáveis (aparecem com o citoplasma azul) e viáveis (refringentes). Foram contadas 200 células para cada variável experimental em proporção de células viáveis e não viáveis determinada.

3.2.6. Mensuração de citocinas pró e anti inflamatórias

As citocinas IL-10 e TNF- α foram mensuradas no meio de cultura de células por ELISA sanduíche. As células foram cultivadas em placas de 40 mm de diâmetro ($1,5 \times 10^5$ células/placa) e tratadas com os flavonoides quercetina e rutina (50 - 100µM) ou DMSO a 0,5% (controle). O meio de cultura de três experimentos independentes foi colhido 48 h após o tratamento. A quantidade de IL-10 (R & D systems) e TNF- α (R & D systems) foram medidas de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.7. Dosagem de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida como a concentração de nitrato acumulado no meio de cultura das células utilizando uma reação colorimétrica baseada na reação de Griess (Wang *et al.*, 2002). Cinquenta microlitros do sobrenadante das amostras foram incubados com um volume igual de um reagente de cor (1% de sulfanilamida e 0,1% de naftil-etilenediamina em 2,5% de ácido fosfórico). Após 10 a 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 560 nm usando-se um leitor fotocolorimétrico (Thermo Plate TP-Reader). As concentrações de nitrato foram calculadas por comparação a uma curva de calibração padrão obtida por dosagem de nitrato de sódio diluído em meio de cultura (NaNO_2 , 1,26 - 100 pmol/L). Resultados expressos em pg/mL.

3.2.7. Análises morfológicas

Alterações morfológicas na célula C6 e microglia foram estudadas por microscopia em contraste de fase. Para analisar a morfologia, ativação e proliferação microglial foi realizada a marcação da proteína OX-42 (CD11b), bem como coloração de isolectina B4, respectivamente.

As microglias foram investigadas através da marcação de OX-42. Primeiro, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada durante 10 minutos com H₂O₂ em 3% em PBS. As células foram então incubadas durante 1h com o anticorpo de rato anti-OX-42 (CD11b/c) monoclonal (1:200 em PBS, Caltag, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo de cabra anti-rato IgG de anticorpo conjugado com peroxidase (1:1000 em PBS, Zymed), durante 1 h.

Para contagem de microglia total, essas células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro na densidade de 100.000 células/lamínula, sendo mantidas em DMEM-F12 contendo 10% de SFB durante 24 horas em estufa. Após a permeabilização com PBS-Triton, as células foram incubadas *overnight* com Isolectina B4 (IB4) conjugada a FITC (Sigma) na diluição de 1:100, de acordo com procedimentos previamente descritos (Chamak *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 2001). Foram contados 10 campos por tratamento na objetiva de 10x.

A integridade da cromatina ou a fragmentação/condensação nuclear foi analisada pela coloração da cromatina das células fixadas com o corante fluorescente intercalante do DNA, Hoechst33258 (Sigma, St Louis, MO). Uma solução de Hoechst33258 foi preparada em PBS, a uma concentração final de 5 µg/mL, e deixadas em contato com as células por 10 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura. Em seguida, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus BX70) e fotografadas.

3.2.8. Análise ultra-estrutural

As alterações ultra-estruturais em C6/microglia tratadas com o flavonoide rutina 100µM foram investigadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células foram cultivadas em frascos de 50 ml para formarem monocamadas

confluentes. Depois de atingir a confluência, a monocamada foi tratada com o flavonoide pré-diluído em DMEM durante 48 horas. O meio de cultura foi eliminado e as células foram fixadas (2,0% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio, pH 7,4) à temperatura ambiente (TA) durante 2 horas. Após este período, as amostras foram dissociadas e centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante descartado e as amostras lavadas (3 x 0,1M tampão de cacodilato de sódio), com intervalos de 5 minutos para cada centrifugação a 12800g. Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetona nas concentrações de 30 a 100% em intervalos de 10 minutos para cada concentração. Após a desidratação, o material passou em 100% de acetona + resina epóxi (1:1, v/v) durante 24 horas, para ser incluído em resina epóxi de 100% (Polybed) montado em cápsulas BEEM[®]. As secções histológicas foram realizadas em ultramicrótomo Leica (Alemanha) e, em seguida, coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo contrastadas. O material foi então analisado e documentado em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss), no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CPqGM/Fiocruz, Salvador - Bahia.

3.2.9. Vias de sinalização e expressão das proteínas intracelulares

As células tumorais da linhagem C6 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços e tratadas com os flavonoides rutina e quercetina por 4h. Ao final desta incubação, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS 2% SFB. Posteriormente, as células em suspensão foram centrifugadas por 5 min a 400g, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com uma solução de lise 10% (BD FACS-349202) (Becton & Dickinson) por 30 minutos. As células foram lavadas com uma solução de PBS-0,5% Tween20, centrifugando-as por 5 min a 400g. Em seguida, foi feito o bloqueio para ligações inespecíficas com PBS - 2% SFB durante 15 min a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram centrifugadas nas mesmas condições e foram imunomarcadas com os anticorpos monoclonais anti-STAT3 (1:250, Santa Cruz), anti-STAT3 fosforilada (1:250, Santa Cruz), ou anti-NFκB (1:250, Santa Cruz). Os controles negativos não receberam os anticorpos primários. Após 30 minutos, a temperatura ambiente, as células foram

lavadas com PBS-0,5% Tween20. Foram adicionados os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de cabra conjugado a Alexa Fluor 488 (1:500, Molecular Probes) por mais 30 minutos, a temperatura ambiente e na ausência de luz. As células foram lavadas nas mesmas condições, ressuspensas em PBS 2% de SFB e adquiridas através do aparelho FACScalibur (Becton & Dickinson) no canal FL1 (530nm), utilizando o software Cell Quest (Macintosh).

As aquisições foram analisadas através do software Summit V4.3 (DAKO). Um total de 10.000 eventos (número de células) foi adquirido por tubo e o perfil de expressão das proteínas foi definido como a razão entre a média de intensidade de fluorescência do tubo contendo células imunomarcadas e a média de intensidade de fluorescência do tubo contendo somente o anticorpo secundário como controle negativo (RIF), usada com uma unidade arbitrária (HUET *et al.*, 1998). Este experimento foi realizado 3 vezes de formas independentes.

3.2.10. Ensaio de morte celular

De maneira semelhante ao ensaio de viabilidade celular, as células foram tratadas com Rutina e Quercetina na concentração de 100 μ M e analisadas após 72 h usando Kit Annexin V (Sigma). Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido e as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após a incubação, as células foram recuperadas e lavadas com DMEM-F12 e 10% SFB, centrifugadas por 5 minutos a 400g. Após incubação de 30 minutos com PBS-2%BSA e nova centrifugação, foram adicionados ao *pellet* 90 μ L de uma solução contendo 2 μ L de anexina V conjugada a fluoresceína e 88 μ L de tampão de ligação (*Binding Buffer*), sendo incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Foram adicionados 5 μ L de iodeto de propídio (PI) no momento da aquisição, sendo adquiridos 10.000 eventos por condição. A leitura da fluorescência da anexina V foi feita no canal FL-1 e a do PI, no canal FL-2. O *software* Summit 4.3 foi utilizado para analisar a marcação das células. De acordo com as características técnicas deste experimento, células negativas tanto para anexina V quanto para PI foram consideradas vivas, células positivas apenas para PI foram consideradas necróticas, células positivas apenas para anexina V foram consideradas na fase inicial da apoptose e células positivas

tanto para PI quanto para anexina V foram consideradas na fase avançada da apoptose.

3.2.11. Ensaio de autofagia

De maneira semelhante ao ensaio de morte celular, as células foram tratadas ou não com Rutina e Quercetina na concentração de 100 μM e analisadas após 72 h usando corante fluorescente laranja de acridina (Sigma, Induslab) que caracteriza vacúolos autofágicos. Após o tempo de incubação, foi adicionado o corante fluorescente laranja de acridina (1 $\mu\text{g/ml}$) por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após a incubação, as células foram recuperadas e lavadas com DMEM-F12 e 10% SFB, centrifugando por 5 minutos a 400g. Foram adicionados no *pellet* 250 μL de PBS/BSA 2%. No momento da aquisição, foram adquiridos 10.000 eventos por condição. A leitura da fluorescência foi feita nos canais FL-1 e FL-2. O *software* Summit 4.3 foi utilizado para analisar a marcação das células. De acordo com as características técnicas deste experimento, células positivas para FL-1 foram consideradas vivas e células positivas apenas para FL-2 foram consideradas autofágicas.

3.2.12. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para determinar a diferença estatística entre os grupos foi realizada uma análise de variância seguida pelo teste One Way ANOVA com pos-teste de Dunnett (GraphPad Prisma 4.0 - California, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Efeitos dos flavonoides sobre a viabilidade das células de glioblastoma e microglia

Os efeitos dos flavonoides sobre a viabilidade celular foi quantificada pela conversão de MTT em cristais de formazan (Hansen *et al.*, 1989), ou através da contagem de células viáveis e não viáveis, após coloração com azul de tripan. Observou-se que os flavonoides quercetina e rutina não afetaram o metabolismo mitocondrial em células de glioblastoma nas concentrações adotadas (Fig. 1A). No entanto, a coloração pelo azul de tripan revelou uma redução na percentagem de células viáveis de 4% e 10%, após o tratamento com 50 μM e 100 μM de rutina, respectivamente, quando comparado com o controle (0,5% DMSO), e de 23% e 24% após o tratamento com 50 μM e 100 μM de quercetina, respectivamente (Fig.1B).

A ação de flavonoides sobre a viabilidade celular foi igualmente determinada pelo teste do MTT em culturas primárias de microglia, em culturas de células de glioblastoma C6 submetidas ao meio condicionado (MC) de culturas de microglia tratadas com os flavonoides (contato indireto) e durante a interação direta entre microglia/glioma em sistema de co-cultivo. Não houve alteração significativa no metabolismo mitocondrial das células da microglia após a exposição à rutina (50 e 100 μM), no entanto, uma redução significativa no metabolismo mitocondrial das células foi observada após tratamento com quercetina (50 - 100 μM) (Fig. 1C).

Verificamos igualmente aumento significativo na viabilidade das células C6 após 48 h de cultivo na presença de MC proveniente de culturas de microglia tratadas previamente com o flavonóide rutina a 50 μM e redução também significativamente na viabilidade celular na presença de MC proveniente de culturas de microglia com rutina a 100 μM . O tratamento das células C6 com MC proveniente de culturas de microglia tratadas previamente com os flavonóide quercetina em ambas as concentrações não alterou a viabilidade dessas células (Fig. 1 D). Por outro lado, verificamos nas co-culturas de glioma/microglia redução significativa na viabilidade após tratamento com ambos os flavonoides nas duas concentrações adotadas (Fig. 1 E).

Para determinar a população alvo nas co-culturas de glioma/microglia relacionada à redução do metabolismo mitocondrial observado pelo teste do MTT e o estado funcional da microglia, foi realizada a coloração das culturas com isolectina B4, glicoproteínas que reconhece especificamente a microglia, associada à coloração da cromatina nuclear das células com DAPI. Verificamos que o tratamento das co-culturas com rutina (50 e 100 μ M) induziu aumento na proporção de células isolectina-B4⁺ quando comparados com os controles, indicando proliferação microglial. Por outro lado, após exposição das co-cultura a quercetina, em ambas as contrações, observamos redução na proporção total de núcleos corados com DAPI (Fig. 2). Ainda, a coloração de isolectina B4 mostrou aumento da quantidade de microglia com morfologia amebóide, indicativo de ativação celular. A mudança de estado de ativação da microglia nas co-culturas foi determinada através de imunocitoquímica para OX-42 (CD11b) marcador de microglia ativada, proteína que se apresentou aumentada após exposição a ambos flavonoides (Fig. 2).

3.3.2. Alterações morfológicas

Para investigar as alterações morfológicas das células de glioma em resposta aos flavonoides e durante a interação glioma/microglia utilizamos microscopia de contraste de fase e microscopia de transmissão para determinar alterações ultraestruturais durante a interação glioma/microglia.

As células C6 expostas a ambos os flavonoides mostraram alterações morfológicas importantes, observamos diminuição da celularidade nas culturas e encolhimento citoplásmico e fenótipo bipolar, quando tratadas com o flavonóide rutina. A quercetina também causou mudanças morfológicas em células C6, ao que parece, induziu mudança para uma forma mais estrelada multipolar (Fig 3 A). Observamos que após o tratamento com rutina a aumento da proporção de microglia ramificada, porem em ambos os fenótipos ramificado e ameboide foram evidenciadas após exposição á rutina a 100 μ M. Por outro lado, nas culturas de microglia tratadas com quercetina pode ser evidenciado aumento de células amebóides, mas não aderentes, sugerindo citotoxicidade (Fig. 3 B). A exposição das células C6 ao MC de culturas microgliais tratadas com os flavonoides induziu

alteração no fenótipo, e uma importante redução na celularidade após exposição ao MC de culturas de microglia tratadas com rutina a 100 μ M (Fig. 3 C). A análise por microscopia também revelou a interação glioma/microglia nas co-culturas, além de ativação da microglia após exposição a ambos os flavonoides. Notamos também diminuição na celularidade, interação glioma/microglia indicando diálogo químico importante para a destruição tumoral (Fig. 3 D).

3.3.3. Caracterização de alterações ultraestruturais em co-culturas e morte de células tumorais

A análise por microscopia eletrônica de transmissão em co-culturas de glioma/microglia após 48 h de tratamento com rutina a 100 μ M, mostrou a formação de espirais membranosas (também chamados de figuras de mielina) em diferentes fases de desenvolvimento, além de vacuolização em células de glioma. A análise da morfologia microglial mostrou sua ativação caracterizada pelo aumento do volume celular e do núcleo. Na interação glioma/microglia foram encontradas características para a destruição do tumor, como por exemplo, formação da sinapse glioma/microglia e formação de vacúolo fagocítico microglial sugestivo de fagocitose tumoral (Fig.4).

Para entender as vias de morte envolvidas com as células C6 realizamos ensaios que caracterizam apoptose e autofagia (Fig. 5). Pudemos verificar que houve aumento significativo na proporção de células marcadas com Annexina V, indicativo de apoptose, 72 h após tratamento com o flavonoide quercetina a 100 μ M. Por outro lado, a marcação de vacúolos autofágicos, utilizando o corante fluorescente laranja de acridina, revelou intensa vacuolização 72 h após tratamento com o flavonoide rutina 100 μ M. O tratamento com quercetina também induziu vacuolização mais discreta e em proporção inferior àquela observada após tratamento com rutina.

3.3.4. Modulação da resposta microglial pelos flavonoides

Para investigar se a rutina e quercetina teriam interferência sobre a função de células microgliais, três compostos solúveis no meio de cultura foi mensurado: a

citocina pró-inflamatória TNF- α e a citocina anti-inflamatória IL-10, além do óxido nítrico (NO).

O teste de ELISA foi realizado 48 h após tratamento para investigação da secreção de TNF- α e IL-10 nas culturas microgliais (Fig. 6 A). Neste ensaio observamos, após tratamento com 100 μ M de rutina, aumento significativo na produção de IL-10. Já o flavonoide quercetina foi capaz de reduzir a liberação de IL-10. A citocina TNF- α também foi regulada, sendo verificado aumento significativo no meio de cultura de células tratadas com quercetina (50 e 100 μ M) ou com rutina a 100 μ M.

Em condições controle, o meio de cultura microglial apresentou níveis muito baixos de nitrito: 1,6 pmol/L. Não ocorreram alterações significativas nos níveis de nitrito no meio de cultura das células tratadas com rutina (50 e 100 μ M) ou com quercetina a 50 μ M. No entanto, o flavonoide quercetina a 100 μ M induziu acúmulo de nitrito no meio de cultura (32 pmol/L) após 72 h do tratamento (Fig. 6 B).

3.3.5. Vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica e morte celular induzidas por flavonoides.

Para determinar a modulação da resposta imune pelos flavonoides foi usado FACS para determinar os níveis de expressão de proteínas pSTAT3, STAT3 e NFkB, proteínas associadas a proliferação de tumores e envolvidos na resposta imune, após 4 h do tratamento das culturas de células de gliomas com os flavonoides (Fig. 7). Entre três experimentos independentes, comparáveis, a redução significativa de pSTAT3 foi verificada apenas em culturas tratadas com rutina a 100 μ M. Já a expressão de STAT3 não foi modulada na presença do flavonoide. A expressão de NFkB também foi reduzida significativamente após a estimulação com flavonoides rutina e quercetina.

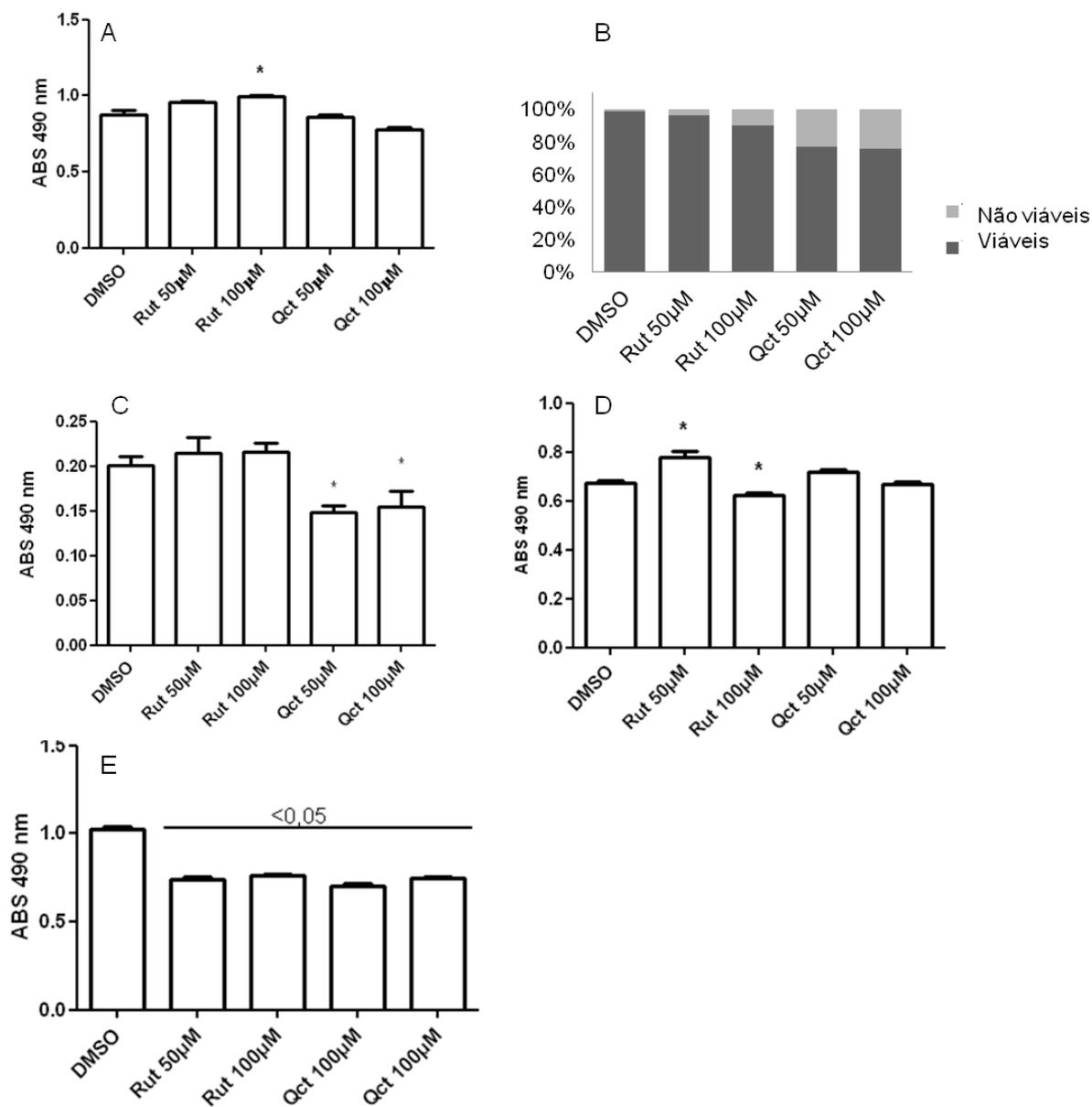


Figura 1- Efeito dos flavonoides rutina (Rut) ou quercetina (Qct) (50-100 µM) sobre a viabilidade de células gliais. (A) Teste do MTT em culturas de células C6; (B) Contagem de células viáveis e inviáveis após colação com azul de tripan em culturas células C6; (C) Teste do MTT em culturas de células microglias isoladas; (D) Teste do MTT em culturas de células C6 tratadas com meio condicionado de microglia exposta aos flavonoides; (E) Teste do MTT em co-culturas de células C6 e microglia. Resultados expressos em média \pm desvio padrão; no teste de tripan o controle (0,5% DMSO) foi considerado como 100% em relação aos tratamentos controle. *P < 0,05 em relação ao DMSO.

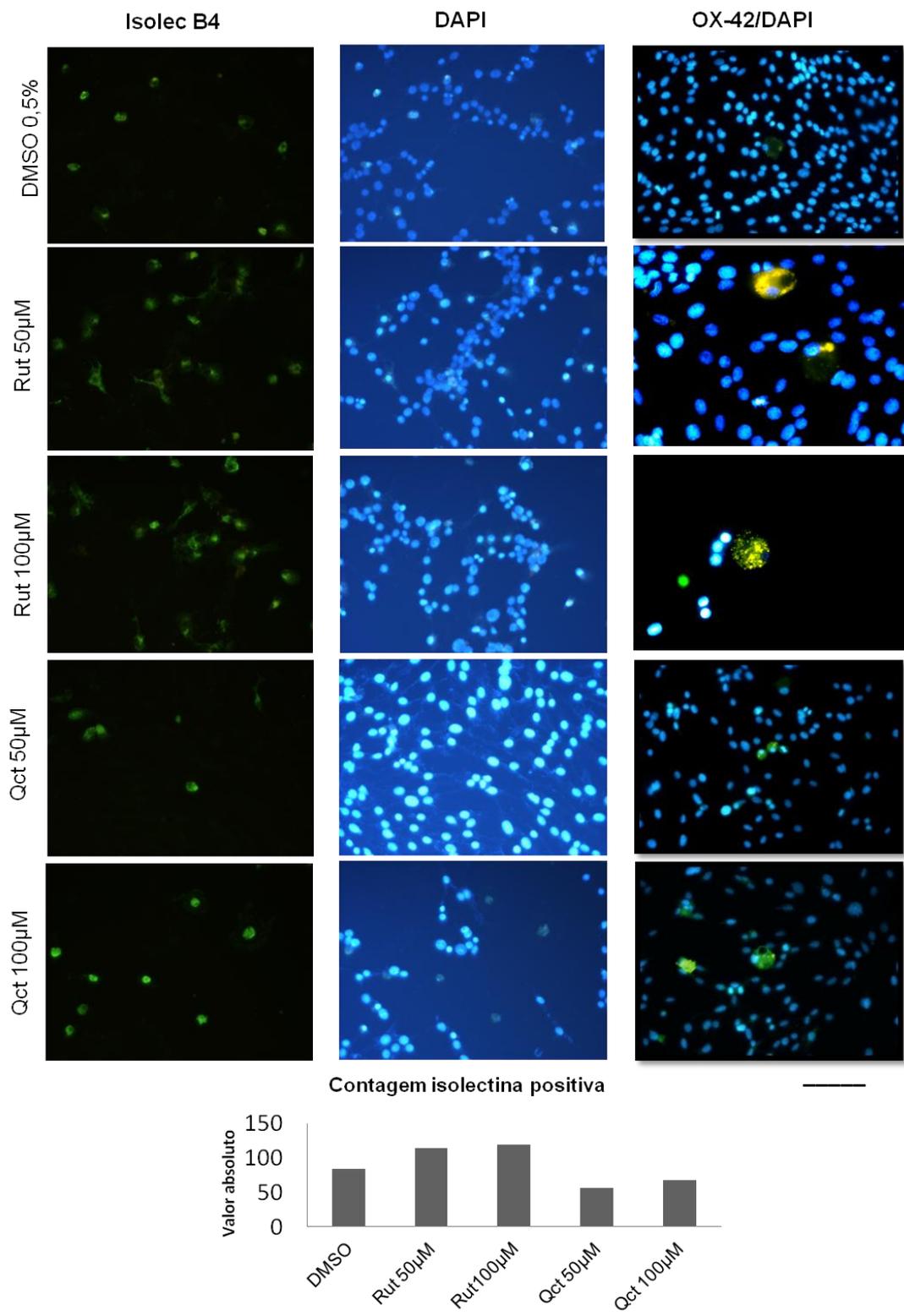


Figura 2- Ação dos flavonoides rutina e quercetina sobre a morfologia e ativação de microglia durante interação com células C6 através da coloração com isolectina B4/DAPI e marcação imunocitoquímica para proteína OX-42 (CD11b). O gráfico representa a contagem (valor absoluto) de microglia coradas com isolectina B4 em co-culturas. As imagens rutina 50 e 100 µM (OX-42/DAPI) estão em maior aumento (20X) para melhor visualizar a relação microglia/glioma. Barra=100µm.

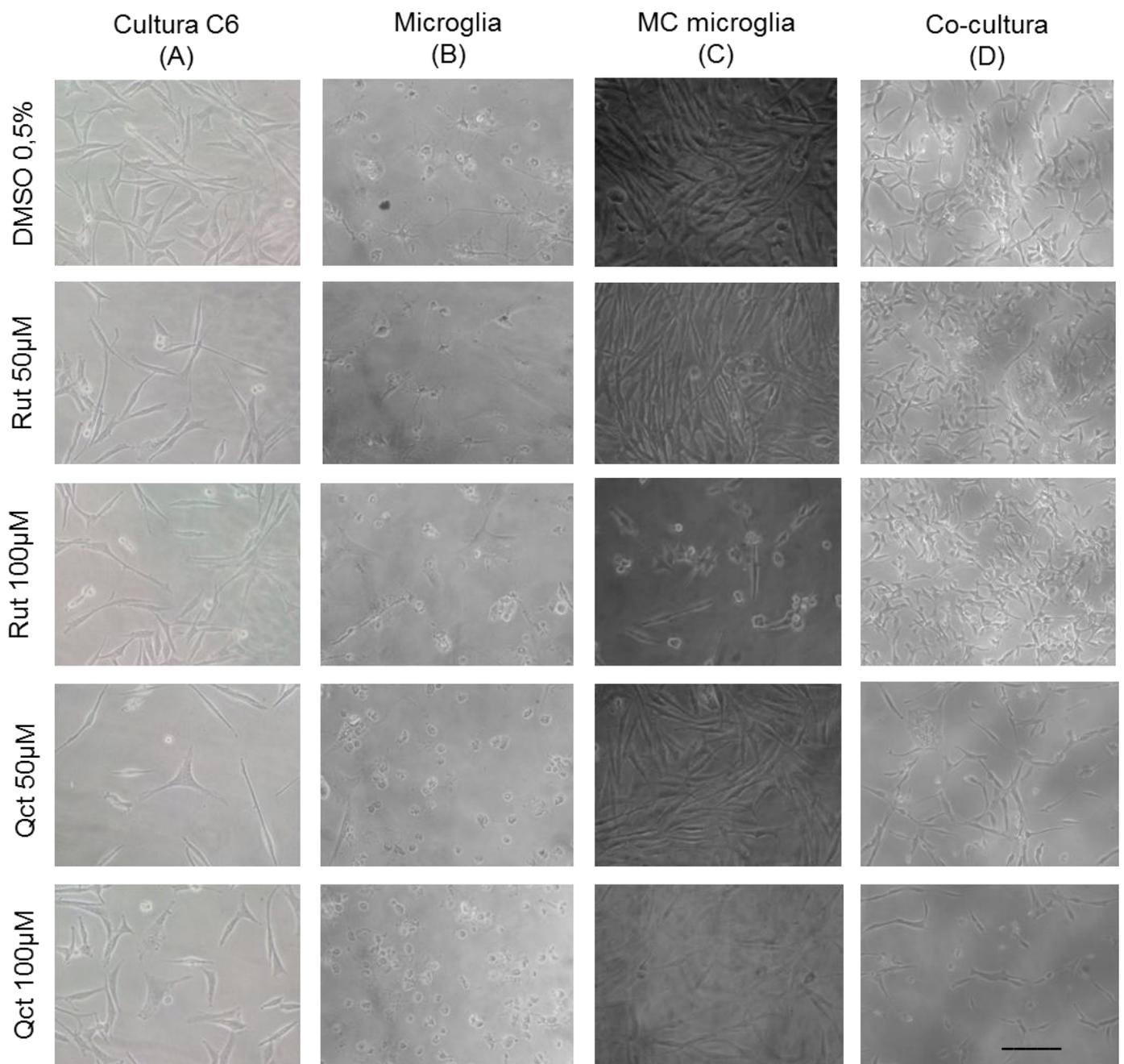


Figura 3- Microscopia por contraste de fases em diferentes culturas tratadas com flavonoide rutina e quercetina por 48h. (A) Cultura de C6 isoladas, (B) cultura de microglia isolada, (C) cultura de C6 tratadas com meio condicionado de microglia e (D) co-cultura glioma/microglia. Barra= 100 µm.

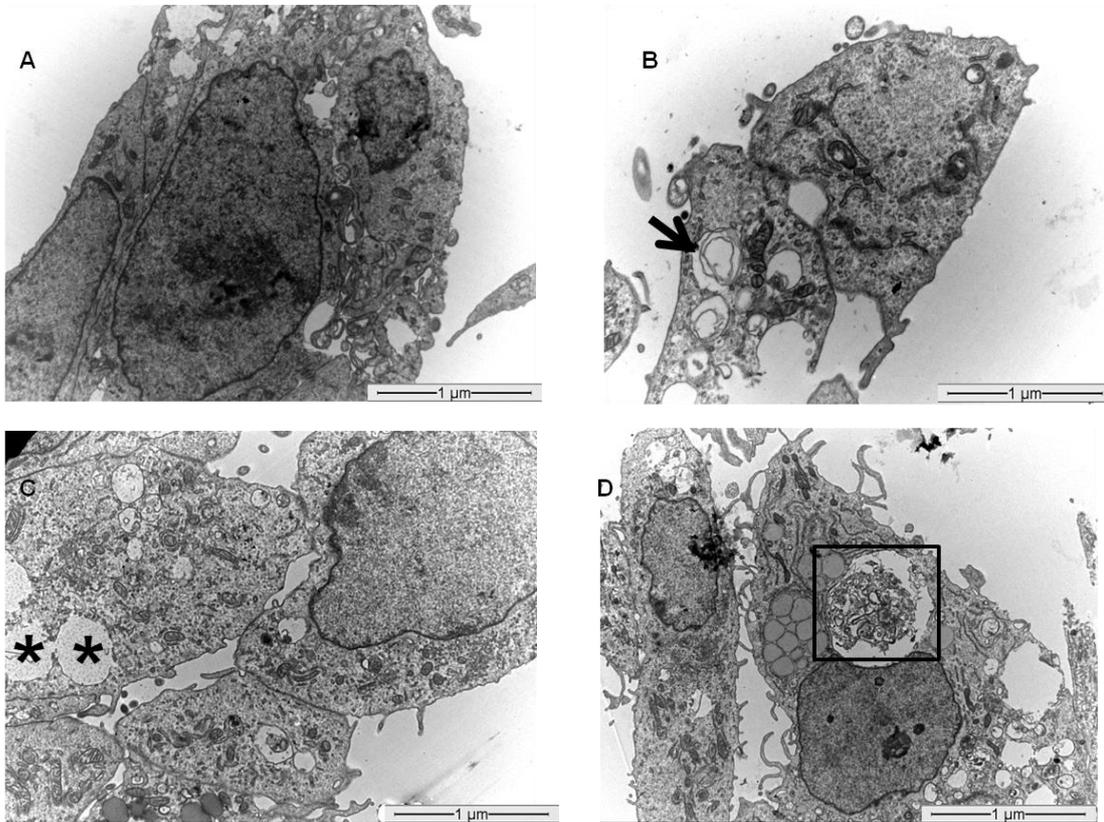


Figura 4- Microscopia eletrônica de transmissão realizada após tratamento de co-culturas microglia/C6. (A) em condições controle (DMSO 0,5%); (B-D) tratadas com rutina (100 µM). São visíveis em co-culturas tratadas com rutina figuras de mielina (imagem B - seta), vacúolos autofágicos em células tumorais (imagem C *) e vacúolo fagocítico microglial (destaque na figura D).

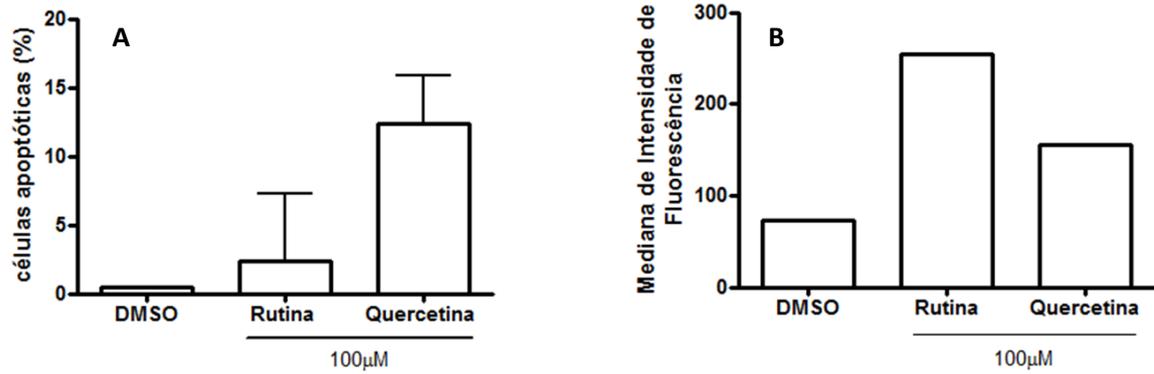


Figura 5- Análise de vias de morte em linhagens de células C6 em condições controle (0,5% DMSO) e após 72 h de tratamento com rutina ou quercetina (100 μ M). (A) Percentual de células em apoptose, utilizando coloração com anexina V indicador de apoptose; (B) mediana de intensidade de fluorescência após coloração com laranja de acridina, indicador da formação de vacúolos autofágicos. Resultados expressos em percentual (A) ou em mediana de intensidade de fluorescências (B).

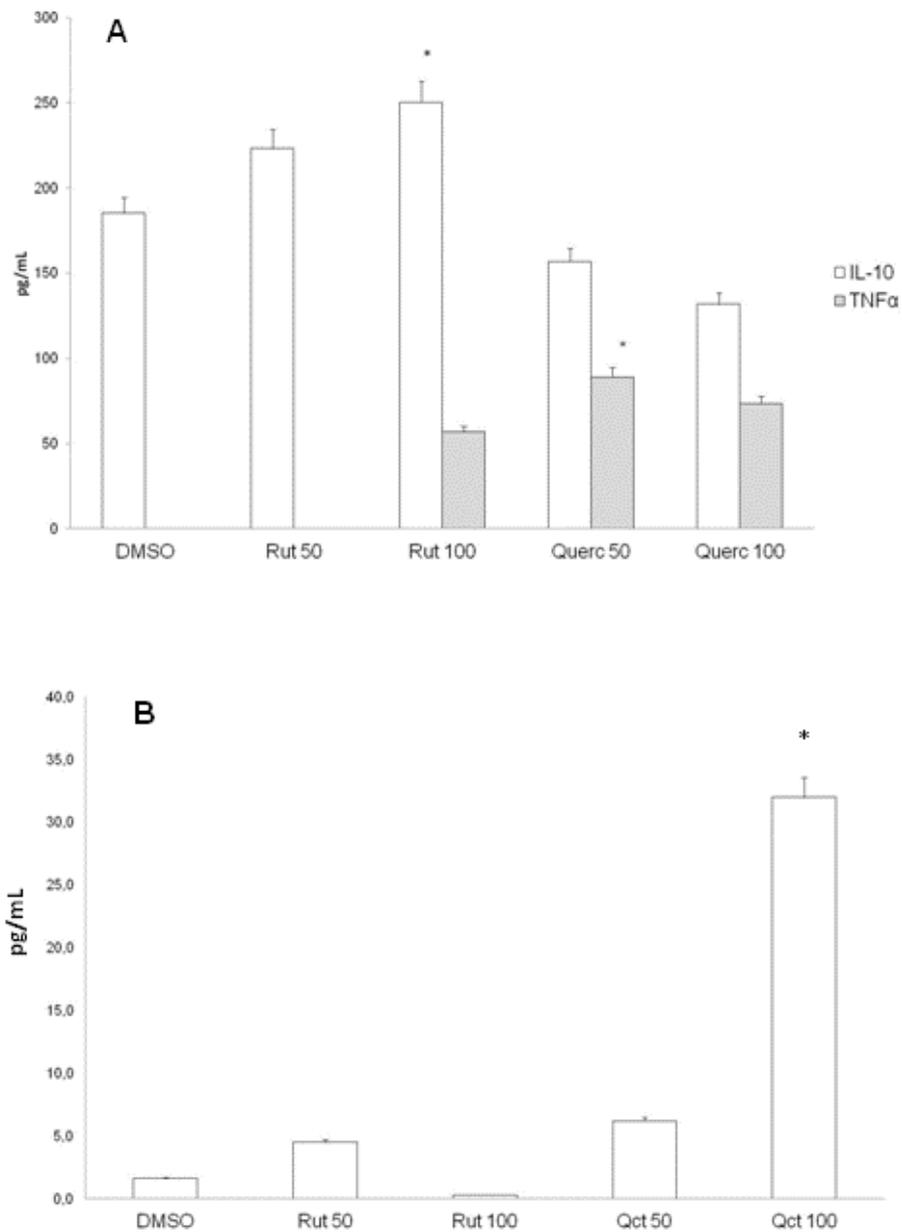


Figura 6- Liberação de fatores tróficos pelas células microgliais em condições controle (0,5% DMSO) e após tratamento com rutina ou quercetina (50 e 100 μ M). (A) Mensuração de citocinas IL-10 e TNF α através de ELISA. (B) Mensuração de nitrito (NaNO₂) baseada na reação de Griess. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. *P<0,05 em relação ao DMSO.

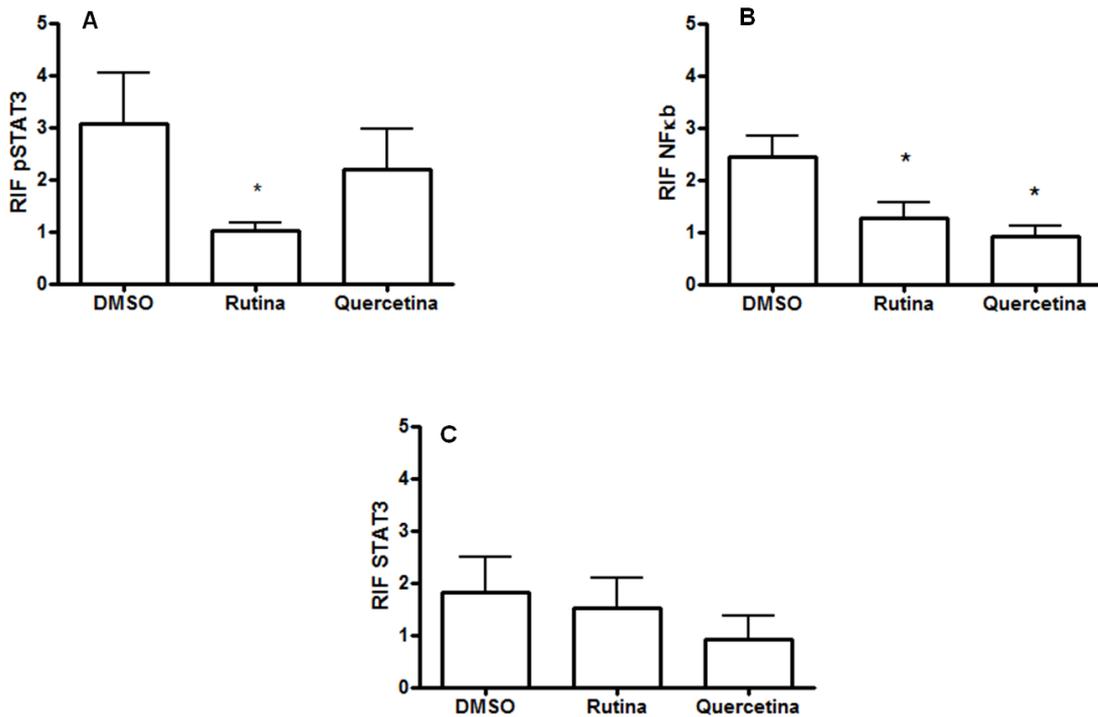


Figura 7- Análise por citometria em fluxo da expressão de pSTAT3, STAT3 e NFκB em linhagens de células C6 em condições controle (0,5% DMSO) e após 4 h de tratamento com rutina ou quercetina (100 μM). A - expressão de pSTAT3. B - expressão de NFκB. C - expressão de STAT3. Resultados expressos como média ± desvio padrão. *P < 0,05 em relação ao DMSO.

3.4. DISCUSSÃO

Os flavonoides apresentam multiplicidade de funções fisiológicas, incluindo a capacidade de modular o sistema imune no cérebro (Spencer, 2012). Alguns flavonoides são sabidamente capazes de estimular a ação anti-inflamatória (Mutoh *et al.*, 2000; Raso *et al.*, 2001). De acordo Friesenecker (1995), os flavonoides podem reduzir a ativação do sistema complemento e a adesão de células inflamatórias no endotélio, o que resulta numa redução da resposta inflamatória. Por outro lado, um dos principais metabolitos fisiológicos da quercetina, quercetina-30-sulfato, foi demonstrado não exercer qualquer ação anti-inflamatória (Chen *et al.*, 2005).

A quercetina apresenta atividade anticancerígena em meduloblastoma (Labbe *et al.*, 2009), cancer do pulmão (Caltagirone *et al.* 1997;. Knekt *et al.*, 1997;. Knowles *et al.* 2000; Marchand *et al.*, 2000) tumores mamários (Verma *et al.*, 1988;. Chung *et al.*, 1999), cancer de próstata (Aalinkeel *et al.*, 2008), melanoma metastático (Caltagirone *et al.*, 2000), leucemia (Csokay *et al.*, 1997.), cancer colo-retal (Kuo, 1996; Wfite *et al.* 1996; Wenzel *et al.* 2000) e glioma maligno (Siegelin *et al.*, 2009).

Em um estudo prévio investigamos o potencial imunomodulador do flavonoide rutina em células gliais, não sendo observada toxicidade, mas indução de ativação astrócitaria e microglial, caracterizada pela indução de NO e produção de citocina pró-inflamatória TNF- α (Silva *et al.*, 2007). Por outro lado, outros estudos desenvolvidos para investigar o potencial atitumoral de flavonoides provaram que a rutina é capaz de inibir a proliferação e induzir diferenciação de células de glioblastoma humano da linhagem GL-15, além de promover a diminuição na expressão de fatores pró-angiogênicos (VEGF e TGF β -1) (Freitas *et al.*, 2008;. Santos *et al.*, 2011).

No nosso estudo verificamos que o flavonoide rutina foi capaz de reduzir a viabilidade de células C6, mas mantendo viáveis as células microgлияis. Estudos desenvolvidos por Silva, 2007, revela que o flavonoide rutina não alterou a viabilidade de astrocitos. Já o flavonoide quercetina reduziu a viabilidade de células C6 e microglia. De acordo com Kuhar (2006), os sinais de estresse oxidativo, induzidas pela formação de espécies reativas de oxigênio, são considerados

importantes ativadores de apoptose. Neste estudo, quercetina diminui a viabilidade celular, possivelmente mediado por espécies de oxigênio reativo, evidenciado através do estímulo para formação do NO em culturas de microglias tratadas com esse flavonóide.

Durante danos aos SNC a microglia sofre ativação, caracterizada por alterações na morfologia, modificações na expressão de genes, proliferação, capacidade fagocítica e migração para o local da lesão (Streit *et al.*, 1999). No entanto, o papel da microglia na progressão do glioma não é ainda bem compreendido.

Alguns estudos têm observado que a microglia pode comprometer até um terço do glioblastoma (Badie, 2001). Existe uma hipótese de que uma diminuição na função microglial é responsável, pelo menos em parte, pela falta de imunidade contra produtos provenientes do glioblastomas, apesar de ocorrer infiltração de células imunes para o microambiente tumoral. Na verdade, vários estudos têm relatado que microglia associadas ao glioma tornam-se hiporresponsivas, com sua capacidade de estimulação reduzida. Isto pode ser explicado pela presença de células-tronco do tumor (TSC), pois apresentam capacidade de imunossupressão (Brian, 2008). Kostianovsky *et al.* (2008) utilizaram co-cultura microglia/glioblastoma, a fim de entender a resposta imunitária ao tumor. Observaram também que os monócitos cultivados junto com astrócitos humanos ou com células de glioblastoma (GBM) conferem estado tolerogênico nessas células imunológicas, e impedem a ativação subsequente dos monócitos. Este modelo pode ser útil no estudo de mecanismos celulares e moleculares envolvidas na interação da microglia com células tumorais.

Uma característica da progressão tumoral e sua recorrência é a capacidade para evadir o sistema imune. Essa característica envolve a tolerância tumoral que é a capacidade de escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico (Zou, 2005). As células tronco do tumor podem usar este mecanismo para escapar da detecção pelo sistema imunológico e ajudar na progressão do tumor.

As citocinas são moléculas importantes para a ativação e regulação do sistema imunitário, e podem ter um papel importante na sobrevivência do tumor

(Abbas, 2007). Na literatura, foi observado que a microglia presente em gliomas malignos é afetada pelas células tumorais, evidenciada por indução na expressão de STAT3 e, conseqüentemente produção de IL-10. A nossa hipótese também afirma que os flavonoides são capazes de reduzir a resposta Th2, em particular através da alteração dos mecanismos de sinalização, neste caso STAT3 e pSTAT3. Publicações recentes suportam a hipótese de que a proteína de sinalização pSTAT3 desempenha um papel importante na progressão do tumor, uma vez que está envolvida na produção de IL-10, assim flavonoides podem atuar inibindo essa molécula e causar a diminuição da resposta Th2 (Yu *et al.*, 2007). O papel da STAT3 na sobrevivência de gliomas malignos foi recentemente estudado, demonstraram que a inibição dessa via de sinalização resultou em apoptose em células de glioma humano (Iwamaru, 2007). Já o NFkB apresenta uma relação com síntese de TNF α (Nishinakamura, 2007).

Deste modo, a inibição farmacológica da atividade da pSTAT3 e TNF α observada após tratamento com o flavonóide rutina nos cocultivos microglia/C6 pode ser uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento de pacientes com gliomas malignos, devido a sua importante resposta como adjuvante imunológico (Hussain, 2007). Demonstramos uma tendência para a resposta Th2, mas percebemos o potencial dos flavonoides em direcionar para o perfil Th1, indicado pela presença do TNF- α no meio. Se existe ou não uma molécula única dominante, ou uma rede complexa de vias inibitórias, responsáveis pela supressão da função microglial, ainda não sabemos. Na verdade, acreditamos ser necessária uma verificação bastante abrangente sobre esse ponto, pois somente desta forma, conseguiremos desvendar os mecanismos de supressão ou ativação da microglia. Além disso, esses fatores de transcrição (STAT3 e NFkB) induzem aumento da expressão de Bcl xL nas lesões pré-malignas de células tumorais (Greten, 2002). Nosso estudo mostrou uma redução em ambas às proteínas sinalizadoras.

Flugel *et al.* (1999), afirmaram que a microglia é capaz de efetivamente funcionar como célula apresentadora de antígenos (APC). Observamos neste estudo, através da microscopia de transmissão, a formação do vacúolo fagocitário na microglia. De acordo com Tambuyzer *et al.*, (2009), durante o estímulo da microglia ocorre a transformação para um fenótipo ativado, equipado com inúmeras

funções efetoras imunes. Neste caso, a microglia torna-se uma célula fagocítica, com potencial para proliferar e secretar citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, proteases, etc. Isto permite que se movam através do tecido do SNC, com o objetivo de eliminar o alvo, induzir a apoptose/necrose das células ou agentes patogênicos, além de manter o equilíbrio e diálogo com neurônios e outras células da glia no microambiente imunológico do SNC. A rutina induziu autofagia em células do tumor, caracterizada pela formação da figura de mielina e coloração com laranja de acridina. Eventos iniciais de morte incluíram o aumento de vesículas citoplasmáticas bem como, aparecimento de dupla-estruturas de membrana em células tumorais, observadas por microscopia eletrônica.

Estes resultados sugerem a rutina como droga antitumoral potente, pois modula a ativação da microglia, mantendo sua integridade, mas induz alterações significativas nas células tumorais, incluindo a formação de figuras de mielina, envolvidas no processo da autofagia. A autofagia é um processo catabólico e um processo fisiológico conservado evolutivamente para a degradação e reciclagem de componentes celulares, pode promover a indução de apoptose, estímulo a senescência, modulação do ciclo celular e, com isso, exerce papel central na biologia de vários tipos de tumores. Diretamente ou através dessas modulações, a autofagia pode atuar como parte do mecanismo de morte tumoral (Thomé, 2011). Ainda, autores sugerem que a microglia pode induzir morte do glioma através do estímulo a autofagia (Kroemer, 2005; Okada, 2004). Figuras de mielina são estruturas semelhantes a corpos lamelares encontrados na célula em processo de fagocitose. Embora a razão para a sua formação não seja muito bem compreendida, elas parecem estar relacionadas com debris celulares ou restos de organelas degradadas. Os vacúolos autofágicos, muitas vezes, contêm estruturas semelhantes (Arudchelvan, 2005).

A resistência à farmacoterapia de pacientes com glioblastomas alterou a compreensão da comunidade científica sobre a biologia dos tumores do SNC, gerando uma reavaliação das drogas utilizadas atualmente para tratamento de gliomas malignos. Ainda, as recentes descobertas sobre a relação microglia-glioma tornam-se útil na elaboração de novas estratégias terapêuticas contra tumores cerebrais malignos como o glioblastoma. A descoberta de novas drogas para o

tratamento poderá ajudar na destruição desse tumor, uma vez que consigam alterar o perfil de resposta imune induzindo a microglia para o ataque tumoral. Os resultados aqui apresentados são muito promissores. Eles mostram o potencial do flavonoide rutina para uma possível terapia contra gliomas malignos, através da combinação com drogas já utilizadas, contribuindo para a melhora do prognóstico de pacientes acometidos por gliomas malignos. Por fim, mais estudos são necessários para melhor compreender essa relação, bem como os efeitos antitumorais dessas moléculas.

3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arudchelvan Y, Tokuda N, Adachi Y. Ultrastructural alterations of the cortical epithelial cells of the irradiated and recovering rat thymus. **Arch Histol Cytol**: 68(3):205-12. 2005.

Badie, B., and J. Schartner. Role of microglia in glioma biology. **Microsc. Res. Tech.** 54: 106–113. 2011

Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L., W., Sweet differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, 161 PP. 370–37. 1968

Chamak, B., Morandi, V., Mallat, M. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. **J Neurosci Res.** 38, 221-33. 1994

Chen, J.C., Ho, F.M., Pei-Dawn Lee, C., Chen, C.P., Jeng, K.C., Hsu, H.B., Lee, S.T., Wen Tung, W., Lin, W.W. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I kappa B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. **Eur. J. Pharmacol.** 521, 9–20. 2005

Florian R. Greten; Christoph K. Weber; Tim F. Greten; Günter Schneider; Martin Wagner; Guido Adler; Roland M. Schmid. Stat3 and NF- κ B activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. **Gastroenterology**. 123(6):2052-63. 2002

Flugel A, Labeur MS, Grasbon-Frodl EM, Kreutzberg GW, Graeber MB. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. **Int J Dev Neurosci**. 17:547–556. 1999

Friesenecker,B.; Tsai, A.G.; Intaglietta, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. *Int J Microcirc Clin.v.15, p.17-21*. 1995

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**. 21:2683–2710. 2007

Gomes, F.C., Garcia-Abreu, J., Galou, M., Paulin, D., Moura Neto, V. Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. **Glia**. 26, 97-108. 1999

Hussain, S. F., L. Y. Kong, J. Jordan, C. Conrad, T. Madden, I. Fokt, W. Priebe, and A. B. Heimberger. A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. **Cancer Res**. 67: 9630–9636. 2007

Iwamaru, A., S. Szymanski, E. Iwado, H. Aoki, T. Yokoyama, I. Fokt, K. Hess, C. Conrad, T. Madden, R. Sawaya, *et al.*. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. **Oncogene**. 26: 2435–2444. 2007

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G;Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death:

Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ** 12 (Suppl 2):1463– 1467. 2005

Kuhar M; Sen S and Singh N. Role of Mitochondria in Quercetin-enhanced Chemotherapeutic Response in Human Non-small Cell Lung Carcinoma H-520 Cells. **Anticancer Research**. 26: 1297-1304. 2006

Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen,R.; Helibvaara,M.; Teppo, L.; Pukkala,E.; Aromaa, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. **American Journal of Epidemiology**, n. 3, v. 146. 1997

Knowles, L.M.; Zigrossi, D.A.; Tauber, R.A.; Hightower, C.; Milner, J.A.N. Flavonoids suppress androgen independent human prostate tumor proliferation. **Nutr Cancer**, v. 38, p. 116-122. 2000

Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH. Epigenetic mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. **Cancer Cell**.13:69–80. 2008

Lima, F.R., Gervais, A., Colin, C., Izembart, M., Neto, V.M., Mallat, M.. Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. **J Neurosci**. 21, 2028-38. 2001

Lima, F.R., Arantes, C.P., Muras, A.G., Nomizo, R., Brentani, R.R., Martins, V.R. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem**. 103, 2164-76. 2007

Marchand, L.; Murphy, S.P.; Hankin, J.H.; Wilkens, L.R.; Kolonel, L.N. Intake of flavonoids and lung cancer. **J Natl Cancer Inst**. v. 92, p. 154-160. 2000

Marcos Paulo Thomé; Eduardo Cremonese Filippi Chiela; Guido Lenz . Vincristina induz apoptose, parada no ciclo celular e autofagia em células de gliomas. Salão de Iniciação Científica (2011. UFRGS, Porto Alegre, RS). Resumo publicado em evento.

MUTOH, M. *et al.* Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Jpn J Cancer Res.** v.91, p.686–91. 2000

Nishinakamura, H., Y. Minoda, K. Saeki, K. Koga, G. Takaesu, M. Onodera, A. Yoshimura, and T. Kobayashi.. An RNA-binding protein β -CP-1 is involved in the STAT3-mediated suppression of NF κ B transcriptional activity. **Int. Immunol.**19: 609–619. 2007

Ohgaki, H.; Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453. 2007

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. **Nat Rev Cancer.** 4:592–603. 2004

RASO, GM. *Et al.* Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci**;v. 68, p. 921–31. 2001

Rodrigo Mora; Anette Abschuetz; Tim Kees; Ivana Dokic; Natalie Joschko; Susanne Kleber; Renate Geibig; Eric Mosconi; Hanswalter Zentgraf; Ana Martin-Villalba; Anne Régnier-Vigouroux. TNF- α - and TRAIL-resistant glioma cells undergo autophagy-dependent cell death induced by activated microglia. **Glia.** 1;57(5):561-81. 2009

Santos B.L., Silva A.R., Pitanga B.P.S., Sousa C.S., Grangeiro M.S., Fragomeni B.O., Coelho P.L.C., Oliveira M.N., Menezes-Filho N.J., Costa M.F.D., El-Bachá R.S., Velozo E.S., Sampaio G.P., Freire S.M., Tardy M., Costa S.L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry** 127, 404–411. 2011

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA.. Reactive microgliosis. **Prog Neurobiol.** 57:563–581. 1999

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med.** 352:987–996. 2005

Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. **J Leukoc Biol**;85:352-70. 2009

Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, Daumas-Duport C: New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. **Neurosurgery.** 55(6):1377-1391. 2004

Wang Z, Li D, Liang Y, Wang D, Cai N. Activation of astrocytes by advanced glycation end products: cytokines induction and nitric oxide release. **Acta Pharmacol Sin.** 23(11):974–80. 2002

Zawadzka M, Kaminska B. A novel mechanism of FK506-mediated neuroprotection: downregulation of cytokine expression in glial cells. **Glia.** 49: 36–51. 2005

Zhang J, Stevens MF, Laughton CA, Madhusudan S, Bradshaw TD. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. **Oncology.** 78:103–114. 2010

4 - ARTIGO CIENTIFICO II – Efeito de flavonoides na morfologia, viabilidade e diferenciação de células de glioblastoma Humano.

Resumo

Gliomas são os mais frequentes e malignos entre os tumores intracranianos. Os nossos estudos anteriores sugerem que os flavonoides derivada de plantas funcionam como inibidores do crescimento em células de glioblastoma. Neste estudo foram investigados os efeitos de 9 flavonoides hidroxilados e 4 metilados sobre a morfologia, viabilidade e diferenciação em células de glioblastoma humano U251, GL15 e TG1. Como revelado através do teste MTT todos os flavonoides testados apresentaram efeito inibitório dose-dependente sobre a viabilidade das células após o tratamento com 1-100 μM de flavonoides durante 72h. As células GL-15 foram as mais resistentes. Além disso, imunocitoquímica para marcadores gliais e neuronais revelou que o tratamento com rutina e quercetina após 6 dias induziu alterações morfológicas em células TG1 que expressavam nestina, GPAP and β III-tubulina. *Time lapse microscopy* em células TG1 mostrou que a rutina (100 μM) inibiu a migração de células e formação de esferas. A morfologia das linhagens U251 e GL-15 revelaram diferenças, mas a expressão de proteínas (GFAP, nestina e beta tubulina III) permaneceu a mesma, esta característica indica células indiferenciadas. Estes resultados demonstraram a capacidade dos flavonoides rutina e quercetina para induzir a inibição de crescimento de tumor de células-tronco e células viáveis para dirigir a diferenciação, e sugerem que estas moléculas apresentam enorme potencial terapêutico.

Palavras Chaves: Glioblastoma, célula troco tumoral, Flavonoides.

4 - MANUSCRIPTII - Effect of flavonoids on morphology, viability and differentiation of human glioblastoma cells.

Abstract

Gliomas are the most frequent and malignant among intracranial tumors. Our previous studies have been suggested that plants flavonoids derived act as inhibitors of growth of glioblastoma cell lines. In this study we investigated the effect of 9 polyhydroxy flavonoids and 4 methyl esters flavonoids on viability, morphology and differentiation on high proliferative human glioblastoma cells (U251 and GL-15 cell lines) and on tumour initiating cells (TG1 cell line) derived from a human malignant neuroglial tumor human. As revealed by MTT tests all flavonoids tested presenting a dependant dose inhibitory effect on cell viability after 72h treatment with 1-100µM flavonoid, and GL-15 cells were the most resistant. Moreover immunocytochemistry for glial and neural markers revealed that treatment with rutin and quercetin for 6 days induced morphological changes in TG1 cells which expressed nestin, GPAP and β III-tubulin. Time lapse microscopy analysis in TG1 cell showed that rutin (100 µM) inhibit cells migration and formation spheres. The morphology of U251 and GL-15 cells showed differences, but the expression of proteins (GFAP, nestina e beta III tubulina) remains the same, this characteristic indicates undifferentiated cells. These findings demonstrated the ability of flavonoids rutin and quercetin to induce growth inhibition of stem cells tumor and drive viable cells towards differentiation, and suggest these potential molecules therapeutic.

Kew word: Glioblastoma, Tumor stem cell, Flavonoid.

4.1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma humano é o mais maligno entre os gliomas, em virtude do seu crescimento rápido, da destruição de extensas áreas de tecido nervoso e do edema intenso que provoca. O prognóstico é delicado, e a maioria dos pacientes não sobrevive um ano e meio depois de confirmado o diagnóstico. Mesmo com a grande malignidade, as metástases ocorrem apenas no SNC pela via liquórica, e metástases em outros órgãos são muito raras (Rowland, 1986; Brasileiro-Filho *et al.*, 1994; Cotran, *et al.*, 2000; Porto, 2001).

Na maioria dos países europeus e na América do Norte a incidência é de 3 a 4 novos casos a cada 100.000 indivíduos. O INCA (instituto nacional do câncer) estima que no Brasil ocorram 9270 novos casos de tumores cerebrais, desses, 400 estão estimados para o estado da Bahia em 2012 para ambos os gêneros. Esse tumor pode se manifestar em qualquer idade, mas afeta preferencialmente adultos, com maior incidência entre 45 e 75 anos de idade. (Louis *et al.*, 2007).

O glioblastoma é altamente resistente à terapia com mínimo aumento da sobrevida. Frequentemente requer ressecção cirúrgica agressiva, radioterapia externa e doses máximas de agentes alquilantes na quimioterapia, como exemplo, a temozolomida (TMZ), nitrosureia e bis-cloronitrosureia (também conhecido como carmustina) (Germano *et al.*, 2010).

Acredita-se que a resistência quimioterápica para o glioblastoma é dada pelas células tronco do tumor. Sua existência era incerta, no entanto, a alta malignidade associada ao rápido crescimento dos glioblastomas suportou a hipótese da existência dessas células (Singh *et al.*, 2004). Singh *et al.* (2003) identificaram que células-tronco normais e células-tronco do câncer compartilham propriedades fenotípicas e funcionais similares, como a capacidade clonogênica que possibilita a partir de uma pequena colônia dessas células a propagação do tumor. De fato, populações de células imaturas capazes de se auto-renovar tem sido isoladas de tumores de cérebro humano e de animais (Barnett *et al.*, 1998; Ignatova *et al.*, 2002; Bao *et al.*, 2008; Patru *et al.*, 2010). Portanto, no campo do desenvolvimento de drogas antitumorais existe um grande interesse em fármacos potencialmente ativos em células tronco no ambiente tumoral.

Nas últimas décadas houve um aumento de interesse pela comunidade científica, em investigar a ação antitumoral de flavonoides presentes em muitos vegetais, frutas e legumes (para revisão ver Machado, 2008). Nossos estudos tem demonstrado que o flavonoide rutina apresenta capacidade para inibir o crescimento e induzir a diferenciação de células do glioblastoma, sugerindo que este composto poderia ser considerado como droga suplementar ao tratamento de gliomas malignos (Santos, 2011). Ainda, este flavonoide também revelou a propriedade de ativar microglia e regular secreção de fatores pró-inflamatórios como TNF α e NO (SILVA *et al.*, 2005), que sabidamente são regulados no nicho tumoral imunologicamente controlado durante a interação glioma/microglia. Outros estudos já apontam a propriedade deste flavonoide em regular a resposta migroglial favorecendo a resposta imune celular contra células tumorais do glioblastoma (Pitanga, *et al.* dado não publicado).

O conjunto destes achados sobre a ação antitumoral e imunomodulatória da rutina, destaca a importância da continuidade de estudos sobre efeitos de diferentes flavonoides em busca de alternativa terapêutica para gliomas malignos e para as células tronco de tumor. Neste contexto, este estudo foi desenvolvido com intuito de realizar uma prospecção da ação de flavonoides com diferentes graus de hidroxilação, metilação e glicosilação, sobre o metabolismo, viabilidade e morfologia de linhagens de células derivadas de glioblastoma humano altamente proliferativas (GL-15 e U251) e de células tronco tumoral (TG1), e relacionar a quimiosensibilidade a estes fármacos com a expressão de proteínas marcadoras de células indiferenciadas e em diferentes graus de diferenciação.

4.2. METODOS

4.2.1. Drogas

O flavonoide rutina foi obtido sob a forma de pó no Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica (Universidade Federal da Bahia, Brasil). Os flavonoides 7-8 dihidroxiflavona, quercetina, crisina, genisteína, fisetina, kampeferol, 8-metil cirisiliol, cirisiliol, hinoquiflavona e acacetina foram adquiridos da Sigma e os 3´4´dihidroxiflavona e geraldol por extrasíntese. Todos estes gentilmente cedidos

pelo Prof. Dr. Guy Chabot do Laboratoire de pharmacologie chimique, génétique & imagerie, Paris, F-75006 France, Université Paris Descartes. A figura 1 mostra a estrutura química dos flavonoides utilizados neste estudo.

Os flavonoides foram dissolvidos em dimetil sulfoxido (DMSO) a 100% e mantidos no escuro à temperatura de -20°C. As diluições finais de cada um dos flavonoides foram obtidas no momento do tratamento. Diluições exponenciais foram adotadas e as células foram tratadas durante um período 72 h ou 1 semana (células TG1). O grupo controle foi tratado com DMSO diluídos em meio de cultura, adotado a concentração equivalente usado nos grupos tratados (0,1 - 0,5%) e, não mostrou nenhum efeito significativo nos parâmetros analisados em comparação com as células que não receberam diluentes.

4.2.2. Cultura de células

As linhagem celulares do glioblastoma multiforme humano, GL-15 (Bocchini *et al.*, 1993) e U251 (adquirido comercialmente) foram mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂ em meio DMEM e suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença de antibióticos (100 UI/mL penicilina G, 100 µg/ml estreptomicina). As células foram cultivadas em placas de cultivo celular com 100 mm de diâmetro contendo 10 mL de meio com a troca a cada dois dias, conforme estabelecido por Costa *et al.* (2002). Quando atingiram a confluência, as células foram transferidas para novas placas sob a ação de solução de tripsina/EDTA (0,05% tripsina, 0,02% EDTA, em PBS livre de Ca²⁺/Mg²⁺). As células foram semeadas em placas de poliestireno com 96 poços na densidade de 10⁴ células por poço em um volume final de 100 µL. Após 24 h, o meio de cultura das células foi substituído por meio DMEM com os flavonoides a serem testados. Após 72 horas de tratamento as células foram avaliadas com auxílio de microscopia por contraste de fase (Nikon, Japão) e fotografadas. Em seguida foi realizado o teste de viabilidade celular e análise morfológica.

As células da linhagem TG1, derivadas do tumor maligno (Varlet *et al.*, 2004), foi gentilmente fornecido por Dr. Hervé Chneiweiss e mantidas de acordo com o protocolo descrito por Patru *et al.* (manuscrito em preparação). As células foram

cultivadas em meio DMEM/F12 completo (suplementado com 1 mM de L-glutamina, 25 mM de glicose, 10 mM de HEPES) adicionado os seguintes fatores de crescimento: N2, G5 e B27.

4.2.3. Screening com flavonoides

Para identificar a ação dos flavonoides sobre as células GL-15, U251 e TG1 foram realizados o tratamento por 72 horas nas seguintes concentrações: 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M e 100 μ M. Os flavonoides testados foram 3',4'-dihidroxi-flavona, 7,8-dihidroxi-flavona, acacetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxi-flavona), campferol (3,4',5,7-tetrahidroxi-flavona), cirsiol (3',4',5-trihidroxi-6,7-dimetoxi-flavona), 8-metil-cirsiol, crisina (5,7-dihidroxi-flavona), fisetina (3,3',4',7-tetrahidroxi-flavona, 5-deoxiquercetina), genisteína, geraldol (3,4',7-trihidroxi-3'-metoxi-flavona), hinokiflavona (4',6''-biapigenina), quercetina (3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona) e rutina (quercetina-3-33 rutinosida hidratada). Como controles negativos foram utilizados o meio de cultivo DMEM e o meio com o diluente dos compostos (DMSO) na maior concentração. As soluções estoque dos flavonoides foram mantidas sob refrigeração a 5°C diluídas em DMSO a 50mM. Para o tratamento, os flavonoides foram diluídos em meio DMEM nas concentrações desejadas. Após o tratamento, as células permaneceram em estufa a 37°C com 5% CO² por 72 horas.

4.2.4. Teste de viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade das células GL-15, U251 e TG1 foram submetidas aos tratamentos com diferentes flavonoides e nas diferentes concentrações e realizado o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) conforme descrito por (HANSEN *et al.*, 1989). O teste baseia-se na redução do sal tetrazolato de cor amarela em cristais de formazan de cor violácea. Essa conversão é realizada por células viáveis e pode ser quantificada por espectrofotometria com o comprimento de onda de 540 nm. As células foram submetidas ao teste do MTT 72 horas após o tratamento trocando-se o meio de cultivo por 100 μ L de uma solução de 1mg/ml de MTT diluído em meio DMEM e incubada por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período foi

acrescido um volume de 100 µL/poço do tampão de lise, formado por 20% SDS, 50% de DMF com pH 4,7. As placas foram mantidas por 12 horas a uma temperatura de 37°C para completa dissolução dos cristais de formazan. A absorbância óptica de cada amostra foi medida usando um espectrofotômetro (Thermo Plate) em um comprimento de onda de 492 nm. Os dados foram apresentados como porcentagem da absorbância do controle.

4.2.5. Caracterização do fenótipo celular

A caracterização do fenótipo celular de linhagem de células do glioblastoma GL-15, U251 e TG1, foram realizadas por imunocitoquímica, visualizando a expressão da proteína progenitoras neurais (nestina), proteína acida fibrilar glial (GFAP) e proteína marcadoras de neurônios imaturos (β -tubulina III). O fenótipo das células não aderentes (TG1) foram caracterizadas por Patru *et al.* (manuscrito em preparação).

4.2.5.1. Análises morfológicas

Alterações morfológicas nas células GL-15, U251 e TG1, foram estudadas pelos padrões de expressão de proteínas do citoesqueleto GFAP, beta III tubulina e nestina, através da imunocitoquímica. As células foram semeadas em placas de cultura de poliestireno (Cultilab, SP, Brasil) de 35 mm ϕ , conforme já descrito. Após o período de tratamento, as células foram lavadas três vezes com PBS, fixadas e permeabilizadas com metanol a -20°C por 10 minutos. Após re-hidratação das células com PBS por 30 min, as culturas foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -III-Tubulina conjugado com CY3 (1:500 em PBS, Sigma, EUA). Para marcação da GFAP anticorpo policlonal de coelho ou monoclonal de camundongo anti-GFAP (1:500 em PBS, Boehinger, Menheim, Alemanha) e para nestina camundongo policlonal anti-nestina (1:500/PBS, Santa Cruz). Todos incubados por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação lenta, e posteriormente, após lavagem, os anticorpos secundários conjugados com isotiocianato tetrametilrodamina de caprino anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo, respectivamente (Biomakor, 1/250 em PBS, Israel) foram incubados por 30 minutos

a temperatura ambiente. Os anticorpos em excesso foram removidos realizando três lavagens com PBS durante 10 minutos, também sob agitação lenta.

A integridade da cromatina ou a fragmentação/condensação nuclear foi analisada pela coloração da cromatina das células fixadas com o corante fluorescente intercalante do DNA, Hoechst33258 (Sigma, St Louis, MO). Uma solução de Hoechst33258 foi preparada em PBS, a uma concentração final de 5 µg/mL, e deixadas em contato com as células por 10 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura. Em seguida, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus BX70) e fotografadas.

Realizamos ainda, a análise por *Time lapse microscopy* da adesão, migração e formação de esferas após 15 min e 15 h da dissociação mecânica de esferas de células TG-1 e tratamento com flavonoides rutina ou quercetina (100 µM). Para esse procedimento utilizamos microscopio Nikon Eclipse Ti.

4.2.6. Análise estatística

Os valores foram representados como a média de quatro amostras ± desvio padrão em percentual de absorbância em relação ao controle e avaliados por One Way ANOVA com pós-teste de Dunnett (GraphPad Prisma 4.0 - California, EUA). Para calcular as IC50 foi utilizado o programa Graph Prisma 4.0 – California, EUA, utilizando a seguinte fórmula: $Y = \text{bottom} + (\text{top} - \text{bottom}) / (1 + 10^{((\log EC_{50} - X) * \text{hillslope}))})$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Efeito dos flavonoides na viabilidade das linhagens tumorais

A toxicidade dos flavonoides F1 a F14 (Fig 1) para as linhagens GL-15, U-251 e TG1 foram realizadas após 72 h de tratamento com os flavonoides (1-100 µM) através do teste de MTT, que determina a viabilidade das células mensurando a função das desidrogenases mitocondriais. Calculamos a IC50 em todas as linhagens

estudadas (Tab.1) e verificamos diferença na sensibilidade aos flavonoides conforme evidenciado nas figuras 2 a 4. Observamos, nas culturas de células da linhagem GL-15, que entre os flavonoides testados apenas dois metoxilados, cirsiolol e 8-metil-cirsiolol reduziram em mais de 50% a viabilidade celular (Fig. 2) em concentrações inferiores a 100 μ M, sendo este último aquele que causou maior dano com valor de IC50 de 31,64 μ M. Dentre os flavonoides hidroxilados somente hinoquiflavona apresentou valor IC50 em torno de 100 μ M. O 8-metil-cirsiolol e o hinoquiflavona foram capazes de reduzir em mais de 50% a viabilidade celular (Fig. 2). Nas culturas de células U-251 os flavonoides, genisteína, 3-4 dihydroxyflavone, quercetina, kaempferol, 7-8 dihydroxyflavone, hinoquiflavona, e 8-metil-cirsiolol foram capazes de reduzir em mais de 50% a viabilidade celular (Fig. 3) e a hinoquiflavona foi o flavonoide mais potente com valor de IC50 de 4,02 μ M. Já nas culturas de células TG-1 os flavonoides dihydroxyflavone 3-4, chrysin, kaempferol, 7-8 dihydroxyflavone, hinoquiflavona, 8-metil-cirsiolol, cirsiolol (Fig. 4), foram os mais ativos, induzindo uma redução na viabilidade celular superior a 50%. Nessa linhagem a hinoquiflavona também foi o mais potente com valor de IC50 de 2,43 μ M.

4.3.2. Caracterização da expressão de marcadores estruturais de diferenciação nas linhagens de glioblastoma humano.

Visando caracterizar as linhagens testadas realizamos marcação imunocitoquímica para proteínas do citoesqueleto (GFAP, beta-III tubulina e nestina) nas células GL-15, U251 e TG-1 em condições controle (0,5% DMSO). A análise da morfologia e expressão destas proteínas, relacionadas a estágios de diferenciação celular, mostra que todas as linhagens mantêm a co-expressão dessas três proteínas, característica que indica células indiferenciadas (Fig.5), no entanto em níveis distintos de expressão.

Nas linhagens aderentes GL-15 e U-251 a expressão de beta-III tubulina, marcador específico de neurônios jovens, apresenta apenas distribuição perinuclear e é expressa nos processos celulares em células com fenótipo multipolar. A análise da GFAP mostrou, em condições controle, uma predominância de células GFAP positivas, com a morfologia estrelar, distribuída por todo o corpo celular e, em maior

intensidade, nos processos celulares. Nestina é um filamento intermediário de células imaturas ou em proliferação, observamos sua expressão no citoplasma dessas células. Visando comparar a expressão de marcadores estruturais na linhagem TG-1 também em condições aderentes, realizamos a supressão de SFB durante três dias, tempo necessário para formação de tapete celular e então realizamos a marcação ICQ para as proteínas do citoesqueleto. Observamos forte intensidade da fluorescência das três proteínas no citoplasma dessas células, com nestina distribuída com marcação pontilhada em todo corpo celular, GFAP com “pacotes” perinuclear e algumas células GFAP⁺, e Tubulina expressa com marcação pontilhada, porém em menor proporção que nestina.

A fim de investigar o potencial inibitório e morfogênico dos flavonoides rutina e quercetina previamente investigados na linhagem aderente humana GL-15 (Santos *et al.* dados ainda não publicado) e aderente murina C6, também determinamos o efeito destes flavonoides nas células TG-1 em esferóides (não aderentes) e em condições de aderência. A análise por *Time lapse microscopy* da adesão, migração e formação de esferas após 15 min e 15 h da dissociação mecânica dos esferóides de células TG-1 revelou que o flavonóide rutina (100 µM) inibe a migração das células e formação de esferas.

Por outro lado, este efeito não foi verificado nas culturas tratadas com quercetina (Fig. 6A). Em condições de aderência ao fim de seis dias observamos que após o tratamento com os flavonoides rutina e quercetina (100 µM) houve intensa redução de celularidade e as poucas células ainda aderentes apresentavam um fenótipo modificado bipolar expressando marcadores GFAP, beta III tubulina e nestina. Este efeito foi mais proeminente após tratamento com rutina. Este resultado indica os flavonoides alteram a viabilidade e de células tronco com potencial em induzir diferenciação celular para fenótipos neurais (Fig 6B).

| Flavonoides metoxilados | IUPAC | Estructura química |
|-----------------------------|---|--------------------|
| Acacetina | 5,7-didroxí-2-(4-metoxifenil)cromen-4-one | |
| Geraldol | 3,7-didroxí-2-(4-hidroxí-3-metoxifenil)cromen-4-one | |
| Cirsiliol | 2-(3,4-didroxifenil)-5-hidroxí-6,7-dimetoxicromen-4-one | |
| 8 metil-Cirsiliol | 8 metil-cirsilol | |
| Flavonoides hidroxilados | IUPAC | Estructura química |
| Rutina | 2-(3,4-didroxifenil)-5,7-didroxí-3-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-tridroxí-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-tridroxí-6-metiloxana-2-yl]oximetil]oxan-2-yl]oxycromen-4-one | |
| Crisina | 5,7-didroxí-2-fenilcromen-4-one | |
| 7,8-Didroxiflavona | 7,8-didroxí-2-fenilcromen-4-one | |
| 3',4'-Didroxiflavona | 2-(3,4-didroxifenil)cromen-4-one | |
| Kaempferol | 3,5,7-tridroxí-2-(4-hidroxifenil)cromen-4-one | |
| Genisteina | 5,7-didroxí-3-(4-hidroxifenil)cromen-4-one | |
| Fisetina | 2-(3,4-didroxifenil)-3,7-didroxícromen-4-one | |
| Quercetina | 2-(3,4-didroxifenil)-3,5,7-tridroxícromen-4-one | |
| Hinokiflavona | 6-[4-(5,7-didroxí-4-oxocromen-2-yl)fenoxi]-5,7-didroxí-2-(4-hidroxifenil)cromen-4-one | |

Figura 1- Estructura química de flavonoides estudiados conforme base de datos *PubChem Substance and Compound*. (CID): Acacetin (CID: 5280442), Geraldol (CID: 5482101), Cirsiliol (CID: 160237), Rutin (CID: 5280805), Crisin (CID: 5281607), 7,8-Dihydroxyflavone (CID: 1880), 3',4'-Dihydroxyflavone (CID: 145726), Kaempferol (CID: 5280863), Genistein (CID: 5280961), Fisetin (CID: 5281614), Quercetin (CID: 5280343), Hinokiflavone (CID: 5281627).

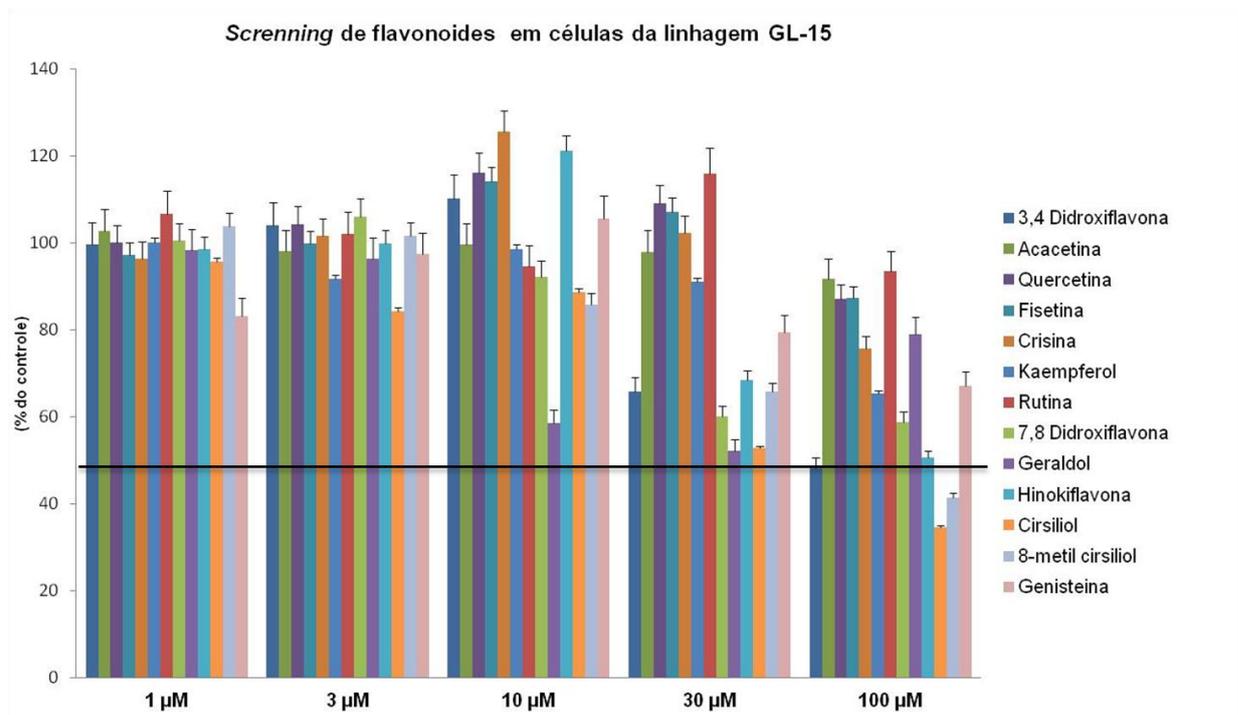


Figura 2) Efeitos de diferentes flavonoides em concentrações crescentes (1-100µM) sobre a viabilidade de células de glioblastoma humano da linhagem GL-15, após 72h de tratamento. As células em condição controle foram tratadas com DMSO 0,5%, veiculo de diluição para os flavonoides. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao controle, considerado com 100%. Esses dados sugerem os flavonoides crisiliol e 8-metil crisiliol como os mais potentes.

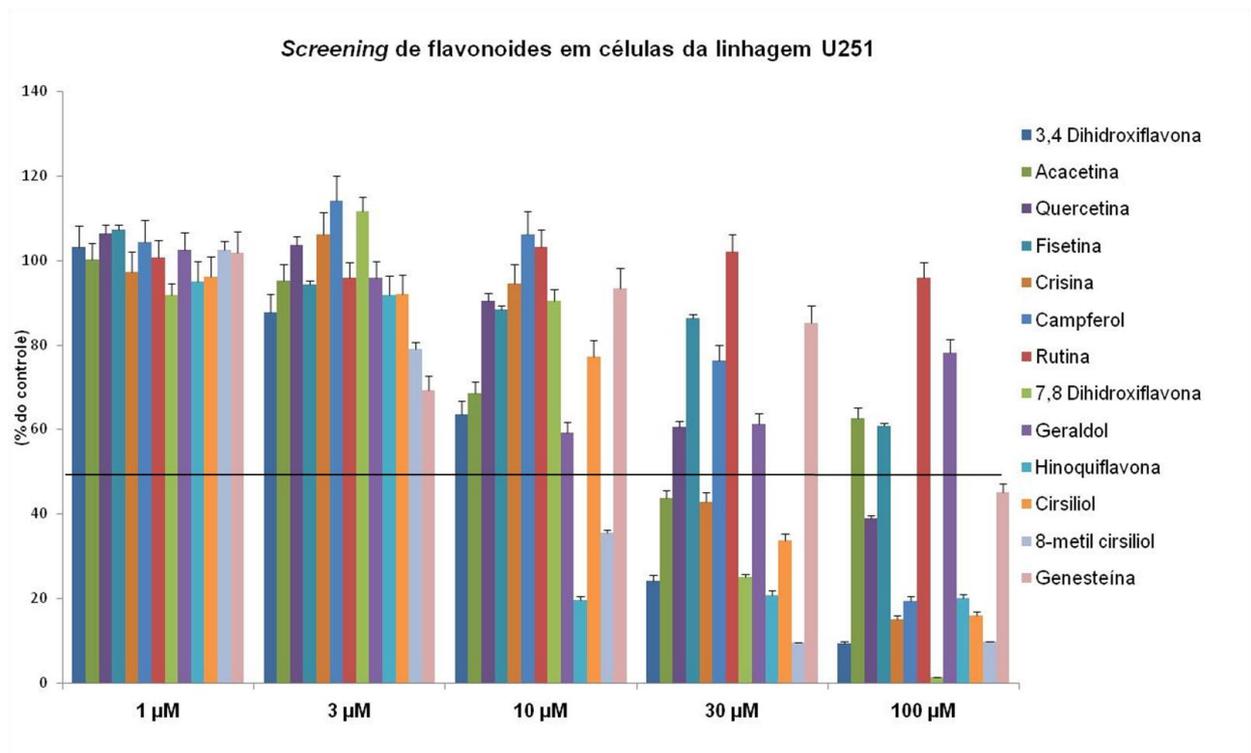


Figura 3) Efeitos de diferentes flavonoides em concentrações crescentes (1-100µM) sobre a viabilidade de células de glioblastoma humano da linhagem U251, após 72h de tratamento. As células em condição controle foram tratadas com DMSO 0,5%, veiculo de diluição para os flavonoides. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao controle, considerado com 100%. Esses dados sugerem os flavonoides acacetina, fisetina, rutina e geraldol como menos potentes.

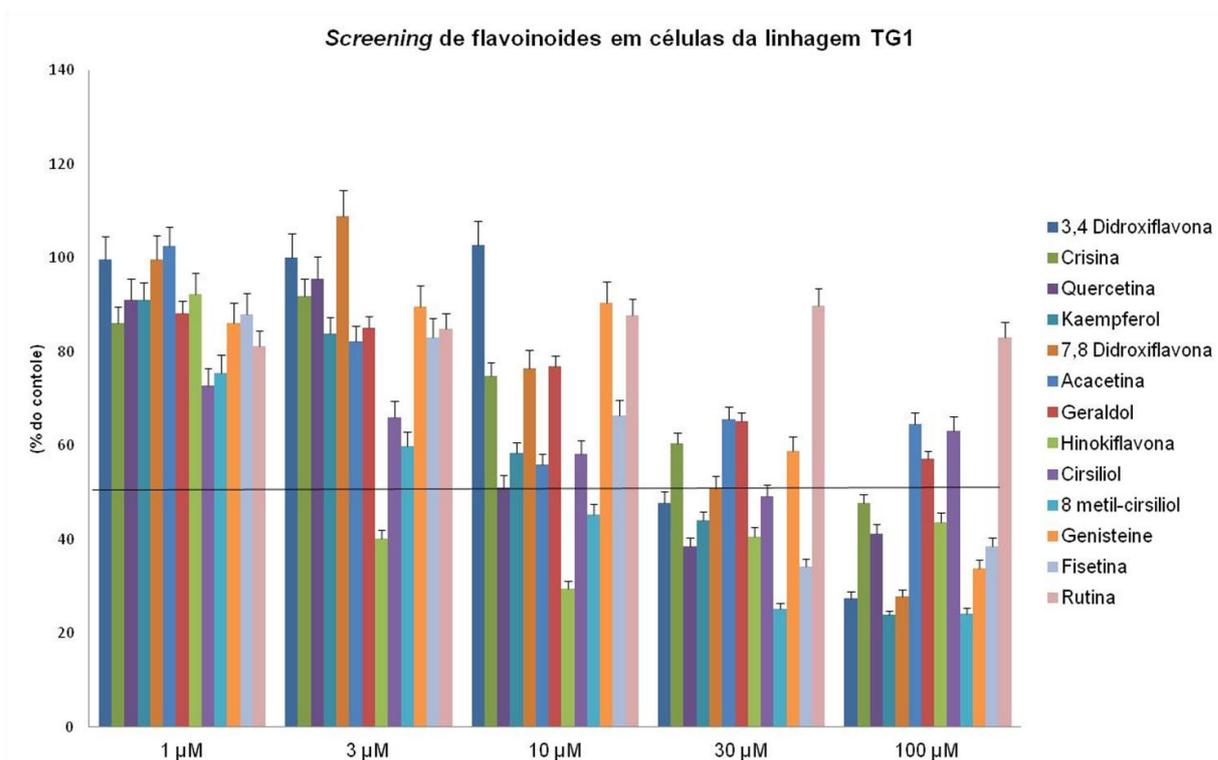


Figura 4) Efeitos de diferentes flavonoides em concentrações crescentes (1-100µM) sobre a viabilidade de células de glioblastoma humano da linhagem TG1, após 72h de tratamento. As células em condição controle foram tratadas com DMSO 0,5%, veículo de diluição para os flavonoides. Os resultados foram expressos em percentual em relação ao controle, considerado com 100%. Esses dados sugerem os flavonoides acacetina, geraldol, crisiliol e rutina como os menos potentes.

| Flavonoides hidroxilados | IC50(μM) TG1 | IC50(μM) U251 | IC50(μM) GL-15 |
|---------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Genisteina | 31,73 | 90,28 | * |
| 3',4'Didroxiflavona | 29,8 | 13,94 | * |
| Crisina | 75,01 | 26,76 | * |
| Quercetina | 10,01 | 45,76 | * |
| Kaempferol | 19,15 | 38,20 | * |
| 7,8-Didroxiflavona | 28,34 | 20,71 | * |
| Hinokiflavone | 2,43 | 4,02 | * |
| Fisetina | 10,78 | * | * |
| Rutina | * | * | * |

| Flavonoides metoxilados | IC50(μM) TG1 | IC50(μM) U251 | IC50(μM) GL-15 |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| 8-metil-cirsiliol | 6,61 | 6,36 | 31,64 |
| Geraldol | * | * | * |
| Cirsiliol | * | 19,41 | 31,68 |
| Acacetina | * | * | * |

Tabela 1 - Cálculo da IC50 de flavonoides hidroxilados e metoxilados em culturas de células tumorais das linhagens TG1, U251 e GL-15. (*) indica a impossibilidade de calcular a IC50. Verificamos que o flavonoide hidroxilado hinoquiflavona apresentou o menor valor da IC50. Entre os metoxilados o 8-metil-cirsiliol foi aquele que causou maior redução na IC50.

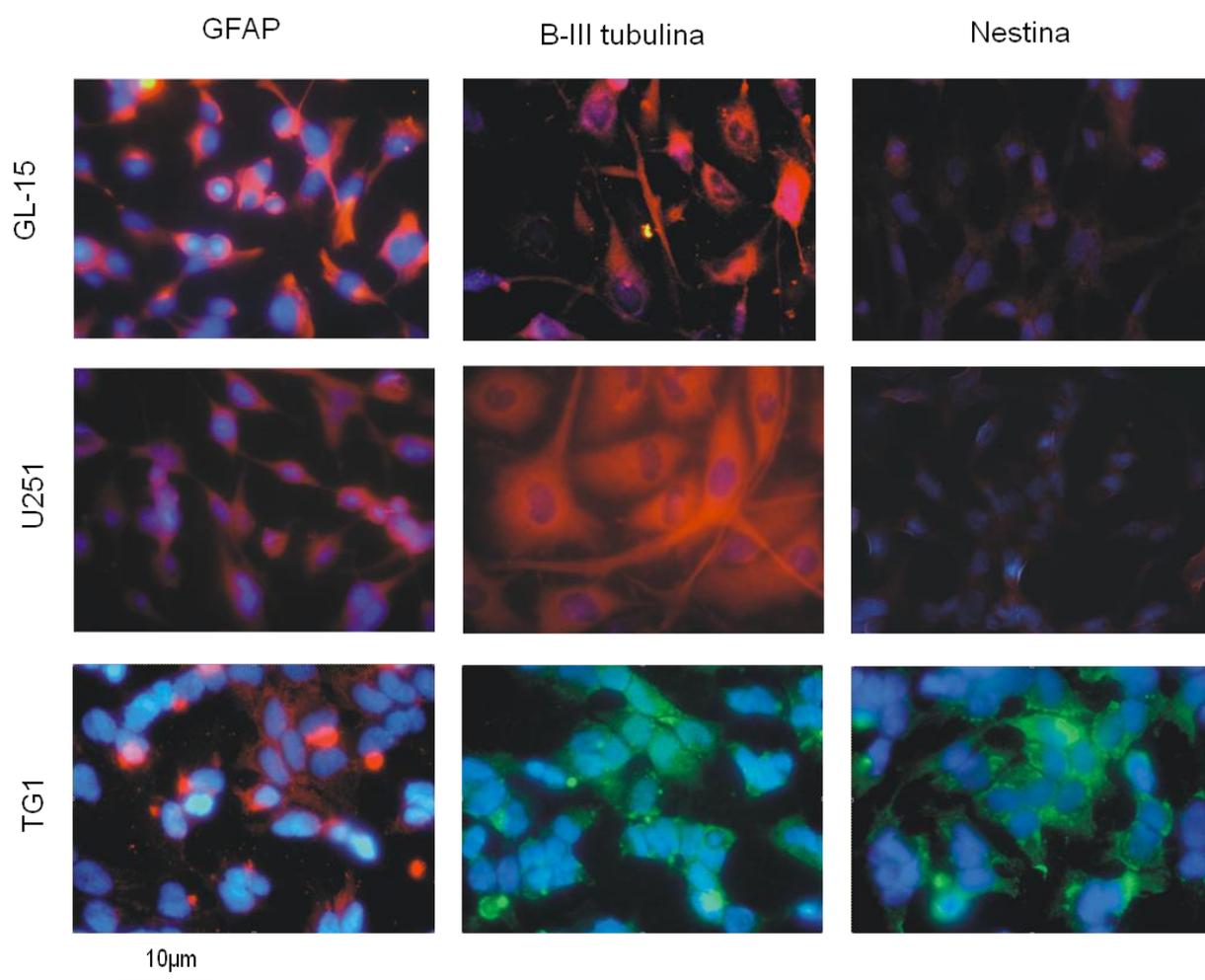


Figura 5 - Imonocitoquímica (ICQ) das proteínas do citoesqueleto nestina, GFAP e beta III tubulina em células da linhagem GL-15 e U251 ainda, análise da cromatina celular pela coloração com DAPI após tratamento com DMSO 0,5%.

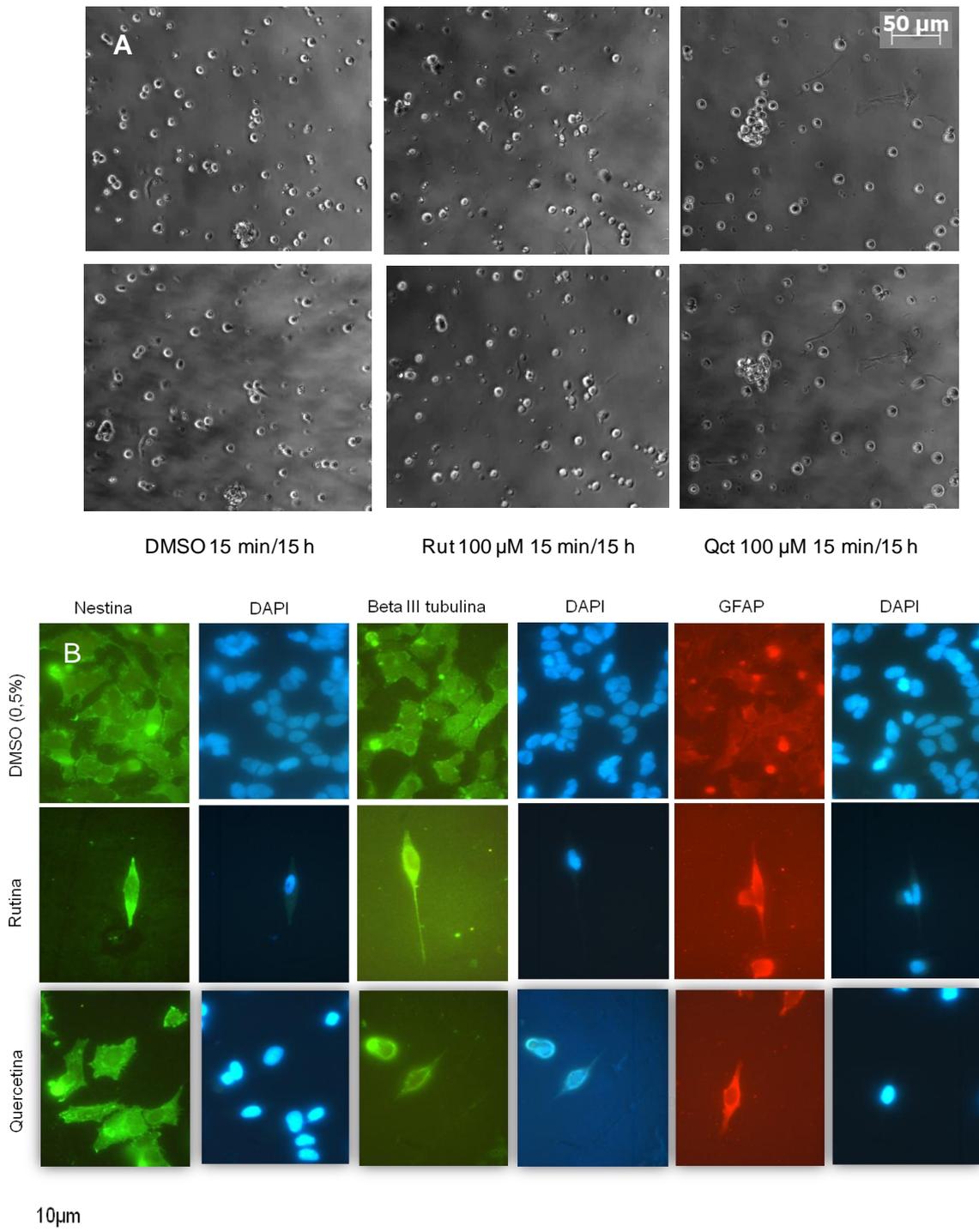


Figura 6 – (A) Análise por *Time lapse microscopy* da adesão, migração e formação de esferas após 15 min e 15 h da dissociação mecânica de esferas de células TG-1 e tratamento com flavonoides rutina ou quercetina (100 μM). (B) Imunocitoquímica (ICQ) das proteínas do citoesqueleto GFAP, beta III tubulina e nestina em células tronco tumoral da linhagem TG1 e análise da cromatina celular pela coloração com Hoechst 33258 após tratamento com rutina e quercetina (100 μM) por 6 dias. Controle DMSO 0,5%.

4.4. DISCUSSÃO

Flavonoides são conhecidos como excelentes antioxidantes, além de apresentarem atividade antitumoral. Aqueles presentes em vinhos tintos, dentre eles a quercetina, têm sido associados à saúde cardiovascular devido, provavelmente, ao seu efeito antioxidativo. Patologistas apóiam esta afirmativa por observarem, em dissecações, as boas condições das paredes vasculares (homogêneas e livres de aterosclerose) de indivíduos que consumiram regularmente essa bebida (citações em Havsteen, 2002). Flavonoides têm se apresentado como preventivos de peroxidação lipídica, removedores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Zielińska *et al.*, 2003). Estudo feito por Rodrigues, Diniz e Faine (2003) demonstrou os efeitos benéficos da rutina com a elevação do colesterol HDL e diminuição dos fatores de risco para a arteriosclerose e doença cardiovascular, mostrando que a atividade antioxidante da rutina está relacionada à destruição do radical superóxido. Ainda, MERCER *et al.* (2005) demonstraram que polifenóis naturais apresentam potente ação neuroprotetora para neurônios dopaminérgicos em cultura. No entanto, apesar da importância dessa categoria de composto, muito pouco se sabe sobre o potencial antitumoral de flavonóides em células do SNC.

Atividades anti-cancer de flavonoides já foram descritas. Ação antiproliferativa de 7,8-Dihydroxyflavone em linhagem de câncer de mama (Pouget *et al.*, 2001), inibição da proliferação celular e angiogênese *in vitro* pelos flavonoides 3',4' e Dihydroxyflavone e fisetina (Fotsis *et al.*, 1997) e na redução da atividade mitótica das células tumorais tratadas com geraldol (Riffell *et al.*, 2009). O flavonoide kaempferol foi identificado como indutor de apoptose em células de glioma (Sharma *et al.* 2007, Siegelin *et al.*, 2008) e na proteção contra o câncer de estômago (Garcia-Close *et al.*, 1999) além de reduzir a proliferação em meduloblastoma (Labbe *et al.*, 2009).

Segundo Kuntz *et al.* (1999) não ha nenhuma relação estrita entre atividade biológica e estrutura dos flavonoides. No entanto, verificamos que dentre os flavonoides testados nesse trabalho, os que alcançaram maior redução da viabilidade celular na linhagem GL15 foram cirsilol e 8-metil-crisilol, que apresentam mais de uma metoxilação (presença do grupamento metoxila – OCH₃). Já nas linhagens U251 e TG1 a hinoquiflavona, um bi-flavonoide poli-hidroxilado, causou

maior redução na viabilidade, igualmente observado em células GL-15 em concentração entre 30 e 100 μM . No entanto, sabemos que o grau de lipossolubilidade facilita a passagem de compostos pela membrana plasmática, e no caso da linhagem GL-15 este pode ter sido um fator determinante para sensibilidade farmacológica. Por outro lado, a quantidade e o posicionamento de grupos hidroxila têm sido associados à atividade biológica de flavonoides. A formação de pontes de hidrogênio entre esses flavonoides e os grupos polares da membrana celular, determina em parte, a capacidade destes compostos em interagir com componentes da membrana citoplasmática. Com isso, estrutura tridimensional dos flavonoides associados com os grupos hidroxila determina a formação dessas pontes de hidrogênio (Oteiza, 2005).

Os métodos principais para a terapia do glioblastoma consistem em radioterapia e quimioterapia com nitrosureias e mais recentemente tem sido sugerida a incorporação da temozolamida (TMZ) (Stupp, 2005). TMZ é um antineoplásico que pertence à classe dos agentes alquilantes. Eles são classificados dessa maneira porque têm a capacidade de adicionar grupos alquilo em regiões eletronegativas do DNA, capazes de causar a senescência e apoptose nestas células tumorais (Furnari, 2007). No entanto, as células tumorais podem tornar-se resistentes ao TMZ, uma vez que, poderão existir mudanças na capacidade de reparo do DNA (Zhang, 2010). Verificamos em um estudo dose-resposta que a linhagem GL-15, a mais resistente aos flavonoides neste estudo, também apresenta resistência à TMZ, com concentrações inibitórias superiores a 1 mM (dado não publicado). Já está descrito na literatura que o principal fator da resistência tumoral aos quimioterápicos, inclusive à TMZ, é dado pela existência das células tronco tumoral (Chekenya *et al.*, 2008, Johannessen *et al.*, 2009). Recentemente caracterizamos a presença de subpopulações de células tronco na linhagem GL-15 através da expressão de marcador CD133 (dado não publicado). Este fato pode explicar a maior resistência aos flavonoides testados quando comparado às demais linhagens. Por outro lado, neste e em outros estudos verificamos que os flavonoides polihidroxilado rutina e quercetina, são pouco citotóxicos, porém inibem a proliferação induzem importante mudança no fenótipo desta linhagem (SANTOS *et al.*, 2011)

Outra abordagem para terapia indica o estímulo da diferenciação dessas células tronco como já descrito por Qiang (2009). Células CD133 positivas foram capazes de diferenciar em neurônios e células da glia, detectado através da expressão de beta III tubulina e GFAP, respectivamente. Ainda, Zhang (2011) diz que a co-expressão dessas duas proteínas indica a presença de células neurais indiferenciadas. Portanto, neste estudo caracterizamos as linhagens de células tumorais do glioblastoma humano quanto à expressão destes dois marcadores estruturais de diferenciação, além da proteína nestina, marcador células precursoras neurais. Evidenciamos que as células tumorais da linhagem GL15 e U251, são capazes de expressar essas proteínas, porém com diferentes perfis de expressão, o que pode estar relacionado com a sensibilidade aos flavonoides testados. Ainda, em especial após tratamento com flavonoide rutina, as células tronco da linhagem TG1, apresentaram uma morfologia bipolar ou radial, similar a precursor neural, sendo encontradas nas culturas células positivas para marcadores nestina, GFAP e B-tubulina III. Este achado corrobora com a hipótese do flavonoide rutina como potente agente morfogênico em células derivadas de tumores cerebrais malignos.

Acreditamos que o sucesso da terapia para o glioblastoma depende de moléculas que atuem destruindo as células não tronco, mas enfatizamos a importância do foco nas pesquisas que visem às células tronco do tumor, desta forma, concordamos com Heddleston (2009), que afirma que as células tronco tumoral são capazes de determinar a agressividade do câncer. Esse trabalho realizou uma triagem para identificar flavonoides com potencial terapêutico para o glioblastoma, e demonstrou que a variabilidade estrutural pode estar relacionada com a atividade biológica e, em função dessa conformação química direcionar as células de glioblastoma para vias de morte, relacionada à citotoxicidade, ou vias de diferenciação.

4.5. REREFÊNCIAS

Altaner C. Glioblastoma and stem cells. **Neoplasma**. Volume 55, No. 5: 369-374. 2008

B.L. Santos, A.R. Silva, B.P.S. Pitanga, C.S. Sousa, M.S. Grangeiro, B.O. Fragomeni, P.L.C. Coelho, M.N. Oliveira, N.J. Menezes-Filho, M.F.D. Costa, R.S. El-Bachá, E.S. Velozo, G.P. Sampaio, S.M. Freire, M. Tardy, S.L. Costa. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry** 127 404–411. 2011

Bao, S.; Wu, Q.; Sathornsumetee, S.; Hao, Y.; Li, Z.; Hjelmeland, A.B.; Shi, Q.; McLendon, R.E.; Bigner, D.D.; Rich, J.N. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. **Cancer Res.**, 66, 7843-7848. 2006.

Brasileiro Filho, G & Bogliolo, L. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994

Chekenya, M., Krakstad, C., Svendsen, A., Netland, I. A., Staalesen, V., Tysnes, B. B., Selheim, F., Wang, J., Sakariassen, P. O., Sandal, T., Lonning, P. E., Flatmark, T., Enger, P. O., Bjerkvig, R., Sioud, M., & Stallcup, W. B. The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. **Oncogene**. Vol. 27, No. 39, pp. 5182-5194. 2008

Cheng L, Bao S, Rich J N. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. **Biochemical Pharmacology** 80 654–665. 2010

Contran, RS; Kuman, V; Collins, T. **Patologia estrutural e funcional**. Sexta edição. Guanabara Koogan. 233-1201. 2000.

Costa SL, Planchenault T, Charrière-Bertrand C, *et al.* Astroglial permissivity for neurotic outgrowth in neuronastrocyte cocultures depends on regulation of lamini bioavailability. **Glia**; 37:105–13. 2002

Fotsis, T., Pepper, M. S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., Schweigerer, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Cancer Res**, v. 57, p. 2916- 2921. 1997

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev.** ;21:2683–10. 2007

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De, V. S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., & Vescovi, A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. **Cancer Res**. Vol. 64, No. 19, pp. 7011-702. 2004.

Garcia-Closas, R.; Gonzalez, C.A.; Agudo, A.; Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. **Cancer Causes and Control**, v. 10, p. 71-75. 1999.

Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. **Cell Cycle**. Vol. 8, No. 20, pp. 2009.

Johannessen, T. C., Wang, J., Skaftnesmo, K. O., Sakariassen, P. O., Enger, P. O., Petersen, K., Oyan, A. M., Kalland, K. H., Bjerkvig, R., & Tysnes, B. B. Highly infiltrative brain tumours show reduced chemosensitivity associated with a stem cell-like phenotype. **Neuropathol.Appl.Neurobiol**. Vol. 35, No. 4, pp. 380-393. 2009.

Kelly P, Dakic A, Adams J, *et al.* Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. **Science**, 317, 337. 2007.

Labbe, D.; Provencal, M.; Lamy, S.; Boivin, D.; Gingras, D.; Beliveau, R. The flavonols quercetin, kaempferol, and myricetin inhibit hepatocyte growth factor-induced medulloblastoma cell migration. **J Nutr**, v. 139, p. 646-652. 2009.

Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39. 2008.

Oteiza P I., Erlejman A G., Verstraeten S V., Keen C L., Fraga CG. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? **Clinical & Developmental Immunology**,12(1): 19–25. 2005.

Patru C, Romaou L, Philipe C, Varlet P, Coulombel L, Raponi P, Cadessu J, Renault F, Leonard N, Berhneim A, Mihalescu-Maingot, Thirant C, Costa SL, Moura-Neto V, Doumas-Duport C, Junier MP, Haiech J, Chneiweiss H. Characterization of tumor initiating cells from human malignant glio-neuronal tumors and their regulation by multiple gpcrs. (Manuscrito em preparação).

Porto, CC. **Semiologia medica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001

Pouget, C.; Lauthier, F.; Simon, A.; Fagnere, C.; Basly, J.P.; Delage, C.; Chulia, A.J. Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 3095-3097. 2001.

Qiang L; Yang Y; Ma Yan-Jun; Chen Fei-Hong; Zhang Ling-Bo; Wei Liu, Qi Qi Na Lu; Lei Tao; Xiao-Tang Wang; Qi-Dong You; Qing-Long Guo. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. **Cancer Letters**, Volume 279, Issue 1, 28, Pages 13–21. 2009.

Radhakrishnan, K., B. Mokri, J. E. Parisi, W. M. O'Fallon, J. Sunku, and L. T. Kurland. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. **Ann. Neurol.** 37: 67–73. 1995.

Riffell, J.L.; Zimmerman, C.; Khong, A.; Mchardy, L.M.; Roberge, M. Effects of chemical manipulation of mitotic arrest and slippage on cancer cell survival and proliferation. **Cell Cycle**, n. 18, v. 8, p. 3025-38. 2009.

Santos B.L.; Silva A.R., Pitanga B.P.S; Sousa C.S; Grangeiro M.S; Fragomeni B.O; Coelho P.L.C; Oliveira M.N; Menezes-Filho N.J; Costa M.F.D; El-Bachá R.S; Velozo E.S; G.P. Sampaio S.M. Freire ; M. Tardy; S.L. Costa. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry** 127.404–411. 2001.

Sharma, V.; Joseph, C.; Ghosh, S.; Agarwal, A.; Mishra, M.K.; Sem, E .Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. **Mol Cancer Ther**, n. 9, v. 6, p. 2544-53. 2007.

Siegelin, M.D.; Reuss, D.E.; Habel, A.; Herold-Mende, C.; Von Deimling, A. The flavonoid kaempferol sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by proteasomal degradation of surviving. **Mol Cancer Ther**, n. 11, v. 7, p. 3566-74. 2008.

Stupp R. Mason W. van den Bent M.J. Weller M. Fisher B. Taphoorn M.J. Belanger K. Brandes A.A. Marosi C. Bogdahn U. Curschmann J. Janzer R.C. Ludwin S.K. Gorlia T. Allgeier A. Lacombe D. Cairncross J.G. Eisenhauer E. Mirimanoff R.O. European Organisation for Research Treatment of Cancer Brain Tumor Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N. Engl. J. Med.** ;352:987–996. 2005.

Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, Daumas-Duport C. New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. **Neurosurgery**. 55(6):1377-91. 2004.

Wang, T.T.Y.; Sathyamoorthy, N.; Phang, J.M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. **Carcinogenesis**, n. 2, v. 17, p. 271-275. 1996.

Zhang, J., M. F. Stevens, C. A. Laughton, *et al.* Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. **Oncology**. vol. 78, no. 2, pp. 103-114. 2010.

Zhang, P B; Li W S; Gao, M; Li, L; Wang, N; Lei, S. Culture and identification of neural stem cells from mouse embryos. **Chin J Contemp Pediatr**, 13 (3): 244-247. 2011.

5. CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo determinamos o efeito de flavonoides sobre a viabilidade de linhagem de células tumorais e caracterizamos essas linhagens de acordo com sua morfologia e padrão de expressão de proteínas. Aprofundamos nossos estudos em dois flavonoides, rutina e quercetina, em função da resposta imunológica já observada em outros trabalhos do nosso grupo.

Esses flavonoides mostraram capacidade para modulação da resposta imunológica, uma vez que induziu ativação microglial e liberação de citocinas inflamatórias. Associado a isso, verificamos redução da proteína STAT3 e NFkB em linhagens tumorais murino que além do envolvimento com resposta imunológica, também apresentam relação com ativação de proteína pró-apoptótica. A análise ultraestrutura revelou à interação física microglia/glioma, evidenciando que a rutina induz da formação da figura de mielina em células tumorais e vacuolização. Com isso, sugerimos que a microglia pode estar induzindo o processo de autofagia nas células C6, processo também verificado nestas células tratadas isoladamente com o flavonoide. Ainda, a viabilidade da microglia não foi afetada quando tratadas com rutina, mas verificamos redução significativa nessa viabilidade em células tumorais. Observamos também, corpos fagocíticos em microglia, característica que indica o flavonoide rutina como catalizador da ativação microglial e potencializador da sua função fagocítica.

Todos os resultados encontrados levam a confirmação da nossa hipótese inicial, que sustenta a capacidade de flavonoides em modular a resposta imunológica. A relação microglia/glioma ainda é muito pouca conhecida, mas neste estudo conseguimos desvendar parte dessa relação que, sob ação de flavonoides, é modulada favorecendo a função imune da microglia contra células de glioma.

Com isso, mais estudos são necessários para melhor esclarecer essa relação. Sugerimos, ainda, esses flavonoides como moléculas importantes e promissoras para o tratamento do glioblastoma, haja vista, sua capacidade citotóxica para linhagem do glioblastoma Humano e habilidade para estimular a resposta imunológica de forma controlada sem interferir na função fisiológica da microglia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL Monsen, MN; Kuhnle, G; Rechner, AR; Schoeter, H; Rose, S; Jenner, P; Rice-evans, CA. Uptake and matabolism of epicatechin and its acess to the brain after oral ingestion. **Free Radic. Biol. Med.** 33:1693-702. 2002.

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. **Expert Opin Investig Drugs.** 18:1061– 1083. 2009.

Aihara M, Ishii S, Kume K & Shimizu T. Interaction between neurone and microglia mediated by platelet-activating factor. **Genes to Cells,** 5: 397-406. 2000.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 100:3983. 2003.

Almeida Gn, (2005). Efeitos Dos Extratos Aquoso E Metanólico De Prosopis Juliflora (Sw) D.C. Sobre Culturas De Larvas De Nematódeos Gastrintestinais De Caprinos. Monografia, Universidade Federal Da Bahia. Escola De Medicina Veterinária.

Altaner C. Glioblastoma and stem cells. **Neoplasma.** Volume 55, No. 5: 369-374. 2008.

Alvarez-Maubecin, V. García-Hernández, F. Williams, J. T & Van Bockstaele, E. J. Functional coupling between neurons and glia. **Journal of Neuroscience,**; 20: 4091-4098. 2000.

Arudchelvan Y, Tokuda N, Adachi Y. Ultrastructural alterations of the cortical epithelial cells of the irradiated and recovering rat thymus. **Arch Histol Cytol:** 68(3):205-12. 2005.

Bao, S; Qiulian Wu; Roger E; McLendon; Yueling Hao; Qing Shi; Jeremy N. Rich. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature** 444, 756– 760. 2006.

Bao, S.; Wu, Q.; Sathornsumetee, S.; Hao, Y.; Li, Z.; Hjelmeland, A.B.; Shi, Q.; McLendon, R.E.; Bigner, D.D.; Rich, J.N. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. **Cancer Res.**, 66, 7843-7848. 2006.

Badie, B., and J. Schartner . Role of microglia in glioma biology. **Microsc. Res. Tech.** 54: 106–113. 2001.

Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L. W. Sweet differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, 161 PP. 370–371. 1968.

Blattman, J. N. & Greenberg, P. D .Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. **Science** 305, 200–205. 2004.

Brasileiro Filho, G & Bogliolo, L. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994

Brian T. Kawasaki and William L. Farrar. Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion. **Trends in Immunology**, Volume 29, Issue 10, 464-468, 1. 2008

Campos-Sasaki (2007) efeito do flavonoide casticina, extraído de croton betulaster, no controle da morfogênese neuronal. [dissertação de mestrado] Programa de pós-graduação em ciências morfológicas ufrj, 104 p.

Castigli, E.; Sciacaluga, M.; Schiavoni, G.; Brozzi, F.; Fabiani, R.; Gorello, P.; Gianfranceschi, G.L. GL15 and U251 glioblastoma-derived human cell lines are peculiarly susceptible to induction of mitotic death by very low concentrations of okadaic acid. **Oncology Reports**, v.15, p. 463-470. 2006

Chamak, B., Morandi, V., Mallat, M. Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. **J Neurosci Res** 38, 221-33. 1994.

Chekenya, M., Krakstad, C., Svendsen, A., Netland, I. A., Staalesen, V., Tysnes, B. B., Selheim, F., Wang, J., Sakariassen, P. O., Sandal, T., Lonning, P. E., Flatmark, T., Enger, P. O., Bjerkvig, R., Sioud, M., & Stallcup, W. B. The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. **Oncogene**. Vol. 27, No. 39, pp. 5182-5194. 2008.

Chen, J.C., Ho, F.M., Pei-Dawn Lee, C., Chen, C.P., Jeng, K.C., Hsu, H.B., Lee, S.T., Wen Tung, W., Lin, W.W. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I kappa B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2microglia. **Eur. J. Pharmacol.** 521, 9–20. 2005.

Cheng L, Bao S, Rich J N. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. **Biochemical Pharmacology** 80 654–665. 2010.

Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. **Semin Cancer Biol.** 2011.

Contran, RS; Kuman, V; Collins, T. Patologia estrutural e funcional. Sexta edição. **Guanabara Koogan.** 233-1201. 2000.

Costa SL, Planchenault T, Charrière-Bertrand C, *et al.* Astroglial permissivity for neurotic outgrowth in neuronastrocyte cocultures depends on regulation of lamini bioavailability. **Glia**; 37:105–13. 2002.

Corrêa A. D., Siqueira-Batista R. & Quintas L.E. Plantas Mediciniais. Do Cultivo À Terapêutica. 4 **Ed. Vozes:** Rio De Janeiro, 264 p. 2001.

Curran CS, Bertics PJ. Eosinophils in glioblastoma biology. **J Neuroinflammation.** 17;9(1):11. 2012.

Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de CL. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. **J Clin Oncol**, 26:4410-4417. 2008.

Dobbertin A, Schmid P, Gelman M, Glowinski J & Mallat M. Neurons promote macrophage proliferation by producing transforming growth factor- β 2. **Journal of Neuroscience**, 17: 5305-5315. 1997.

Dolman CL. Microglia. In: Davis RL, Robertson DM (eds) **Textbook of neuropathology**. Williams and Wilkins, Baltimore. 1991.

Ehrnhoefer, D.E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., Wanker, E.E. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. **Nature structural & molecular biology**, 15(6), 558-566. 2008.

Florian R. Greten; Christoph K. Weber; Tim F. Greten; Günter Schneider; Martin Wagner; Guido Adler; Roland M. Schmid. Stat3 and NF- κ B activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. **Gastroenterology**. 123(6):2052-63. 2002.

Flugel A, Labeur MS, Grasbon-Frodl EM, Kreutzberg GW, Graeber MB. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. **Int J Dev Neurosci** 17:547–556. 1999.

Fotsis, T., Pepper, M. S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., Schweigerer, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Cancer Res**, v. 57, p. 2916- 2921. 1997.

Friesenecker, B.; Tsai, A.G.; Intaglietta, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **Int J Microcirc Clin**. v.15, p.17-21. 1995.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev.** ;21:2683–10. 2007.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev.** 21:2683–2710. 2007.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De, V. S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., & Vescovi, A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. **Cancer Res.** Vol. 64, No. 19, pp. 7011-7021. 2004.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, 313:1960-196. 2006.

Garcia-Closas, R.; Gonzalez, C.A.; Agudo, A.; Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. **Cancer Causes and Control**, v. 10, p. 71-75. 1999.

Garcia-Abreu, J. Moura Neto, V. Carvalho, S. L & Cavalcante, L. A. Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. **Journal of Neuroscience Research.** 40: 417-477. 1995.

Germano, I.; Swiss, V.; Casaccia, P. Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells: Where is the link? **Neuropharmacology**, v. 58, n. 6, p. 903-910. 2010.

Geng J, Strobel H.W. Expression, induction and regulation of the cytochrome P450 monooxygenase system in the rat glioma C6 cell line. **Brain Res.** 16; 784 (1-2):276-83. 1998.

Gilles J. Guillemin and Bruce J. Brew. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. **Journal of Leukocyte Biology** v. 75. 2004.

Giulian, D., Leara, J., Li, J. and Keenen, C. Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. **Neurochem. Int.**; 25:227-232. 1994.

Graeber MB, Streit WJ. Microglia: immune network in the CNS. **Brain Pathol** 1:2–5. 1990.

Groves MD, Paduvalli VK, Hess KR. Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. **J Clin Oncol** 20:1383–1388. 2002.

Gomes, F.C.A., Spohr, T.C.L.S., Martinez, R. e Moura Neto V. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. **Braz J Med Biol Res** 34(5). 611 – 620. 2001.

Gomes, F.C., Garcia-Abreu, J., Galou, M., Paulin, D., Moura Neto, V. Neurons induce GFAP gene promoter of cultured astrocytes from transgenic mice. **Glia.** 26, 97-108. 1999

Harborne, J.B.; Grayer, R.J. The anthocyanins. In: The flavonoids: advances in research since. **Chapman & Hall**, London, 1988, p. 1-20. 1980.

Hao, A.J; Dheen, S.T; Ling, E.A . Expression of macrophage colony-stimulating factor and its receptor in microglia activation is linked to teratogen-induced neuronal damage. **Neuroscience.** 112: 889-900 2002.

Harder, D.R; Zhang, C. Gebremedhin, D. Astrocytes Function in Matching Blood Flow to Metabolic Activity. **News in Physiological Sciences** Vol. 17, No. 1, 27-31. 2002.

Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. **Cell Cycle**. Vol. 8, No. 20, pp. 2009.

Holland E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nature Reviews**. 2001.

Hua Yu, Marcin Kortylewski and Drew Pardoll. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nature reviews Immunology**. V.7. 2007.

Hussain, S. F., D. Yang, D. Suki, E. Grimm, and A. B. Heimberger. Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. **J. Transl.Med.** 4: 15. 2006.

Hussain, S. F., D. Yang, D. Suki, K. Aldape, E. Grimm, and A. B. Heimberger. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. **Neuro Oncol.** 8: 261–279. 2006.

Hussain, S. F., L. Y. Kong, J. Jordan, C. Conrad, T. Madden, I. Fokt, W. Priebe, and A. B. Heimberger. A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. **Cancer Res.** 67: 9630–9636. 2007.

Hussain, S. F., L. Y. Kong, J. Jordan, C. Conrad, T. Madden, I. Fokt, W. Priebe, and A. B. Heimberger. A novel small molecule inhibitor of signal transducers and activators of transcription 3 reverses immune tolerance in malignant glioma patients. **Cancer Res.** 67: 9630–9636. 2007.

Iwamaru, A., S. Szymanski, E. Iwado, H. Aoki, T. Yokoyama, I. Fokt, K. Hess, C. Conrad, T. Madden, R. Sawaya, *et al.* A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. **Oncogene** 26: 2435–2444. 2007.

Janbaz KH, Saeed AS, Gilani AH. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl4-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**;73:557–63. 2002.

Johannessen, T. C., Wang, J., Skaftnesmo, K. O., Sakariassen, P. O., Enger, P. O., Petersen, K., Oyan, A. M., Kalland, K. H., Bjerkvig, R., & Tysnes, B. B. Highly infiltrative brain tumours show reduced chemosensitivity associated with a stem cell-like phenotype. **Neuropathol.Appl.Neurobiol.** Vol. 35, No. 4, pp. 380-393. 2009.

Kaur, C., Hao, A. J., Wu, C. H., Ling, E. A. Origin of microglia. **Microsc. Res. Tech.** 54, 2–9. 2001.

Kelly P, Dakic A, Adams J, *et al.* Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. **Science**, 317, 337. 2007.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ** 12 (Suppl 2):1463– 1467. 2005.

Labbe, D.; Provencal, M.; Lamy, S.; Boivin, D.; Gingras, D.; Beliveau, R .The flavonols quercetin, kaempferol, and myricetin inhibit hepatocyte growth factorinduced medulloblastoma cell migration. **J Nutr**, v. 139, p. 646-652. 2009.

Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH. Epigeneticmediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. **Cancer Cell** 13:69–80. 2008.

Lima, F.R., Gervais, A., Colin, C., Izembart, M., Neto, V.M., Mallat, M. Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. **J Neurosci.** 21, 2028-38. 2001.

Lima, F.R., Arantes, C.P., Muras, A.G., Nomizo, R., Brentani, R.R., Martins, V.R. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem.** 103, 2164-76. 2007.

Louis D.N.; Ohgaki H.; Wiestler O.D.; Cavenee W.K. (Eds.). WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **IARC**: Lyon. 2007.

Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39. 2008.

Majid S, Kikuno N, Nelles J, Noonan E, Tanaka Y, Kawamoto K, Hirata H, Li Lc, Zhao H, Okino St, Place Rf, Pookot D, Dahiya R. Genistein Induces The P21waf1/Cip1 And P16ink4a Tumor Suppressor Genes In Prostate Cancer Cells By Epigenetic Mechanisms Involving Active Chromatin Modification. **Cancer Res.** 68(8):2736-44. 2008.

Marcos Paulo Thomé; Eduardo Cremonese Filippi Chiela; Guido Lenz . Vincristina induz apoptose, parada no ciclo celular e autofagia em células de gliomas. Salão de Iniciação Científica (2011. UFRGS, Porto Alegre, RS). Resumo publicado em evento.

Maria Libera Ascierto, Valeria De Giorgi, Qiuzhen Liu, Davide Bedognetti, Tara L Spivey, Daniela Murtas, Lorenzo Uccellini, Ben D Ayotte, David F Stroncek, Lotfi Chouchane, Masoud H Manjili, Ena Wang and Francesco M Marincol. An immunologic portrait of cancer Ascierto *et al.* **Journal of Translational Medicine**, 9:14. 2011.

Mercer, Ld; Kelly, Bl; Horne, MK; Beart, PM. Dietary Polyphenols Protect Dopamine Neurons From Oxidative Insults And Apoptosis: Investigations In Primary Rat Mesencephalic Cultures. **Biochem Pharmacol.** 69 : 339-45. 2005.

Mutoh, M. Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima HY, *et al.* Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Jpn J Cancer Res.** v.91, p.686–91. 2000.

Murai, KK, van Meyel, D.J. Neuron-glia communication at synapses: insights from vertebrates and invertebrates. **The Neuroscientist.** 13(6):657-666. 2007.

Ohgaki, H.; Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology.** v. 170, n. 5, p. 1445-1453. 2007.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. **Nat Rev Cancer** 4:592–603. 2004.

Ogura H; Yasuda M., Nakamura S., Yamashita H., Mikoshiba K. and Ohmori H. Neurotoxic damage of granule cells in the dentate gyrus and the cerebellum and cognitive deficit following neonatal administration of phenytoin in mice. **J. Neuropath. Exp. Neurol.** 61, 956–967. 2002.

Peng HW, Cheng FC, Huang YT. Determination of naringenin and its glucuronide conjugate in rat plasma and brain tissue by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.** 714:369–374. 1998.

Porto, CC. (2001). *Semiologia medica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Pouget, C.; Lauthier, F.; Simon, A.; Fagnere, C.; Basly, J.P.; Delage, C.; Chulia, A.J. Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v. 11, p. 3095-3097. pp 141–163. 2001.

Qiang L; Yang Y; Ma Yan-Jun; Chen Fei-Hong; Zhang Ling-Bo; Wei Liu,Qi Qi Na Lu; Lei Tao; Xiao-Tang Wang; Qi-Dong You; Qing-Long Guo. Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. **Cancer Letters** Volume 279, Issue 1, 28, Pages 13–21. 2009.

Radhakrishnan, K., B. Mokri, J. E. Parisi, W. M. O'Fallon, J. Sunku, and L. T. Kurland. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. **Ann. Neurol.** 37: 67–73. 1995.

Raso, GM. Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci.**;v. 68, p. 921–31. 2001.

Riffell, J.L.; Zimmerman, C.; Khong, A.; Mchardy, L.M.; Roberge, M. Effects of chemical manipulation of mitotic arrest and slippage on cancer cell survival and proliferation. **Cell Cycle**, n. 18, v. 8, p. 3025-38. 2009.

Rodrigo Mora; Anette Abschuetz; Tim Kees; Ivana Dokic; Natalie Joschko; Susanne Kleber; Renate Geibig; Eric Mosconi; Hanswalter Zentgraf; Ana Martin-Villalba; Anne Régnier-Vigouroux. TNF- α - and TRAIL-resistant glioma cells undergo autophagy-dependent cell death induced by activated microglia. **Glia.** 1;57(5):561-81. 2009.

Santos, B.L. Silva, A.R. Pitanga B.P.S., Sousa C.S., Grangeiro M.S., Fragomeni B.O., Coelho P.L.C., Oliveira M.N., Menezes-Filho N.J., Costa M.F.D., El-Bachá R.S., Velozo E.S., Sampaio G.P., Freire S.M., Tardy M., Costa S.L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry** 127 404–411. 2011.

Schartner, J. M., A. R. Hagar, M. Van Handel, L. Zhang, N. Nadkarni, and B. Badie. Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia. **Glia** 51: 279–285. 2005.

Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM. Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. **Can J Neurol Sci** 25:197–201. 1998.

Sell, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 51, 1–28. 2004.

Sharma, V.; Joseph, C.; Ghosh, S.; Agarwal, A.; Mishra, M.K.; Sem, E. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. **Mol Cancer Ther**, n. 9, v. 6, p. 2544-53. 2007.

Siegelin, M.D.; Reuss, D.E.; Habel, A.; Herold-Mende, C.; Von Deimling, A. The flavonoid kaempferol sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by proteasomal degradation of surviving. **Mol Cancer Ther**, n. 11, v. 7, p. 3566-74. 2008.

Silva Ar , Pinheiro Am, Souza Cs, Freitas Sr, Vasconcelos V, Freire Sm, Velozo Es, Tardy M, El-Bachá Rs, Costa Mfd, Costa Sl. The Flavonoid Rutin Induces Astrocyte And Microglia Activation And Regulates Tnfalpha And No Release In Primary Glial Cell Cultures. **Cell Biology And Toxicology** 24:75-89. 2008.

Son, D. J., Park, M. H., Chae, S. J., Moon, S. O., Lee, J. W., Song, H. S., Moon, D. C., Kang, S. S., Kwon, Y. E., and Hong, J. T. Inhibitory effect of snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* on hormone-refractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB. **Mol. Cancer Ther.**, 6, 675–683. 2007.

Streit WJ, Kincaid-Colton CA. The brain's immune system. **Sci Am** 273(5):54–55, 58–61. 1995.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. **Prog Neurobiol** 57:563–581. 1999.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med.** 352:987–996. 2005.

Shibata, T. Yamada, K. Watanabe, M. Ikenaka, K. Wada, K. Tanaka, K & Inoue, Y. Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. **Journal of Neuroscience.**; 17: 9212-9219. 1997.

Stupp R. Mason W. van den Bent M.J. Weller M. Fisher B. Taphoorn M.J. Belanger K. Brandes A.A. Marosi C. Bogdahn U. Curschmann J. Janzer R.C. Ludwin S.K. Gorlia T. Allgeier A. Lacombe D. Cairncross J.G. Eisenhauer E. Mirimanoff R.O. European Organisation for Research Treatment of Cancer Brain Tumor Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N. Engl. J. Med.** ;352:987–996. 2005.

Suganuma M, Okabe S, Oniyama M *et al.* Wide distribution of [H-3](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. **Carcinogenesis** 19:1771–1776. 1998.

Strobel HW, Kawashima H, Geng J, Sequeira D. Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. **Toxicol Lett.**, 82:639-43. 1995.

Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ . Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. **J Leukoc Biol** 85:352-70. 2009.

Tsai, T.H, Chen, Y.F . Simultaneous blood and brain sampling and analysis of cefazolin in the rat by microdialysis and microbore liquid chromatography. **Biomedical Chromatography.** 14:274-278. 2000.

Tardy M. Astrocyte et Homeostasie. **Médecine Science**; 8 (7):799-804. 1991.

Morest DK, Silver J. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? **Glia**; 43:6-18. 2003.

Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, Daumas-Duport C. New variants of malignant glioneuronal tumors: a clinicopathological study of 40 cases. **Neurosurgery** 55(6):1377-1391. 2004.

Wagner, S., S. Czub, M. Greif, G. H. Vince, N. Suss, S. Kerkau, P. Rieckmann, W. Roggendorf, K. Roosen, and J. C. Tonn. Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. **Int. J. Cancer** 82: 12–16. 1999.

Warner M, Gustafsson JA. Cytochrome P450 in the brain: neuroendocrine functions. **Front Neuroendocrinol.**; 16(3): 224-36. 1995.

Wang, T.T.Y.; Sathyamoorthy, N.; Phang, J.M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. **Carcinogenesis**, n. 2, v. 17, p. 271-275. 1996.

Youdim, KA; Shukitt-Hale, B; Joseph, JA. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radic Biol Med.** Dec 1, 37(11): 1683-93. 2004.

Yu, H., M. Kortylewski, and D. Pardoll. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nat. Rev. Immunol.** 7: 41–51. 2007.

Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinel-Filho V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim Nova** 24: 147-152. 2001.

Yunes, RA; Calisto, JB. Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In. Plantas medicinais sob a ótica da medicina moderna. **Ed. Argos**. 321-33. 2011.

Zawadzka M, Kaminska B . A novel mechanism of FK506-mediated neuroprotection: downregulation of cytokine expression in glial cells. **Glia** 49: 36–51. 2005.

Zeppernick, F. *et al*. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. Clin. **Cancer Res**. 14, 123–129. 2008.

Zhang J, Shi XQ, Echeverry S, Mogil JS, De Koninck Y, Rivest S. Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. **J Neurosci** 27:12396–12406. 2007.

Zhang J, Stevens MF, Laughton CA, Madhusudan S, Bradshaw TD. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. **Oncology**. 78:103–114. 2010.

Zhang, J., M. F. Stevens, C. A. Laughton, *et al* .Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: molecular mechanisms and potential translational applications. **Oncology**. vol. 78, no. 2, pp. 103-114. 2010.

Zhang, P B; Li W S; Gao, M; Li, L; Wang, N; Lei, S. Culture and identification of neural stem cells from mouse embryos. **Chin J Contemp Pediatr**, 13 (3): 244-247. 2011.

7. ANEXO (produção científica durante o doutorado)

- **PITANGA, B. P. S**; NASCIMENTO, R. P.; SILVA, V. D. A.; COSTA, S. L. The role of astrocytes in metabolism and neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, the main toxin of *Crotalaria retusa*. *Front. Pharmacol.*, v. 3, p. 1-8, 2012.
- **PITANGA, B. P. S**; SILVA, V. D. A.; SOUZA, C. S.; JUNQUEIRA H; FRAGOMENI, B. O. ; NASCIMENTO R; SILVA, A. R.; COSTA, F. D.; Costa MDF ; EL-BACHA, R. S. ; COSTA, S. L.. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. *Neurotoxicology (Park Forest South)*. 2011.
- SANTOS, B.L.; SILVA, A.R.; **PITANGA, B. P. S** ; SOUZA, C. S. ; GRANGEIRO, M. S. ; FRAGOMENI, B. O.; COELHO, P. L.; OLIVEIRA, M.; Menezes-Filho, N.J; COSTA, F. D. ; COSTA, S. L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food Chemistry*, p. 1, 2011.
- SILVA-NETO; BARRETO, R.; **PITANGA, B.P. S**; SOUZA, C. S ; SILVA, V. D. A. ; SILVA, A. R. ; VELOSO, E. S.; BATATINHA, M. J. M.; TARDY, M.; COSTA, F. D.; EL-BACHA, R. S. ; COSTA, S. L. Genotoxicity and morphological changes induced by the alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, in a model of glial cells. *Toxicon (Oxford)*, v. 1, p. 1, 2010.
- OLIVEIRA, D. M.; **PITANGA, B.P.S**; GRANGEIRO, M. S. ; LIMA, R. M.; COSTA, F. D. ; COSTA, S. L. ; CLARENCIO, J. ; EL-BACHA, R. S. . Catechol cytotoxicity in vitro: Induction of glioblastoma cell death by apoptosis. *Human and Experimental Toxicology*. p. 1-14, 2010.