



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



TRABALHO DE TESE

PAULO LUCAS CERQUEIRA COELHO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS E
IMUNOMODULATÓRIAS DO FLAVONOIDE APIGENINA EXTRAÍDO DE
Croton betulaster Mull NA INTERAÇÃO GLIOBLASTOMA/MICROGLIA**

Salvador, BA
2017

PAULO LUCAS CERQUEIRA COELHO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS E
IMUNOMODULATÓRIAS DO FLAVONOIDE APIGENINA EXTRAÍDO
DE *Croton betulaster* Mull NA INTERAÇÃO
GLIOBLASTOMA/MICROGLIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor em
Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Lima Costa
Co-orientadora: Profa. Dra. Suzana Braga de Souza

Salvador, BA
2017

Coelho, Paulo
Avaliação das propriedades antitumorais e imunomodulatórias
do flavonoide apigenina extraído de *Croton betulaster* Mull em
interação com glioblastoma/microglia / Paulo Coelho. --
Salvador, 2017.
124 f. : il

Orientadora: Silvia Costa.
Coorientadora: Suzana Souza.
Tese (Doutorado - Programa de Pós Graduação em Imunologia) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde,
2017.

1. Flavonoide. 2. Apigenina. 3. Glioblastoma. 4. Microglia.
5. Resposta imune. I. Costa, Silvia. II. Souza, Suzana. III.
Título.

*Aos meus queridos alunos e alunas
que a cada dia mostram-me que
estou no caminho certo...*

AGRADECIMENTOS

Finalmente chegou a hora de agradecer as pessoas que me ajudaram durante estes quatro anos de DOUTORADO...

Agradeço primeiramente e principalmente a Deus e aos meus Guias de Luz. Sem a presença Deles em minha vida com certeza eu não estaria nem aqui. Obrigado por dar-me forças, paciência e perseverança em cada dia de minha vida e principalmente por querer desistir apesar de todos os problemas e dificuldades.

À minha família pelo apoio incondicional que mesmo sem saber o que é um mestrado e doutorado SEMPRE esteve do meu lado. Sou eternamente grato por tudo que fizeram por mim. Mãe, pai, irmãos e avós.

A minha orientadora, Professora Dra. Silvia Lima Costa (minha eterna prózima), que incondicionalmente me incentivou e acreditou sempre em mim; até nos momentos que eu não tinha mais forças ela sempre me estimulou e confiou em mim. Sou eternamente grato por TUDO e por TODAS as oportunidades que me ofereceu. Sempre levarei seus ensinamentos e garras para tudo que eu fizer.

As minhas co-orientadoras Professoras Dra. Suzana Braga de Souza e Giselle Pinto de Farias que lindamente e pacientemente tornaram-se indispensáveis nesta etapa de minha trajetória acadêmica. Obrigado Suzana pelos conselhos que com certeza levarei para a minha vida pessoal.

A professora Maria de Fátima Dias Costa por ter aberto as portas do laboratório, aceitando me orientar (mesmo provisoriamente), na ausência de Silvia em seu Pós doc na França. Não posso esquecer dos seus conselhos acadêmicos que direcionam-me sempre ao caminho certo. Agradeço aos demais professores do laboratório pela ajuda, orientações, em especial ao professor Ramon.

Tenho um enorme carinho e gratidão pelas pessoas que me iniciaram na pesquisa e com certeza serviu de grande inspiração para mim. Mona, Keu, Victor e Bruno serei eternamente grato a vocês.

Ao meu querido laboratório de Neuroquímica que nestes 10 anos tive a oportunidade de aprender inúmeros ensinamentos científicos e pessoais. Cada pessoa que passou por este laboratório e que se encontra até a presente data tem uma contribuição neste trabalho. Esta tese não seria a mesma sem a contribuição de Alessandra Bispo e Jéssica Sampaio, minhas companheiras de bancada nestes últimos momentos.

À professora Doutora Deise Vilas-Boa pelos ensinamentos histopatológicos e principalmente pelos ensinamentos e orientações para a vida. Sou muito feliz por tê-la em minha vida profissional e principalmente na acadêmica.

Aos amigos que o laboratório me deu: Eduardo Muniz, Joana Luz, Vanessa Macedo, Vanessinha, Érica Novaes e Verônica. Os meus dias de trabalho tornaram-se muito melhor com a companhia de vocês.

Agradeço a todos os meus professores e funcionários de PPGIm, em especial a Dilceia pelo carinho de sempre.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Vivaldo Moura-Neto e a Flávia Lima que gentilmente aceitaram-me em seu laboratório na UFRJ e tive a oportunidade de aprender inúmeras técnicas que serviram-me de inspiração para a tese. Em especial, não poderia esquecer de Gustavo Dubois pelos ensinamentos na cirurgia estereotáxica e também nas orientações e consolos durante meu estágio de pós doutorado.

Aos Doutores Hervè Cheineweiss e Marie-Pierre Junier que receberam-me e orientaram brilhantemente em seu laboratório na Université Pierre et Marie-Curie durante um ano de meu doutorado sandwuique. Com certeza absoluta eu sou um novo pesquisador e pessoa após a minha estadia em seu laboratório.

Ao meu querido amigo John Souza que brilhantemente fez-se presente em muitas etapas do desenvolvimento desta tese. Sem os seus conselhos, orientações seria muito mais difícil para mim concluir esta etapa de minha vida.

A todos meus amigos e amigas que sempre fizeram parte de minha vida e encheram-a de alegria e felicidade. Não citarei nomes para não prolongar essa página e ser injusto com alguém que por esquecimento não tenha mencionado aqui. Mas todos têm sua parcela neste trabalho e momento de minha vida. Agora terei um pouco mais de tempo para vocês.

Aos animais de laboratório.

Aos financiadores deste projeto: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior do Ministério da Educação (CAPES).

E por fim, agradeço a você querido e querida leitora desta tese os meus sinceros agradecimentos!!!!!!

“Sou aquela árvore amaldiçoada que não dá frutos. Mas ao invés dos frutos sei abençoar com uma sombra adorada.”

Bruno Pitanga.

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTITUMORAIS E IMUNOMODULATÓRIAS DO FLAVONOIDE APIGENINA EXTRAÍDO DE *Croton betulaster* Mull NA INTERAÇÃO GLIOBLASTOMA / MICROGLIA

RESUMO

O entendimento da biologia tumoral dos glioblastomas é um processo complexo e contraditório. Classicamente, a microglia é a célula efetora da resposta imune no Sistema Nervoso Central. Entretanto, estudos vêm demonstrando que este tipo celular contribui mais para a progressão tumoral do que para a sua eliminação. Nossos estudos anteriores demonstraram a capacidade antitumoral e antiangiogênica do flavonoide apigenina, além do seu efeito morfogênico e imunomodulador em cultura de glioblastomas. O presente estudo teve como objetivo investigar as propriedades antitumorais e imunomodulatórias do flavonoide apigenina, extraído de *Croton betulaster* Mull em culturas de células de glioblastoma isoladas e cocultivadas com microglia e em modelos animais com implantes de células tumorais humanas. No primeiro artigo, foi investigado o efeito do flavonoide apigenina em cultura de células de microglia isoladas e em cocultura com a linhagem de glioblastoma de rato C6. Observou-se que a apigenina tem a capacidade de diminuir a viabilidade das células de glioma e microglia e modificar a morfologia celular das microglias, além de alterar a capacidade imunomoduladora destas células do perfil M2 para M1, através do balanço da secreção de TNF e IL-10, sem alterar a liberação de NO. Na cocultura, a apigenina mostrou-se capaz de ativar as microglias para fagocitar as células de glioma, aumentando a quimiotaxia e inibindo a migração tumoral, com redução da liberação de IL-6. No segundo artigo, procuramos entender os mecanismos de ação do flavonoide apigenina na cultura de gliomas em termos de viabilidade celular, alterações morfológicas, secreção de fatores tróficos, bem como indução de morte celular por apoptose e autofagia. Para tanto, investigamos o efeito da apigenina em cultura de células e em modelos animais com implantes de células tumorais. Após a modulação com o flavonoide, as células alteraram a sua morfologia, diferenciaram-se e passaram a expressar marcadores astrocitários e neuronais. Houve também uma indução de morte por apoptose e autofagia nas

células tratadas com o flavonoide e uma redução do tamanho da massa tumoral em ratos. Esses resultados demonstram que o flavonoide apigenina apresenta capacidade antiproliferativa e induz diferenciação celular, apoptose, autofagia, inibição da migração celular, e mudanças no perfil regulatório e fenotípico da resposta microglial em interação com o glioblastoma, e poderão contribuir no tratamento dos glioblastomas humanos através de seu efeito antitumoral, morfogênico e imunomodulatório, comprovados pelo presente estudo *in vitro* e em modelos animais com implantes de células tumorais humanas.

Palavras-chave: flavonoides, apigenina, glioma, microglia, apoptose, diferenciação.

EVALUATION OF ANTITUMOR AND IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF FLAVONOIDE APIGENIN EXTRACT FROM *Croton betulaster* Mull IN THE INTERACTION GLIOBLASTOMA / MICROGLIA

ABSTRACT

The understanding the tumor biology of glioblastomas is a complex and contradictory process. Classically, microglia is the effector cell of the immune response in the Central Nervous System. However, studies have shown that this cell type favors tumor progression more than its elimination. Our previous studies demonstrated an antitumor and antiangiogenic capacity of flavonoid apigenin, in addition to the morphogenic and immunomodulatory effect in glioblastomas in vitro. Thus, in this present study we aimed to investigate the antitumor and immunomodulatory properties of flavonoid apigenin, extracted from *Croton betulaster* Mull in cultures of glioblastoma cells isolated and co-cultivated with microglia and in animal models with tumor cells implants. In the first paper, the effect of flavonoid apigenin on culture of isolated microglia cells and in co-culture with glioma C6/microglia was investigated. It was observed that apigenin has the ability to decrease the viability of glioma and glioma/microglia co-culture cells and to modify the cellular morphology of microglia, besides altering the immunomodulatory capacity of these cells from M2 to M1 profile, modifying the balance of TNF and IL-10 secretion, without altering the release of NO. In co-culture, apigenin was able to activate microglia to phagocyte glioma cells, increases chemotaxis and inhibits tumor migration and reduces IL-6 release. In the second paper, we sought to understand the role of apigenin in glioma culture in terms of cell viability, morphological changes, secretion of trophic factors, as well as induction of cell death by apoptosis and autophagy. For this, we investigated the effect of apigenin on cell culture and on animal models with tumor cell implants. After modulation with the flavonoid, the cells altered their morphology, differentiated and started to express astrocyte and neuronal markers. The flavonoid also induces cell death by apoptosis and autophagy and reduces the size of tumor mass in rats. Due to the antiproliferative capacity, induction of cell differentiation, inhibition of cell migration, induction of apoptosis, autophagy and changes in the regulatory and phenotypic profile of the microglial response in interaction with glioblastoma, these results

point to the apigenin flavonoid as a therapeutic and immunomodulatory alternative in the treatment of human glioblastomas.

Key words: flavonoids, apigenin, glioma, microglia, apoptosis, differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Polarização M1/M2 da microglia e suas funções imunoregulatórias	22
Figura 2: Microambiente tumoral e secreção de fatores pela microglia que promovem a invasão do glioma	23
Figura 3: Características do Glioblastoma Humano.	25
Figura 4: Exsicata de <i>Croton betulaster</i> Mull.....	31
Figura 5: Estrutura básica dos flavonoides	32

Figuras do Artigo I

Figura. 1. Estrutura química do flavonoide apigenina da <i>Croton betulaster Mull</i>	43
Figura.2. Marcação imunocitóquímica para IBA-1	55
Figura 3. Efeito do flavonoide apigenina sobre a morfologia de células microgliais	56
Figura 4. Efeito do flavonoide apigenina sobre a capacidade fagocítica das microglia em cocultura microglia/glioblastoma	57
Figura 5. Efeito da apigenina na expressão de marcadores da polarização microglial e de fatores tróficos em culturas de microglia e cocultura microglia/glioblastoma	58
Figura 6. Efeito do meio condicionado de microglia sobre células de glioblastomas	59
Figura 7. Avaliação, do efeito do meio condicionado de culturas de células de Glioblastoma sobre a proliferação e diferenciação migroglial	60
Figura 8. Ensaio de quimiotaxia para microglia em sistema Transwell realizados em culturas de glioblastoma	61

Figuras do Artigo II

Figura. 1. Efeito do flavonoide apigenina sobre a viabilidade das células de glioblastoma humano U-251.....	89
Figura. 2. Efeito do flavonoide apigenina sobre a viabilidade e morfologia das células TG1 e OB1	90
Figura. 3. Citometria em fluxo para Anexina V em células tumorais da linhagem U-251 após tratatamento com apigenina	91
Figura. 4. Análise da indução de autofagia pela apigenina em células de glioblastoma humano U-251.....	92
Figura. 5. Avaliação do efeito morfogênico através de imunocitoquímica em células de U-251 tratadas com apigenina	93
Figura. 6. Avaliação do efeito morfogênico através de imunocitoquímica em células de TG1 e OB1 tratadas com apigenina	94
Figura. 7. Avaliação da migração celular das células de glioblastoma humano U-251 tratadas com apigenina	95
Figura. 8. Avaliação do potencial antitumorigênico da apigenina em células de glioblastomas humanas U-251 xenotransplantadas em ratos	96
Figura. 9. Avaliação do ambiente tumoral através de imunohistoquímicas em encéfalos de ratos com células de glioblastoma humano da linhagem U-251 tratadas com apigenina.....	97
Figura. 10. Avaliação do ambiente tumoral através do RT-PCR em encéfalos de ratos com células de glioblastoma humano da linhagem U-25...	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE	Barreira hemato-encefálica.
Bmi1	Anticorpo de células-troncos indiferenciadas
°C	graus Celsius
C6	Linhagem de glioblastoma murino C6
CD68	Anticorpo macrófagos M1
CD206	Anticorpo macrófagos M2
CFDA	Corante 6-carboxifluoresceína diacetato
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de crescimento epitelial (<i>Epithelial Growth Factor</i>).
EGFR	Fator de crescimento epitelial (<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>).
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético.
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto (<i>Fibroblast Growth Factor</i>).
FGF-BP	Proteína de ligação do FGF (<i>Fibroblast Growth Factor – Binding Protein</i>).
GFAP	Proteína ácida do gliofilamento (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>).
GL-15	Linhagem de células de glioblastoma multiforme humano.
HIF1	Fator 1 induzível por hipóxia
HLA	Completo principal de histocompatibilidade humano (<i>Human Leucocyte Antigen</i>).
HUVECs	Linhagem de células endoteliais de veia umbilical humana (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>).
IBA-1	Anticorpo estrutural para microglia
IGF1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Enzima Óxido Nítrico sintase induzível
ICQ	Imunocitoquímica.
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama.

KDR/flk-1	Receptor com domínio de inserção de cinase (<i>kinase insert domain-containing receptor</i>)/(fetal liver kinase-1).
LDH	Lactato desidrogenase.
LPS	Lipopolissacarídeo.
MAPK	Cinases de proteínas ativadas por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>).
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
MG-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago e granulócito
MG	miligrama
mL	mili litro
MTT	3-(-dimetiliazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio)
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
OB1	Linhagem de célula-tronco tumoral de glioma humano
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Gene supressor de tumor.
PBS	Tampão fosfato salino
PD-ECGF	Fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaquetas (<i>Platelet derived Endothelial Cell Growth Factor</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>Platelet-derived growth Factor</i>)
PGs	Prostaglandinas
PGE/PGE2	Prostaglandinas E/E2
PKC	Proteína cinase C
PVDF	Membrana de fluoreto polivinilideno para transferência.
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro (<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>).
SFB	Soro fetal bovino
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio.
SNC	Sistema nervoso central
SST	Solução Salina Tamponada
TBS	Tampão tris salino.
TBS-T	Tampão tris salino com Tween 20.
TG1	Linhagem de células-troncos de glioma humano

TGFβ	Fator de crescimento e transformação beta (<i>Transforming Growth Factor</i>).
Th1	Células T helper 1.
Th2	Células T helper 2.
THF	Tetrahidrofurano.
TLR	Receptor tipo <i>toll</i> (<i>Toll like receptor</i>)
TMZ	Temozolamida
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis factor</i>).
TNFβ	Fator de necrose tumoral beta.
TPP	<i>Techno Plastic Products</i>
μL	microlitros
μM	micromolar
UI	Unidade internacional.
U-251	Linhagem de glioblastoma multiforme humano
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>).
VEGFR	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>).
WHO	World Health Organization
WST	4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno dissulfonato

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Aspectos funcionais de células do SNC.....	18
2.1.1	Resposta imune no SNC.....	19
2.1.2	Células microgliais e resposta imune.....	21
2.1.3	Interação microglia/glioblastoma.....	23
2.2	Fisiopatologia dos tumores cerebrais malignos: o glioblastoma	24
2.2.1	Origem e caracterização de gliomas.....	24
2.2.2	Abordagens terapêuticas para glioblastomas	26
	2.3 Modelos de estudo dos tumores no snc	28
2.4	Plantas medicinais e compostos flavonoides	29
2.4.1.	A espécie <i>Croton betulaster</i> Mull	30
2.4.2	Propriedades químicas e biológicas dos flavonoides	31
	2.4.3. Efeitos antitumorais de flavonoides	34
3.	HIPÓTESES E OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
	4.3 RESULTADOS	48
4.4	DISCUSSÃO.....	62
4.5	REFERÊNCIAS	67
5.	ARTIGO CIENTÍFICO II.....	71
5.1	INTRODUÇÃO.....	72
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
5.3	RESULTADOS.....	82
5.4	DISCUSSÃO.....	98
	6. CONCLUSÃO GERAL.....	109
	7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
	8. ANEXO.....	122

1. INTRODUÇÃO GERAL

Gliomas são os tumores intracranianos que apresentam células gliais com maior frequência, representando mais de 50% das neoplasias do Sistema Nervoso Central (SNC). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estes tumores são classificados a partir de critérios histopatológicos e moleculares, sendo o glioblastoma o mais agressivo (ANDERSON et al., 2008; LOUIS et al., 2016). Este tipo de tumor apresenta o pior prognóstico, com sobrevida máxima de 15-18 meses após o diagnóstico (COTRAN, et al., 2000; NAKADA et al., 2007; ANDERSON, et al., TOSONI et al., 2016).

As estratégias de tratamento aplicadas aos glioblastomas consistem em quimioterapia, cirurgia e radioterapia, isoladamente ou combinados, os quais podem aumentar a sobrevida dos pacientes em alguns meses. Sua eficácia terapêutica ainda é muito limitada, ocorrendo alta recorrência, reflexo da propriedade infiltrante deste tipo de tumor, o que torna uma ressecção total impossível sem que haja dano neurológico ao paciente (SOFFIETTI et al., 2007). Novos agentes e combinações terapêuticas têm sido sugeridos com o objetivo de aumentar a eficácia do tratamento e diminuir os efeitos colaterais intensos (DEFER et al., 1997; VANDIER et al., 1998; JANSEN et al., 2004; TUNICI, et al., 2006; SOFFIETTI et al., 2007)

As células da microglia são um tipo de célula glial originado dos macrófagos invasores no SNC (KOSTIANOVSKY, 2008) e sua função na biologia dos glioblastomas não está totalmente elucidada. No entanto, numerosas células da microglia se infiltram na massa tumoral e tendem a favorecer o seu crescimento (BADIE & SCHARTNER, 2000). Uma vez que as células do glioblastoma são imunogênicas e secretam citocinas imunossupressoras (BADIE et al., 2001), a ativação controlada da microglia e de sua propriedade antitumoral podem constituir uma arma adicional de defesa nas imunoterapias contra os tumores cerebrais.

Os flavonoides são compostos polifenólicos, produtos do metabolismo secundário dos vegetais, e amplamente distribuídos no reino vegetal (BRUNETON, 1995; HAVSTEEN, 2002). Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a

estes biocompostos, inclusive uma atividade antitumoral, especialmente contra câncer de mama, pulmão, próstata, fígado e leucemia pró-mielocítica (CHENG et al., 2000; HAIDARA et al., 2006; ROY et al., 2007; YE et al., 2007). Estudos anteriores do grupo já demonstraram que o flavonoide rutina apresentou atividade neuroprotetora e antitumoral em modelos *in vitro* de cultura primária de astrócitos e de linhagem de glioblastoma humano (SILVA et al., 2008; Santos et al., 2011). Além disso, outros estudos do grupo, realizados por Freitas et cols. (2010) e Coelho et cols. (2015, 2016) demonstraram a capacidade de flavonoides da *Croton betulaster*, entre eles a apigenina, em inibir a produção de citocinas angiogênicas, o crescimento e diferenciação em células de glioblastoma humano das linhagens GL-15 e C6. O cultivo com estes flavonoides também resultou em relevantes níveis de apoptose das células tumorais e não apresentaram toxicidade em astrócitos.

Neste contexto, este estudo investigou a atividade do flavonoide apigenina extraído da folha da planta *Croton betulaster* Mull em culturas de células de glioma e microglia, isoladas ou em cocultura, e em modelos animais com implantes de células tumorais. Foram avaliados os efeitos no crescimento, na diferenciação, regulação de citocinas, migração e quimiotaxia *in vitro* e *in vivo*. Com isso, buscamos esclarecer seu mecanismo de ação demonstrando diferentes efeitos antitumorais e morfogênicos que poderão contribuir futuramente para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e imunomodulatórias no tratamento dos glioblastomas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos funcionais de células do SNC

O SNC nos mamíferos é constituído pelos neurônios e células da glia. Os neurônios possuem um ou mais prolongamentos que são capazes de gerar e conduzir impulsos nervosos. Sua morfologia está adaptada para recepção, transmissão e geração de sinais nervosos (LENT, 2010). Assim como as células da glia, os neurônios se diferenciam de progenitores neurais, mas apresentam prolongamentos polarizados chamados de axônios e dendritos. Os axônios podem propagar potenciais de ação, fazer junções sinápticas com outros neurônios e células nervosas, além de liberar neurotransmissores (MOREST & SILVER, 2003).

No encéfalo, a proporção geral entre neurônios e células não neuronais chega a 1:1 (AZEVEDO et al., 2009; HERCULANO-HOUZEL et al., 2006, 2008). A proporção de um neurônio para dez células da glia, considerado um verdadeiro dogma das neurociências, foi superado em trabalhos recentes realizados no encéfalo de humanos, primatas e diversos roedores (BARTHELD et al., 2016). Esses estudos também revelaram que o córtex cerebral, apesar de possuir 82% da massa encefálica, apresenta somente 18% do total de neurônios, enquanto o cerebelo contém mais de 70% dos neurônios em roedores (AZEVEDO et al., 2009; HERCULANO-HOUZEL et al., 2006, 2008).

As células gliais constituem unidades de sustentação, revestimento, defesa e modulação da atividade neuronal, sendo constituídas no SNC pelos astrócitos, microglia, oligodendrócitos e células ependimárias. Por exemplo, os astrócitos removem os neurotransmissores em excesso liberados pelos neurônios durante a transmissão sináptica e mantêm o balanço e composição iônica do ambiente neuronal (FEI HE & YI e SUN, 2007).

Os astrócitos constituem cerca de 20% de toda a população glial (PELVIG et al., 2008). Estas células funcionam como elementos de sustentação, possuem inúmeros prolongamentos que emergem do corpo celular e são fundamentais para o desenvolvimento, homeostasia e detoxificação do SNC (TARDY et al., 1991).

Essas células são particularmente fundamentais para o aporte de nutrientes do sangue para as células nervosas, armazenamento de glicogênio, participam do mecanismo de cicatrização e defesa imune do tecido nervoso (TARDY et al., 1981; TARDY, 1991, KRIEGSTEIN & GÖTZ, 2003).

Microglia são células pequenas, alongadas e desempenham no SNC funções semelhantes aos macrófagos, atuando como elementos de defesa com função fagocítica. Essas células podem aumentar sua população nos casos de dano e inflamação, além de facilitar a sobrevivência dos neurônios através da secreção de substâncias neurotróficas ou da ativação de astrócitos (GIULIAN et al., 1994; ALOISI, 2001; GOLDMANN and PRINZ, 2013).

Os oligodendrócitos apresentam prolongamentos celulares fundamentais para a formação da bainha de mielina, garantindo a rápida e eficiente condução do impulso nervoso (PELVIG et al., 2008). As células ependimárias são células menos diferenciadas, remanescentes do epitélio embrionário e revestem as paredes dos ventrículos cerebrais, aqueduto e canal central da medula vertebral, promovendo junto aos plexos coroídeos a formação do líquido cefalorraquidiano (LENT, 2010).

O tecido nervoso é protegido ainda pela barreira hematoencefálica, uma estrutura membranosa altamente seletiva, pelo endotélio dos vasos sanguíneos com junções altamente adesivas e todos os tipos celulares descritos acima (FONSECA et al., 2014 e SOE et al., 2014). Este componente físico é fundamental na regulação da entrada de macromoléculas, moléculas polares e inclusive fármacos que circulam da corrente sanguínea para o encéfalo, mantendo o parênquima cerebral isolado da circulação sanguínea e permitindo um ambiente químico protegido e constante para o funcionamento do SNC (SCHMITT-SCHILLIG et al., 2005; KIM et al., 2006).

2.1.1 Resposta imune no SNC

O encéfalo é um órgão imunologicamente privilegiado, sendo que as respostas aos antígenos na maioria das vezes não causam dano ao tecido neural

(JANEWAY, 2007). No entanto, dependendo do tempo e das circunstâncias, essas respostas podem causar dano ao tecido cerebral ou contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas agudas ou crônicas todas com perfil neuroinflamatório como a síndrome de Fisher, esclerose múltipla, doença de Huntington, Parkinson, Alzheimer entre outras (BECKER, 2006; GRAEBER & STREIT, 2010).

A imunidade inata no SNC é exercida primeiramente pelos astrócitos e células da microglia (HUSSAIN et al., 2006). Segundo Lucas et al. (2006), as células da glia respondem a diversos distúrbios, tais como: injúria, isquemia, infecções, doenças autoimunes e desordens neurodegenerativas, através da produção de citocinas, quimiocinas e mediadores químicos. Estas moléculas atuam de modo parácrino, promovendo a ativação celular e recrutando linfócitos para promover a eliminação dos antígenos no tecido nervoso (FARINA et al., 2007). Estas células são capazes de reconhecer e responder rapidamente a infecções e são responsáveis pelo recrutamento e ativação de células do sistema imune necessárias para combate aos patógenos (BAILEY et al., 2006).

As células gliais são as células imunoefetoras do SNC responsáveis pela defesa contra microrganismos infecciosos e substâncias tóxicas oriundas do metabolismo celular, que podem alterar ou comprometer o seu funcionamento (BECKER et al., 2006). Os astrócitos apresentam a capacidade de modificar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, atraindo células do sistema imune da circulação sanguínea para o tecido neural e assim reforçando a resposta imunológica (FARINA et al., 2007). Essas células também apresentam capacidade fagocítica, no entanto raramente expressam moléculas de MHC de classe II (ALOISI et al., 2000). Os astrócitos produzem várias interleucinas (ILs) como IL-1, IL-3, IL-5, IL-6 e IL-8 e secretam ainda TNF, TGF- β , INF- γ , GM-CSF, M-CSF e PGE₂ todas de fundamental importância para regulação de células promotoras da resposta imune (SZELÉNYI, 2001).

Ainda como um papel secundário, os oligodendrócitos e os neurônios podem contribuir para a defesa do SNC secretando as citocinas IL-1, IL-12, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-15 (SZELÉNYI, 2001).

A presença no SNC de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é consequência da ativação de células T CD4+, microglia e astrócitos. Além de promoverem a ativação celular, as citocinas regulam a expressão de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, gerando um equilíbrio da resposta imune do tipo TH1 e TH2 durante o processo patogênico (ALOISI, et al., 2000).

2.1.2 Células microgliais e resposta imune

As células da microglia são as principais responsáveis pela resposta imune inata no SNC, iniciando processos inflamatórios e recrutando outras células da resposta imune adaptativa para a defesa desse sistema (LEHNARDT, 2010). A microglia [CD11b/c+CD45^{baixo}] no SNC segundo Szeléni (2001) desempenha papel semelhante aos macrófagos [CD11b/c+CD45^{alto}], incluindo a fagocitose, indução de inflamação e capacidade de processar e apresentar antígenos aos linfócitos T que são recrutados para o local da reação (ALOISI, 2001). Sua quantidade varia ao longo do SNC e os astrócitos apresentam um grande papel na ativação destas células (MERRELL & BENEVENISTE, 1996; RANSOHOFF 1997; MINGHETTI & LEVI 1998; VILHARDT, 2005). Os principais marcadores da micróglia são: Iba1, GLUT 5, CD 34, CD 163, CD 209, CCR 2, TLR2, TLR4, OX-42 e nestina (GRAEBER & STREIT, 2010). Os receptores tipo toll (TLR, *toll like receptors*) são os receptores da resposta imune inata e também da resposta adaptativa que provêm um importante mecanismo para que as microglias tornem-se capazes de sensibilizar o patógeno e ligarem-se às células dos hospedeiros (LEHNARDT, 2010). A presença destas moléculas no sistema nervoso é de fundamental importância para recrutamento e ativação de linfócitos, o que favorece o desenvolvimento da resposta imune adaptativa e mantém a homeostase cerebral (VILHARDT, 2005; HANISCH & KETTENMANN, 2007).

As células da microglia apresentam uma variação morfológica de acordo com a idade e o estado imunológico do cérebro. No encéfalo jovem sadio, apresentam um fenótipo amebóide típico de macrófagos, sendo assim chamadas de macrófagos cerebrais (GRAEBER & STREIT, 2010). Essa morfologia ocorre

também em casos de injúrias e patologias cerebrais, como o câncer. No entanto, em um encéfalo adulto tais células apresentam um fenótipo ramificado, passando a ser chamadas de microglia ramificada (VILHARDT, 2005; CHARLES et al., 2011).

Durante uma infecção no tecido nervoso a microglia ativada altera a sua morfologia (AJAMI et al., 2007), apresentando uma importante regulação na expressão de moléculas de MHC classe II. Estas células apresentam uma alta taxa metabólica e secreta uma variedade de citocinas, sendo as principais: IL-1 IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15, além de secretar ainda TNF, TGF- β , M-CSF, prostaglandina E₂ e quimiocinas (ALOISI et al., 2000; SZELENYI, 2001; VILHARDT, 2005).

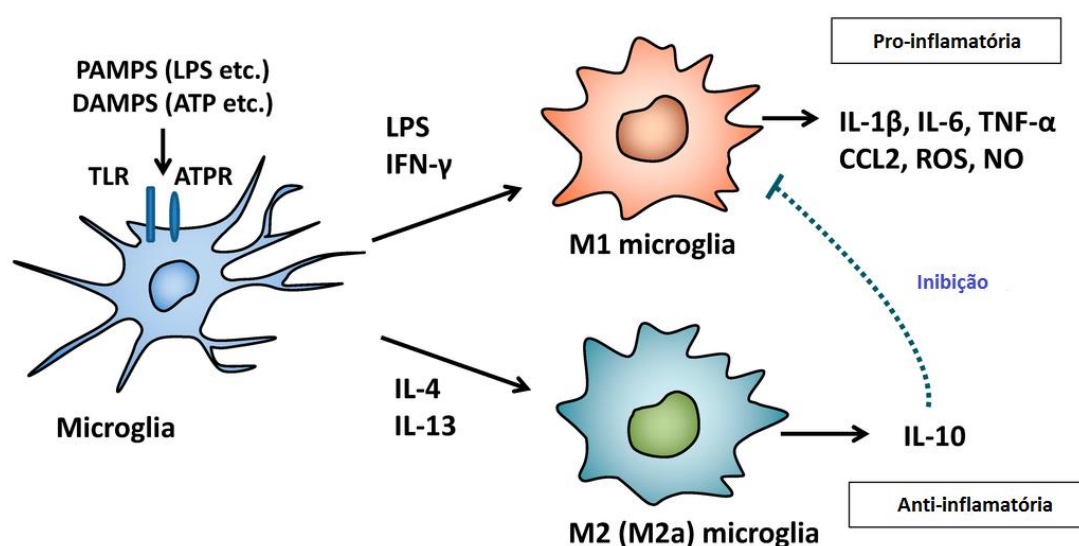


Figura 1. Polarização M1/M2 da microglia e suas funções imunoregulatórias

(Adaptado de Nakagawua and China, 2014).

Além disso, a microglia é a maior população celular responsável pela indução da produção de óxido nítrico (NO) no SNC, possuindo diversas funções biológicas, inclusive como antitumorai (NATHAN, 1992; MARQUES et al., 2008). O NO é outro importante fator produzido pela microglia e astrócitos ativados. Considerado como potente mensageiro biológico, o NO é um radical livre de vida curta que media uma variedade de funções biológicas, incluindo homeostasia vascular, neurotransmissão, ação microbicida, atividade antitumoral e citotoxicidade, no entanto, quando liberado, pode se combinar com o peróxido ou o superóxido de hidrogênio, produzindo radicais peroxinitritos altamente reativos (DAWSON & SNYDER 1994; MANNING et al., 2001).

2.1.3 Interação microglia/glioblastoma

Nos tumores cerebrais são observados um grande número de células não tumorais compondo a massa tumoral (DUBOIS et al., 2014). Badie e Schartner (2000) demonstraram que a microglia compõe uma grande parte ao redor da massa tumoral. Apesar dos mecanismos ainda não serem totalmente elucidados, a microglia parece favorecer a progressão e invasão do tumor, seja através de contato direto ou pela secreção de fatores solúveis (HAMBARDZUMYAN et al., 2015). Esta liberação de fatores pelas células microgliais passa, então, a favorecer a proliferação e a migração das células tumorais, assim como a angiogênese, muito importante para suprir de nutrientes e oxigênio o tumor (JAIN et al., 2007). Dentre os fatores liberados pela microglia, destacam-se IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF, TGF β , prostaglandinas, EGF (epidermal growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) (GRAEBER et al., 2002; WATTERS et al., 2005).

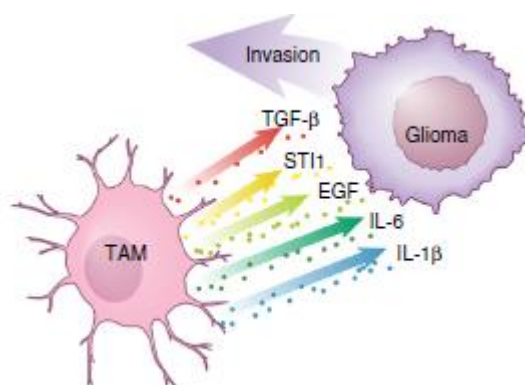


Figura 1: Microambiente tumoral e secreção de fatores pela microglia que promovem a invasão do glioma.

(HAMBARDZUMYAN et al., 2015).

Estudos sobre a imunologia tumoral dos glioblastomas demonstram a importância da microglia para o comportamento agressivo dessas neoplasias (HAMBARDZUMYAN et al., 2016). Hussain et al. (2006) demonstraram que a microglia torna-se hiporresponsiva no microambiente tumoral e assim favorece o crescimento tumoral.

Kostianovsky et al. (2008) demonstraram que as células do glioblastoma inibem a capacidade da microglia para produzir a citocina pró-inflamatória TNF e estimulam a secreção de IL-10. 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 tumorais.

Durante a interação microglia/glioblastoma foi demonstrada que a atividade fagocítica da microglia encontra-se inibida na presença do tumor, sugerindo assim um ambiente imunossupressor que acaba contribuindo para o crescimento e migração tumoral (ZHAI, FRANK e TSIRKA, 2011).

2.2 Fisiopatologia dos tumores cerebrais malignos: o glioblastoma

2.2.1 Origem e caracterização de gliomas

Estas neoplasias são mais encontradas em homens com idade entre 40-65 anos (SOFFIETTI et al., 2007). O prognóstico é reduzido e a maioria dos pacientes não sobrevive um ano e meio depois de confirmado o diagnóstico, segundo dados epidemiológicos atualizados do INCA (COTRAN, et al., 2000; NAKADA et al., 2007; ANDERSON, et al., 2008). Atualmente para o biênio de 2016/2017 são estimados 5.440 casos novos de câncer do SNC em homens e 4.830 em mulheres (INCA, 2017)

A gênese dos gliomas é controversa, mas diversos fatores contribuem para o seu desenvolvimento no SNC, sendo as principais: anormalidades e ausência de controle da divisão celular (OZEKI et al., 2010), mutações em genes, doenças imunes e altas doses de irradiação (SCHWARTZBAUM et al., 2006).

O glioblastoma é o mais agressivo astrocitoma maligno do SNC (figura 3). São tumores de crescimento rápido e infiltrante, bastante invasivo, altamente vascularizado, com focos de necrose e localizam-se principalmente na substância branca dos hemisférios cerebrais (VANDENBERG, 1992; LOUIS et al., 2016). Estes tumores dependem de neovascularização para seu desenvolvimento, nutrição e progressão. Os glioblastomas possuem potencial para invadir tecidos

adjacentes e distantes nas áreas do encéfalo, difundindo-se no espaço intracraniano causando vaso-oclusão, contribuindo para ocorrência de hipóxia e necrose do tecido nervoso (CHAUDHRY et al., 2001; NAKADA et al., 2006; ANDERSON et al., 2008). Seus aspectos morfológicos de vascularidade densa, grande proliferação endotelial celular, além de crescimento rápido, tornam estes tumores altamente recidivos (LAKS et al, 2010)

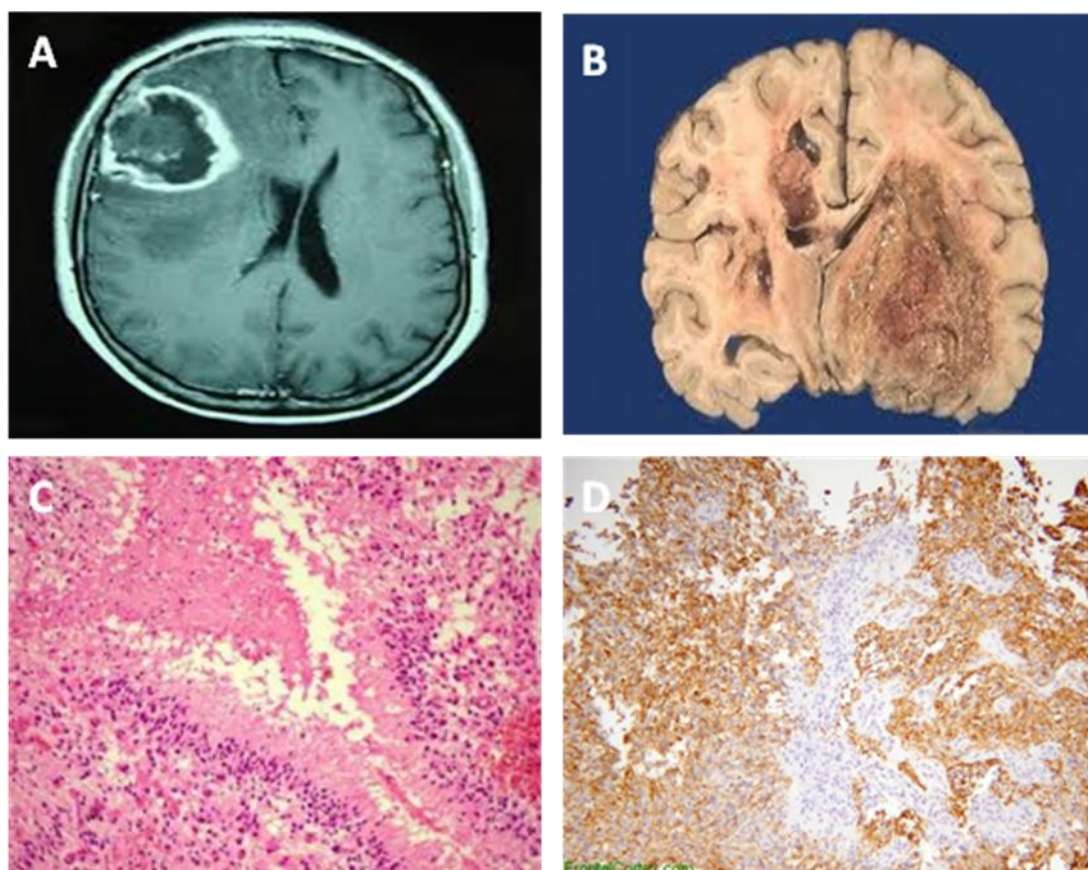


Figura 2: Características do Glioblastoma Humano. (A) Ressonância magnética demonstrando tumor cerebral; (B) Peça macroscópica com massa tumoral invasiva; (C) Corte histológico com coloração hematoxilina-eosina de glioblastoma humano com necrose paliçada e com proliferação endotelial vascular; (D) Imunomarcação para GFAP.

(Adaptada pelo autor).

Em virtude de sua heterogeneidade, o aspecto macroscópico dos glioblastoma varia consideravelmente, não sendo possível encontrar limites nítidos entre o tumor e os tecidos cerebrais vizinhos (Figura 3B). O tecido neoplásico é friável, sem brilho, granuloso, acinzentado, com presença de focos hemorrágicos e

necrose. Apesar de sua grande malignidade, as metástases ocorrem apenas no SNC por via liquórica, e para outros órgãos são de ocorrência rara. A angiogênese intensa associada à presença constante de necrose é indicador do seu comportamento biológico agressivo, sendo este fato causa da alta recorrência desses tumores mesmo após o seu tratamento e ressecção cirúrgica (COTRAN et al., 2000; CHAUDHRY, et al. 2001; SOFFIETTI et al., 2007; NAKADA et al., 2007; ANDERSON et al., 2008).

O glioblastoma humano é heterogêneo e diversos marcadores específicos de origem glial são utilizados para caracterizá-los. Essencialmente, dois marcadores, as proteínas GFAP e a vimentina, ambas componentes principais dos filamentos intermediários das células gliais normais, foram amplamente caracterizadas nos glioblastomas (RUTKA et al., 1999) (Figura 3 D). Ainda, entre os elementos que os caracterizam, temos as mutações no gene p53 e a expressão de EGFR e VEGFR (JANSEN et al., 2004; KARGIOTIS et al., 2006).

Glioblastomas são pobremente imunogênicos e não expressam antígenos às células apresentadoras de antígenos (APC). Além do mais, expressam níveis significantes de TLR, e não secretam citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 TNF responsáveis pelo desenvolvimento da resposta imune inata (BADIE & SCHARTNER, 2000; HUSSAIN et al., 2006; LEHNARDT, 2010).

2.2.2 Abordagens terapêuticas para glioblastomas

A abordagem terapêutica aplicada aos glioblastomas, assim como para outros tipos de tumores cerebrais, é multidisciplinar (SOFFIETTI et al., 2007). Geralmente consiste numa combinação de cirurgia com radioterapia e quimioterapia, esta última constituída, essencialmente, de drogas citotóxicas, como as nitrosuréias e agentes alquilantes que são pouco ativos e somente proporcionam um aumento da sobrevida de alguns pacientes em 2-3 meses (HILDEBRAND et al., 1997; FRIEDMAN et al., 2000; KEIME-GUIBERT et al., 2007).

A eficácia terapêutica da cirurgia para os glioblastomas é limitada, devido primeiramente ao órgão de localização deste tumor que pode afetar regiões funcionais vitais. Além disso, tal limitação também ocorre devido a sua alta recorrência e propriedade infiltrante, o que impossibilita uma ressecção cirúrgica total, permanecendo esta patologia até o momento sem cura (HILDEBRAND et al., 1997; VANDIER et al., 1998; SOFFIETTI, et al., 2007). Novos agentes terapêuticos têm sido sugeridos para a sua terapêutica com o objetivo de aumentar a eficácia dos tratamentos convencionais e diminuir os diversos efeitos colaterais que debilitam ainda mais o paciente.

Atualmente tem sido utilizado como agente terapêutico de primeira linha para esta neoplasia o quimioterápico Temozolomida (TMZ). O TMZ tem demonstrado uma eficácia relativa para o tratamento de vários tipos de neoplasias, inclusive para os glioblastomas, aumentando a sobrevida do paciente por até um ano (BENT et al., 2006; SOFFIETTI et al., 2007; HART et al., 2008). O TMZ é uma agente alquilante de DNA similar as nitrosuréias, no entanto apresenta uma baixa toxicidade quando comparada a esses compostos. Esse quimioterápico sofre conversão espontânea em condições fisiológicas no princípio ativo 5-(3-methyltriazan-1-yl)imidazol-4-carboximida (MTIC), sendo rapidamente absorvido e não necessitando do metabolismo hepático para sua ativação (FRIEDMAN, KERLY, & CALVERT, 2000). Foi observado que baixas doses de aplicação deste composto reduzem o número de células T regulatórias circulantes dentro da massa tumoral (BANISSI et al., 2009).

Outras abordagens terapêuticas, ainda em fase experimental, foram sugeridas para auxiliar e melhorar os tratamentos convencionais para os glioblastomas. Sendo os principais as terapias com retinoides (VANDIER et al., 1998; CHAMBAUT-GUERIN et al., 2000; COSTA et al., 2001) fatores antiangiogênicos, como os VEGF, IFN- β e TFG- β (MERZKAK et al., 1994; HONG et al., 2000., FOLKINS et al., 2007), terapias moleculares (REARDON E WEN, 2007; LAKS et al., 2010), bem como com compostos derivados de plantas (KANDU et al., 2005; SCHECK et al., 2006, FERGUSON et al., 2006, SANTOS et al., 2011). Mais recentemente, Kahn et cols., 2016 demonstraram a eficácia do anti-hipertensivo prosazina na terapêutica para os glioblastomas, inclusive tratamento sendo utilizado em fase clínica e com resultados bastante promissor. Muitos

estudos *in vitro* apresentam resultados positivos quanto a citotoxicidade desses compostos, entretanto é importante considerar que as células tumorais dependem das células do microambiente adjacente para sua progressão.

2.3 Modelos de estudo dos tumores no snc

A realização de estudos *in vivo* permite uma compreensão mais ampla dos fenômenos relacionados a patogenia desses tumores. Modelos experimentais de alo- e xenoinplantes intracranianos de gliomas foram desenvolvidos em vários animais para a elucidação da biologia tumoral, bem como para verificar a eficácia de novos agentes terapêuticos. Essa metodologia simula com mais fidelidade as reações que ocorrem no microambiente do tumor (MICHAILOWSKY et al., 2002; GARCIA et al., 2014).

As técnicas evoluíram desde o seu primórdio na experimentação animal. Os primeiros experimentos utilizavam agulhas e estiletos para injetar células tumorais sem nenhum auxílio do aparelho estereotáxico. Este método apresentou falhas, pois não era quantitativo além de ser bastante impreciso. Desde então, Wilson et al. (1967), aperfeiçoaram essa metodologia com a padronização do número de células injetadas e implantação guiadas pela estereotaxia cerebral.

Diversas linhagens tumorais estão sendo utilizadas para produzir modelos de animais com neoplasias para assim estudar a biologia tumoral e eficácia terapêutica de agentes quimioterápicos. Os meios utilizados para a inoculação tumoral variam enormemente. Hasegawa et al. (1983) propuseram a injeção intracarotídea para simular um processo de metastização múltipla, inclusive no compartimento cerebral e Jamshidi et al. (1992) injetaram diretamente no parênquima cerebral, simulando uma neoplasia primária com a linhagem humana W256. As técnicas de inoculação de células tumorais no SNC em ratos ganharam destaque com a utilização da estereotaxia. Onde se determina uma área específica do encéfalo, bem como se adota um volume celular reduzido e concentrado, na qual aumenta a eficiência da implantação tumoral e reduz a metástase sistêmica (MORREALE et al., 1993).

A maioria dos modelos mostra uma eficácia acima de 90% na implantação tumoral. A concentração celular varia proporcionalmente com o desenvolvimento do tumor (FÉLIX, 2001), sendo fundamental o precoce desenvolvimento do mesmo no parênquima cerebral, além de manter as mesmas características de desenvolvimento no animal. É comum a utilização de ratos de mesmo sexo nos experimentos para evitar influências hormonais e dimorfismos sexuais (FÉLIX, 2001; COELHO, 2010).

A linhagem C6 mostra morfologia astrocítica e é largamente utilizada em experimentos de Neurobiologia. Essas células em cérebros de ratos Wistar apresentam características semelhantes aos glioblastomas humanos, como exemplo alta vascularidade e invasão parenquimatosa (COHEN et al., 1990). Por ser um glioblastoma murino a implantação ocorre precocemente, sendo esperada a existência do tumor na primeira semana após a sua inoculação com rara reação inflamatória no SNC devido a sua histocompatibilidade (OZEKI et al., 2010).

2.4 Plantas medicinais e compostos flavonoides

Segundo Silva (2010), toda planta que é administrada ao homem ou ao animal e que exerce sobre eles uma ação farmacológica pode ser chamada de planta medicinal. Estas plantas tem sido objeto de estudo no Brasil e no mundo na tentativa de descobrir novos fármacos fitoterápicos (YUNES et al., 2001). A intensa utilização de plantas pela população para fins medicinais reforça a idéia destes vegetais como uma rica fonte para obtenção de moléculas a serem exploradas terapêuticamente. Atualmente, muitos fármacos utilizados na medicina popular são derivados direta ou indiretamente de substâncias produzidas por plantas (SILVA, 2010).

A flora brasileira é rica em várias espécies utilizadas pela população (DISTASI et al., 2002) como plantas medicinais, através do conhecimento verbal passado por gerações. Suas aplicações são vastas abrangendo desde o combate ao câncer até aos microorganismos patogênicos (BALBACH, 1992; CRAGG et al.,

1993; PINTO et al., 2000; FRANCO & FONTANA, 2003; LORENZI & MATOS 2002; HOSTETTMANN, et al 2003; SILVA & CARVALHO, 2004).

A OMS no início da década de 1990 divulgou que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (SALATINO et al., 2007). No Brasil, bem como em outros países em desenvolvimento, utiliza-se intensamente as plantas na medicina popular (WOOD et al., 1999; De CLERCQ, 2000; VAN DER WATT & PRETORIUS, 2001), um conhecimento empírico que é transmitido pelas populações, em especial a do Nordeste, como parte da cultura popular. Dentre as principais plantas medicinais utilizadas pela população baiana merecem destaque as que pertencem ao gênero *Croton*. Este gênero é o segundo maior da família *Euphorbiaceae* e compreende mais de 700 espécies, das quais 300 são encontradas no Brasil e em especial na Bahia (GIULIETTI & QUEIROZ, 2006; SALATINO et al., 2007).

As plantas que pertencem ao gênero *Croton* têm sido objeto de vários estudos, pois apresentam diversos constituintes químicos, tais como terpenoides, diterpenos, triterpenoides, proantocianidinas, lignoides, alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, cumarinas, fenilbutanoides, óleos voláteis e vários compostos aromáticos com diversos efeitos biológicos comprovados por meio de estudos experimentais (PIETERS et al., 1995; BITTNER et al., 1997; LENCINA et al., 2001; BARBOSA, 2003; PALMEIRA JÚNIOR, 2005; SANTOS et al., 2005; SALATINO et al., 2007).

2.4.1. A espécie *Croton betulaster* Mull

A espécie *Croton betulaster* Mull (figura 4) também conhecida popularmente como “Velame” é um arbusto, que pode ser encontrado na região da Chapada Diamantina, desde a região de Grão Mogol até a Serra do Sincorá, no estado da Bahia no Brasil (STANNARD, 1995).

Na medicina popular, suas as folhas e raízes são utilizadas para diversos fins terapêuticos, tais como: cicatrizante, anti-inflamatória, combate a diarreia,

diabetes, reumatismo, sífilis, úlcera, tuberculose entre outras (BALBACH, 1992). Os flavonoides isolados da *Croton betulaster* têm sido identificados em outros membros da família *Euphobiaceae* revelando entre muitas outras funções biológicas uma atividade antitumoral. Das suas folhas já foram retirados extratos orgânicos, dos quais foram isolados terpenos, alcaloides, óleos essenciais e flavonoides como apigenina, acacetina, casticina, gencuanina, penduletina e 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona (BARBOSA, 1999; 2003).



Figura 3: Exsicata de *Croton betulaster* Mull, catalogada sob n° 031762, no Herbário Alexandre Leal Costa (IB-UFBA)

(BARBOSA, 1999).

2.4.2 Propriedades químicas e biológicas dos flavonoides

A relação entre consumo de frutas, legumes e verduras associadas com hábitos saudáveis pode contribuir para a prevenção de diversas doenças degenerativas, entre elas o câncer (BLOCK et al.,1992). Em uma pesquisa realizada a partir de dados epidemiológicos, concluiu-se que os flavonoides

encontrados nos vegetais oferecem grandes benefícios á saúde humana e podem contribuir para a melhoria da saúde pública através do aumento da sua ingestão.

Os flavonoides são compostos químicos naturais hidrossolúveis de baixo peso molecular que compõem uma classe de metabólitos secundários produzido pelas plantas. Podem ocorrer na forma livre (agliconas) ou conjugada a açúcares (glicosídeos). Esses compostos podem ser encontrados nos frutos, folhas, flores, sementes e são amplamente distribuídos no reino vegetal, basicamente nas angiospermas. Nos vegetais, os flavonoides desempenham diversas funções: nas folhas bloqueiam a radiação ultravioleta extrema, nas flores atuam como sinais visuais atraindo agentes polinizadores como pássaros e abelhas (RAVEN et al., 2001; YUNES & CALIXTO, 2001; LOPES et al, 2003).

Estruturalmente, os flavonoides englobam um grupo de compostos fenólicos complexos, de baixo peso molecular, com uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterocíclico oxigenado (C) como mostrado na Figura 4. Seu esqueleto básico é formado por 15 átomos de carbono e são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato, constituindo uma importante classe de polifenóis (ALVES, 2007; BARBOSA, 2003).

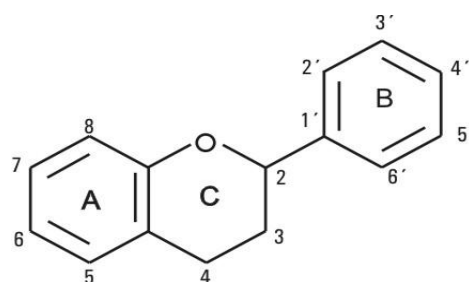


Figura 4: Estrutura básica dos flavonoides

(YUNES & CALIXTO, 2001)

De um modo geral, os flavonoides estão envolvidos nos mecanismos de defesa natural das plantas, além de participarem da dieta humana como constituinte de diversos alimentos, tais como: vinho tinto, frutas, óleo de oliva, chá, café e na maioria dos componentes de origem vegetal. O consumo diário destes compostos está em torno de 23 mg / dia das quais a maior parte é representada pela quercetina, especialmente devido à ingestão de alimentos como o chá preto,

cebolas, frutas e vinho tinto. Além disso, esses compostos são sintetizados exclusivamente pelos vegetais, onde desempenham atividades fundamentais para seu desenvolvimento (HERTOG et al., 1993; CARLO et al., 1999; YUNES & CALIXTO, 2001; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002) e defesa contra o estresse oxidativo e radiações ionizantes (SEIBERT et al., 2011).

Uma das propriedades biológicas dos flavonoides mais estudada é a sua atividade antioxidante nos seres humanos (DOK-GO et al., 2003; GUPTA et al., 2003; FRIEDMAM, 2007; YE, et al., 2007). Diversas pesquisas atribuem a esses compostos outras propriedades biológicas como ação antimicrobiana (KUETE et al., 2007; CAI et al., 2006; PANTEV et al., 2006; OZCELIK et al., 2006; MOLLER et al., 2006; FRIEDMAM, 2007), atividade analgésica, hepatoprotetora, antiulcerogênica, anti-hipertensiva, antialérgica, anti-inflamatória e antiangiogênica (FÓRMICA & REGELSON, 1995; TAN et al., 2003; BUKHARI, et al., 2007; NOONAM et al., 2007) e principalmente imunológica (SOLIMAN & MAZZIO, 1998).

O interesse pelas propriedades farmacológicas e bioquímicas dos flavonoides tem aumentado bastante, fato observado pela vasta literatura científica (IELPOA et al., 2000). Os resultados das pesquisas de diversos grupos, que exploram as mais variadas atividades biológicas dos flavonoides, tem sido promissores. Muitas delas estão em fase clínica, estimulando o estudo dos compostos naturais como fármacos alternativos na cura de diversas enfermidades.

A absorção dos flavonoides ocorre no trato gastrointestinal onde as agliconas fenólicas que são hidrofóbicas podem se difundir passivamente através de membranas biológicas. A absorção de flavonoides glicosilados é favorecida por bactérias presentes no intestino grosso que secretam glicosidases capazes de clivar resíduos de açúcar presentes nos glicosídeos. Os flavonoides absorvidos são sujeitos a várias reações que incluem metilação, sulfonação e glucuronidação levando a diversas formas conjugadas. Estas biotransformações encontram-se particularmente ativas no fígado, que é considerado como o órgão regulador do metabolismo dos flavonoides (MIDDLETON et al., 2000).

Devido à baixa solubilidade dos flavonoides agliconas em água, ao pouco tempo em que estas moléculas permanecem no fígado e ao seu baixo coeficiente

de absorção, é muito difícil ocorrer intoxicação aguda pelo consumo de flavonoides, exceto em situações raras de alergia. Dessa forma, a margem de segurança para o uso terapêutico em humanos é grande, favorecendo assim sua utilização no controle de processos patológicos (HAVSTEEN, 2002).

2.4.3. Efeitos antitumorais de flavonoides

O estudo dos flavonoides tem gerado resultados promissores em várias patologias. Diversas pesquisas *in vitro* utilizando flavonoides em vários tipos de câncer tem demonstrado uma promissora atividade antitumoral (HERTOG et al., 1992). Pesquisas realizadas por Haidara et al. (2006) sugerem que flavonoides podem induzir apoptose e parada do ciclo celular (G2M) em células de câncer de mama. A inibição da expressão de fatores de crescimento foi observada por Cheng et al. (2000) em células de câncer de próstata e mama expostas ao flavonoide silimarina. O mesmo resultado foi observado em estudo feito por Ling-Zhi et al. (2005) em células de câncer de pulmão A549 expostas ao flavonoide apigenina *in vitro*.

Brusselmans et cols. (2005) demonstraram que a presença significativa de apoptose em células de câncer de próstata expostos a flavonoides, fato este também observado em estudo feito por Singh e Argawal (2006) ao utilizar o mesmo tipo de célula exposta a compostos polifenólicos. Os flavonoides exerceram ainda importante atividade antitumoral em diversos tipos de câncer como: câncer de colo uterino, mama, ovário, cólon, próstata e leucemia (RICHTER et al., 1999; XIAO et al., 2001; FERGUSON et al., 2006; JING et al., 2007)

Ye et al. (2007) demonstraram a atividade antitumoral *in vitro* de flavonoides isolados de *Cleistocalyx operculatus* em células de câncer de fígado, câncer pancreático, carcinoma cervical humano, carcinoma de pulmão e leucemia crônica. Roy et al. (2007) observou inibição do crescimento e morte celular, identificada como apoptose, em células de leucemia pró mielocítica aguda (HL-60) expostas ao flavonoide bacaleina. Em outro trabalho, Zhang et al. (2005) constataram o efeito inibitório dos flavonoides cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina e malvidina na proliferação de células humanas cancerígenas, originadas em

diferentes partes do corpo, como estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central.

A estrutura molecular dos flavonoides tem sido indicada como responsáveis pelas suas diversas atividades biológicas. Sua estrutura permite modificações e associações com diversos radicais e ainda potencializa a sua interação com membranas celulares. Devido a isto, os flavonoides têm emergido como promissores fármacos na busca de alternativas, capazes de potencializar a ação convencional dos tratamentos utilizados no combate a doenças degenerativas e neoplasias que afetam o SNC (NONES et al., 2010)

Estudos feitos por Scheck et al. (2006) revelaram que flavonoides extraídos de *Scutellaria baicalensis* induzem inibição do crescimento em células de glioblastoma humano. Ferguson et al. (2006) demonstraram que flavonoides extraídos da amora induzem parada do ciclo celular em G1 e apoptose em glioblastoma humano. Braganhol et al. (2006) relataram em sua pesquisa que o flavonoide quercetina possui ação citotóxica sobre a linhagem U138MG de glioblastoma humano. Santos et al. (2011) observaram que o flavonoide rutina extraído da *Dimorphandra mollis* possui efeito diferenciador, indutor de apoptose e parada do ciclo celular em G1 nas células da linhagem GL-15.

Pesquisas revelaram que o flavonoide apigenina possui ação sobre diversos tipos de câncer entre eles câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de mama, carcinoma cervical e hepatoblastoma (ZHENG et al., 2005; BANDYOPADHYAY et al., 2006; KHAN et al., 2006; MAK et al., 2006; UJIKI et al., 2006). Este flavonoide já se mostrou como um indutor de apoptose em linhagens de glioblastomas humanos T98G e U87MG, mas não em astrócitos humanos (DAS et al., 2010) e tem um papel em inibir a produção do VEGF em células tumorais do pulmão (LI et al., 2005), além de ter inibido o crescimento, migração e produção de citocinas inflamatórias em células de glioma murino da linhagem C6 (COELHO et al., 2016).

Outros flavonoides extraídos da planta *Croton betulaster* apresentaram atividade antitumoral. Estudos realizados *in vitro* com o flavonoide casticina

demonstraram atividade antitumoral (KOBAYAKAWA et al., 2004; HAIDARA et al., 2006), bem como com o flavonoide penduletina (LI et al., 2005).

Estudos realizados com os flavonoides kampeferol, luteolina e quercetina demonstraram citotoxicidade para a linhagem de C6 e apresentaram uma proteção para as células normais contra a citotoxicidade induzida pelo peróxido (SEIBERT et al., 2011). O flavonoide epigallocatequina galato o principal constituinte do chá verde foi testado em varias linhagens de células de glioblastoma como U-373 MG, U87 MG e C6. Após 72 horas, teste de viabilidade celular por MTT, análise de apoptose por citometria de fluxo e alterações morfológicas observadas demonstraram reduções significativas na viabilidade celular das células moduladas em diferentes concentrações e pequenas doses foram capazes de induzir a apoptose (YOKOYAMA et al 2001)

Diversos tratamentos com compostos polifenólicos foram capazes de modificar a produção de óxido nítrico em cultura de células de glioblastoma murino C6. O óxido nítrico é um mediador químico que possui diversas funções biológicas, tais como: relaxamento muscular, lise de células tumorais e destruição de microorganismo. Sua síntese ocorre a partir da arginina e é catalizada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (LOWENSTEIN & SNYDER, 1992). Este gás tem sido responsável pela citotoxicidade tumoral e seu aumento pode ser regulado pelas células microgliais (HWANG, 2010). Vários compostos polifenólicos possuem essa capacidade de induzir a produção do NO, inclusive a apigenina (SOLIMAN & MAZZIO, 1998).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

A apigenina apresenta diferentes propriedades, dentre essas a capacidade em inibir o crescimento, induzir sua diferenciação e alterar a produção de citocinas angiogênicas e inflamatórias em linhagens de células derivadas de glioblastoma humano e murino. Nosso trabalho teve como hipótese que este flavonoide possui propriedades antitumorais e imunomodulatórias em células da microglia e glioblastoma. Para verificação destes fenômenos, utilizou-se modelos *in vitro* de cocultura e *in vivo* e ensaios específicos de migração, toxicidade em modelo *in vitro* e *in vivo*, alterando a viabilidade, a proliferação e a diferenciação destas células.

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar o efeito do flavonoide apigenina extraído da planta *Croton betulaster* Mull, na progressão tumoral e regulação de citocinas inflamatórias em modelos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos do flavonoide apigenina na viabilidade e diferenciação de células derivadas de glioblastoma murino da linhagem C6 e de glioblastoma humano da linhagem U-251 e de células tronco de glioblastoma da linhagem TG1 e OB1;
- Analisar os efeitos do flavonoide apigenina na viabilidade, ativação e modulação de expressão de fatores pró- e anti-inflamatórios em microglias isoladas e em cocultura com células de glioblastoma;
- Investigar o efeito do flavonoide apigenina na modulação da migração celular, como também no potencial quimiotático de microglias;
- Analisar a capacidade antitumorígenica do flavonoide apigenina em células de glioblastoma humano xenotransplantadas em ratos.

4. ARTIGO CIENTÍFICO I

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO FLAVONOIDE APIGENINA EXTRAÍDO DE *Croton betulaster* MULL NA INDUÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL E REGULAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DURANTE A INTERAÇÃO MICROGLIA/GLIOBLASTOMA

Resumo

INTRODUÇÃO E OBJETIVO: Durante a interação do glioblastoma/microglia, as células do sistema imune no SNC, tende a favorecer o crescimento e invasão das células tumorais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da apigenina na viabilidade, migração celular, morfologia e regulação de citocinas inflamatórias e quimiotaxia em culturas de células da microglia e em cocultura de microglia/glioblastoma da linhagem murina C6. **MÉTODOS E RESULTADOS:** Observamos que o flavonoide apigenina inibe a viabilidade celular de ambas as culturas nas concentrações de 50 e 100 μ M. Foram observadas alterações morfológicas nas células induzidas pelo flavonoide. Em condições controle, as células da microglia apresentaram uma morfologia radial e na presença do flavonoide apigenina, as células aumentam a expressão do fenótipo ameboide e do marcador microglial OX-42. Foram visualizadas também, pela microscopia eletrônica e por reação imunocitoquímica alterações no tamanho dessas células, formação de pseudópodos e liberação de citocinas inflamatórias, indicando mudança para o perfil M1, após a modulação com o flavonoide. Nas coculturas microglia/glioma tratadas com apigenina, foram observados aumento da quimiotaxia da microglia e ativação da sua função fagocítica em relação as células de glioma. As culturas de células da microglia e microglia/glioblastoma tratadas com apigenina apresentaram redução dos níveis de IL-10 e TNF e não foram observadas alterações nos níveis de NO, em ambas as culturas. O tratamento com o meio condicionado microglial tratado com apigenina reduziu a secreção de IL-6 e, conseqüentemente, a migração das células de glioma C6 em cultura. **CONCLUSÕES:** Esses resultados sugerem que o flavonoide apigenina inibe o crescimento, migração e secreção de citocinas pelas células tumorais da linhagem C6, além de induzir um aumento do perfil regulatório e fagocítico da resposta microglial em interação com glioblastoma, podendo contribuir no desenvolvimento de novas imunoterapias e estratégias terapêuticas contra os glioblastomas.

Palavras chaves: Flavonoide, Apigenina, Glioma e Microglia

4.1 INTRODUÇÃO

O glioblastoma é a neoplasia do sistema nervoso central (SNC) mais comum e agressiva que apresenta majoritariamente características de células gliais (HILDEBRAND et al., 1997). Sua alta proliferação celular, com características infiltrantes e invasivas, fazem com que estas neoplasias tenham uma grande recorrência após o tratamento (LOUIS et al 2016). Embora a abordagem terapêutica para estes tumores inclua diferentes estratégias, o tempo médio de sobrevida dos pacientes submetidos a ressecção, radioterapia e quimioterapia não ultrapassam os 18 meses na maioria dos casos (PRADOS & LEVIN, 2000).

A população de células na massa tumoral dos glioblastomas é diversificada (ANDERSON et al., 2008). Análises histopatológicas mostram uma grande quantidade de microglia no interior do tumor e a relação dessas células serve de prognóstico para o paciente (ROGGENDORF et al., 1996). Microglia são macrófagos residentes no SNC e a interação com os glioblastomas favorecem o seu crescimento e migração celular (ZHAI et al., 2011). A ativação controlada da microglia e sua propriedade imunológica podem contribuir para o desenvolvimento de imunoterapias eficazes para esses tumores cerebrais.

Flavonoides são compostos polifenólicos que possuem diversas propriedades biológicas, dentre as quais, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (IELPOA et al., 2010). A sua capacidade em inibir a proliferação de células tumorais é descrita em vários trabalhos em células tumorais de diferentes tipos, inclusive em gliomas (BRAGANHOL et al., 2006; DAS et al., 2010). Estas moléculas também mostraram-se como morfogênicas, indutoras de apoptose em células tumorais, além de não apresentarem toxicidade para as células normais do SNC (SILVA et al., 2008; SANTOS et al., 2011,2015; COELHO et al., 2015, 2016).

Alguns estudos demonstraram que o flavonoide rutina é capaz de liberar fatores tróficos como o TNF e ON em células glias normais (SILVA et al., 2008). Por outro lado, flavonoides extraídos da planta *Croton betulaster* têm a capacidade em inibir a produção de fatores angiogênicos como VEGF e TGF- β , e aumentar a expressão de marcadores de diferenciação neuronal e astrocitária em células de

gliomas humanos (FREITAS et al., 2010; NONES et al., 2010; COELHO et al., 2015).

Em um estudo mais recente Coelho et al., 2016 investigaram a citotoxicidade do flavonoide apigenina extraído da planta *Croton betulaster* Mull em termos de viabilidade, migração, diferenciação e secreção de citocinas inflamatórias em células de glioblastoma murino da linhagem C6. Nesse estudo nosso grupo também demonstrou uma sensibilidade maior das células de glioblastomas ao flavonoide do que as células astrocíticas normais.

A compreensão do papel dos flavonoides sobre o crescimento, viabilidade, morfologia e modulação de fatores associados à resposta inflamatória em células de glioma e durante a interação com células imunoefetoras como microglias poderá ser útil para o entendimento da biologia destes tumores e determinação de potencial antiglioma de flavonoides, contribuindo assim para o desenvolvimento de imunoterapias eficazes para o combate das neoplasias cerebrais. Neste contexto, buscamos investigar o efeito do flavonoide apigenina em células da microglia e em cocultura microglia/C6 em termos de crescimento, morfologia, migração e secreção de citocinas do perfil inflamatório destas células.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Cultura de glioblastoma C6

As células da linhagem C6 de glioblastoma de rato foram conservadas em uma solução de 90% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) à razão de 1×10^6 células/mL e estocadas em criotubos no nitrogênio líquido. Todos os experimentos foram realizados até a décima passagem de células e quando atingiam a confluência foram descoladas das placas de cultura por uma solução contendo 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS. Culturas de células confluentes, cultivadas em placas de 100 mm foram dissociadas utilizando-se uma solução de tripsina 0,05% e EDTA 0,02% diluídos em PBS, e replaqueadas em placas poliestireno de 4 cm de diâmetro, 24 poços, ou de 96 poços (TPP), em função do experimento, a uma densidade inicial de 2×10^5 células/cm² em meio

Dulbecco modificado (DMEM, Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,011 g/L de ácido pirúvico, 2 mM de L-glutamina, 100UI/mL de penicilina G e 7 mM de glicose, e incubadas a 37⁰ C em atmosfera úmida e controlada, contendo 5% de CO₂ , segundo protocolo já bem estabelecido por COSTA et al. (2001). Vinte quatro horas após a distribuição das células nas placas, estas foram tratadas com o flavonoide, diluído diretamente no meio de cultura, nas concentrações de 50 e 100 µM, e mantidas por um período de até 48 h, conforme o experimento.

4.2.2 Cultura de células microgliais

Para os procedimentos utilizando microglia foram utilizados ratos da linhagem Wistar, obtidos junto ao Biotério da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (Salvador, BA, Brasil) com acordo do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências da Saúde com protocolo nº027/2012.

Células da microglia foram obtidas a partir do córtex de ratos neonatos (0-2 dias). Após dissociação mecânica, as células foram dispostas em frascos de cultura de 75 cm² (TPP), previamente tratados com 50 µg/mL de poli-D-lisina (Sigma 27964-99-4), em meio DMEM suplementado com 33 mM de glicose, 2 mM de glutamina, 3mM de bicarbonato de sódio, 0,5 mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5 µg/ml de fungizona, com 6,25 µg/ml de gentamicina, 10% de soro equino (Gibco, Grand Island, NY) e 10% SFB (Cultilab,SP, Brasil). As células foram mantidas em cultura mista glial por até 10 dias. As células microgliais foram removidas a partir da cultura mista glial através de agitação a 1000 RPM durante 3 horas a 37°C Após o término da agitação o meio foi recolhido, centrifugado durante 10 min a 4°C a 1000 RPM, e as células, após contagem numa câmara de Newbauer, foram utilizadas nas diferentes abordagens experimentais.

4.2.2 Coculturas de microglias/glioblastoma C6

Para os experimentos de cocultura, as microglias foram cultivadas em conjunto com células tumorais de glioblastoma C6 (2:1 Microglia: célula C6)

durante 3 dias. Um dia após o lançamento da cocultura, o meio celular foi trocado para a eliminação dos debris celulares da cultura de microglia e em seguida, prosseguiu-se com mais dois dias para a realização dos experimentos.

4.2.3 O flavonoide apigenina e tratamentos

O flavonoide apigenina (figura 1 do artigo) foi extraído das folhas de *Croton betulaster* Mull obtidos e caracterizados no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais (Instituto de Química/UFBa), segundo protocolo estabelecido por Barbosa (2003). A caracterização das moléculas puras foi realizada por ressonância magnética nuclear do ^{13}C e ^1H , além de espectro infravermelho.

O composto foi obtido sob a forma de pó e dissolvido em DMSO, Sigma Chemical (Co) em solução estoque de 100 mM que foi mantida sob proteção da luz à -20°C (Barbosa, 1999a). A diluição final do reagente foi obtida no momento do tratamento diluindo-se a solução concentrada diretamente no meio de cultura. As células foram expostas aos flavonoides pelo período de 48 h nas concentrações finais de 50 e 100 μM . O meio de cultura com o veículo de diluição do flavonoide na maior concentração foi utilizado como controle (DMSO 0,1%). O controle negativo (CN) foi o tratamento realizado com o meio fresco sem adição de flavonoide e DMSO 0,1%.

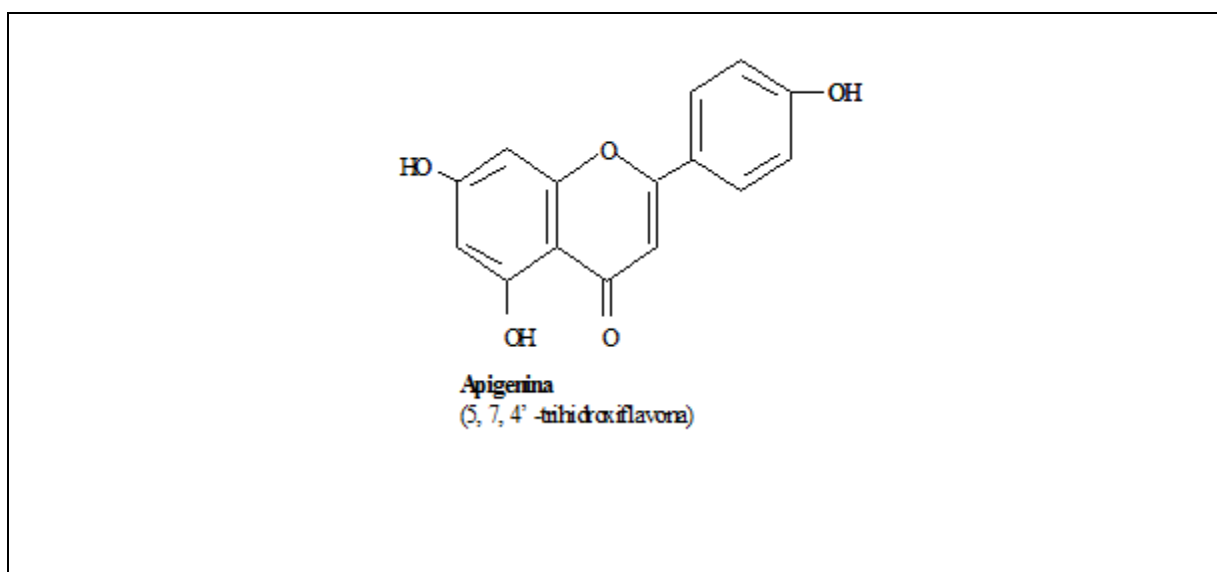


Figura. 1 Estrutura química do flavonoide apigenina da *Croton betulaster* Mull (BARBOSA, 2003).

4.2.3.1 Obtenção do meio condicionado

Culturas de microglia ou C6 cultivadas em meio DMEM contendo 10% de SFB foram submetidas a três lavagens cuidadosas e consecutivas com meio DMEM sem SFB e, em seguida, cultivadas com o mesmo meio. Após um período de 24 h as culturas foram tratadas com o flavonoide apigenina (50 e 100 μ M), com o veículo de diluição do flavonoide (DMSO 0.1%), ou com meio fresco e mantidas em estufa por um período de 24 h. Depois de decorrido este período o meio condicionado das culturas foi coletado, centrifugado por 5 minutos a 1500 RPM e posteriormente armazenado em freezer a -70°C até ser utilizado.

4.2.4 Análise da viabilidade e proliferação celular (MTT)

O teste de redução dos sais de Tetrazólio (MTT) é realizado por uma dosagem colorimétrica utilizada para medir a viabilidade, proliferação e a atividade celular (HANSEN et al., 1989). Seu princípio baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais de células vivas em converter o brometo de 3-(dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) um substrato amarelo em cristais de formazan de cor violácea (produto). As células cultivadas em placas de 96 poços foram expostas ao flavonoide apigenina 48 h. Depois de decorrido o tempo de exposição, o meio de cultura foi desprezado e foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços 100 μ l de uma solução de MTT (Sigma, M2128) em meio DMEM (Cultilab) a uma concentração final de 1mg/mL. As células foram incubadas em estufa controlada a 37°C , 5% de CO_2 por 2 h. Em seguida, foram adicionados 100 μ L/poço de um tampão de lise, contendo 20% de SDS e 50% de DMF, pH 4,7, sendo a placa incubada em seguida por 12 h a 37°C , para a dissolução completa dos cristais de formazan. A absorção óptica de cada amostra em octuplicata foi feita a um comprimento de onda de 490 nm, utilizando o leitor de microplaca THERMO PLATE modelo TP-reader. O tamanho da amostra (n) para cada grupo foi de oito (8) e os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram apresentados como a porcentagem da viabilidade (média e desvio padrão) em relação ao controle com DMSO (0,1%) considerado como 100%.

4.2.5 Alterações morfológicas

4.2.5.1 Microscopia por contraste de fase

Os efeitos do flavonoide apigenina sobre a morfologia celular foi observada inicialmente por microscopia de contraste de fase. Após 48 h de exposição à apigenina nas concentrações de 50 e 100 μM , e ao controle DMSO 0,1% foram analisadas em microscopia com contraste de fase, com filtro verde (Nikon TS-100) e em seguida, fotografado por uma câmera digital (Nikon E-4300). Foram analisadas 10 fotos para cada tratamento em três experimentos independentes.

4.2.5.2 Coloração Rosenfield

As células foram semeadas em placas de cultura de poliestireno (Cultilab, SP, Brasil) de 35 mm de diâmetro, conforme já descrito. Após o período de tratamento, as células foram lavadas três vezes com PBS, fixadas e permeabilizadas com metanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. As células fixadas foram coradas segundo protocolo estabelecido por Rosenfeld (1947). O reagente de Rosenfeld foi adicionado às placas contendo as células previamente tratadas em volume suficiente para cobrir completamente o tapete celular. Decorridos 3 min, foram adicionados 20 gts de água destilada à solução corante, deixando agir por 20 min em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com água corrente em pequeno fluxo, secas ao ar, analisadas por microscopia óptica (Nikon TS-100) e fotografadas por uma câmera digital (Nikon E-4300).

4.2.5.3 Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica

As alterações ultraestruturais em micróglia tratadas após 48 h com o flavonoide apigenina 50 e 100 μM 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 diluído em DMEM durante 48 h. 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 0,1 M tampão de cacodilato de sódio), com intervalos de 5 minutos para cada centrifugação a 12800 rpm. Em seguida, as

amostras foram desidratadas em acetona nas concentrações de 30 a 100% em intervalos de 10 min para cada concentração. Após a desidratação, o material passou em 100% de acetona + resina epóxi (1:1, v/v) durante 24 h, 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.

4.2.6 Análise imunocitoquímica da expressão das proteínas IBA1, OX-42, CD68 e CD206

Após exposição ao flavonoide apigenina nas concentrações finais de 50 e 100 μ M após 48 h, o meio de cultura foi desprezado e os poços com tapete celular foram lavados por três vezes com PBS em pH 7,4. As células foram então fixadas e permeabilizadas com metanol durante dez minutos a -20°C . O excesso de metanol foi desprezado e as placas ficaram em repouso, abertas, até completa evaporação e secagem do metanol. A seguir as células foram reidratadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,2% e bloqueadas com PBS/BSA 5% por 1 h e incubadas com o anticorpos IgG policlonais para proteína IBA-1 produzidos em coelhos (1:300, Abcam), anticorpos IgG monoclonais para proteína OX-42 produzidos em camundongos (1:300, Santa Cruz), anticorpos IgG monoclonais para proteína CD68 produzidos em ratos (1:100, Invitrogen), ou com anticorpos IgG monoclonais para proteína CD206 produzido em camundongos (1:100, invitrogen) durante a noite em câmara úmida a 4°C . Decorrido o tempo de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e incubadas com o anticorpos IgG secundários, produzidos em camundongos contra IgG de coelho, de camundongo ou de rato, conjugados à fluoresceína diluído em PBS na proporção de (1:500; Boehringer, Mannheim, Germany), sob agitação lenta, por 2 h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA fluorescente 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 10 min à temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS e

analisadas por microscopia de fluorescência Olympus BX-2; Olympus, Melville, New York, USA e fotografadas. Para todas as reações, os controles negativos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos, com exceção da incubação no anticorpo primário. Para cada condição foram analisadas 10 fotos de três experimentos independentes e em seguida quantificada no Photoshop .

4.2.7 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 das células de microglias e das coculturas tratadas com o flavonoide apigenina após 48 h 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 min 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). Os resultados foram expressos em pg/mL. Foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada uma das variáveis experimentais.

4.2.8 Análise das citocinas pró e anti-inflamatórias pelo teste de ELISA

A produção das citocinas TNF, IL-10 e IL-6 pelas células de microglia e coculturas foram detectadas no sobrenadante do cultivo celular em condições controle com DMSO 0,1% ou tratadas com o flavonoide apigenina nas concentrações de 50 e 100 μM após 48 h de tratamento, utilizando-se o ensaio imunoenzimático tipo ELISA “Sanduíche” (Quantikine, R&D Systems Minneapolis MN) segundo instruções do fabricante. Amostras dos sobrenadantes do cultivo celular e amostras dos padrões fornecidos pelo fabricante foram utilizadas a temperatura ambiente. Foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada uma das variáveis experimentais.

4.2.9 Ensaio de Migração com Meio Condicionado Microglial

Para avaliar o potencial do meio condicionado da microglia modulado com o flavonoide apigenina em inibir a migração das células C6 foi realizado um ensaio em monocamada celular. As células tumorais C6 foram plaqueadas em placas de 24 poços (TPP) a uma concentração de 5×10^3 células/cm². Após a formação de uma monocamada celular confluyente por um período de 48 h, foi promovida uma lesão uniforme na placa de cultura com o auxílio de uma ponteira de 200 µl estéril. Em seguida, realizou-se uma lavagem nas células com PBS estéril, para retirar as células desprendidas durante a lesão. Então, as células foram tratadas com os meios condicionados da microglia modulados com o flavonoide apigenina e o controle DMSO 0,1% e após 24 h e 48 h foram fotografadas no microscópio de contraste de fase. Em seguida, os meios das culturas foram coletados para dosagem de citocinas. O cálculo da área de lesão foi realizado com o auxílio do programa Adobe Photoshop (Adobe Systems).

Foram realizados três experimentos independentes e em triplicata para cada uma das variáveis experimentais.

4.2.10 Ensaio de Quimiotaxia

Para os ensaios de quimiotaxia, as células C6 foram semeadas em placas de 24 poços numa densidade de 5×10^3 células/cm². Após o plaqueamento, as células foram expostas ao flavonoide nas concentrações de 50 e 100 µM e controle DMSO 0,1% por 24 h. O controle positivo para este teste foi o meio de cultura contendo DMSO 0,1% e SFB 10%. Decorrido este tempo as células de microglia foram adicionadas (1×10^4 células/cm²) na proporção de 2:1 (microglia:C6) (KOSTIANOVSKY *et al*, 2008), na parte superior das microcâmaras (Millipore 24 Well Millicell), previamente revestidas com 20 µg/mL de fibronectina (Sigma, St. Louis, MO). As células da microglia foram mantidas separadas das células tumorais C6, por membrana de policarbonato com poros de 8 µm de diâmetro, (LEE, 2011) durante 24 h, afim de observar se as microglias migravam para as culturas de gliomas induzidas pelos flavonoides (GLYINN *et al*, 2008). O ensaio foi feito em triplicata para cada uma das variáveis experimentais. Após 24 h de incubação, as microglias que não migraram foram removidas da câmara superior com um swab, a membrana de policarbonato da cada inserto foi removida, e as células que

migraram para a superfície inferior da membrana foram fixadas com 3,7% formaldeído durante 10 minutos e coradas com 0,2% de cristal violeta. O número de células emigradas para a parte inferior do filtro foi quantificada, considerando 10 campos aleatórios por dois avaliadores. Os resultados foram expressos como o número de microglia por campo.

4.2.11 Análise estatística

Para determinar a diferença estatística entre os grupos foi realizado teste *One Way ANOVA* com pós-teste de Newmann-Keuls (*GraphPad Prisma 4.0* - California, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média +/- desvio padrão.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efeito do flavonoide sobre a viabilidade celular

Para verificar o efeito do flavonoide apigenina sobre as células da microglia e na cocultura microglia/glioblastoma C6 foram realizados teste de MTT e fotografias por contraste de fase nas culturas de células. Foi verificado que após 48 h de tratamento a apigenina reduziu a viabilidade celular da microglia em $59,75\% \pm 0,79\%$ e $47,35\% \pm 2,97\%$ nas concentrações de 50 e 100 μM , respectivamente quando comparado com a condição controle (DMSO 0,1%) (Fig. 2 A-C e G). Nas coculturas o efeito citotóxico da apigenina foi evidenciado em maior quantidade quando comparado com as microglias isoladas. Naquelas culturas a redução foi de $74,96\% \pm 2,73\%$ e $77,35\% \pm 0,36\%$, após o tratamento nas concentrações de 50 e 100 μM , respectivamente, quando comparado com a condição controle (DMSO 0,1%) (Fig 2 D-F e H). Em seguida, após a imunomarcção para IBA-1, marcador microglial, foi possível verificar a proporção destas células nas coculturas. Neste sentido, após 48 h de tratamentos, em condições controle (DMSO 0.1%) a proporção de células de glioma C6 foi de 72%. Em contrapartida, após a modulação com o flavonoide nas concentrações de 50 e 100 μM , a proporção de células C6 foi de 39% e 23%, respectivamente (Fig. 3 A-D), indicando assim, uma

maior sensibilidade das células de glioblastomas diante do tratamento com a apigenina.

4.3.2 Alterações morfológicas

Os efeitos do flavonoide apigenina sobre as células da microglia em termos de morfologia celular foram observados através da microscopia por contraste de fase, marcação imunocitoquímica, coloração de Rosenfield e por microscopia eletrônica. Por 48 h de tratamento com o flavonoide apigenina nas concentrações de 50 e 100 μ M ocorreu uma redução do número de células, bem como alterações em seu fenótipo celular. Quando comparadas com as condições controle (DMSO 0,1%) a microglia alterou sua morfologia radial típica de microglia inativada para um fenótipo ameboide (Fig. 2 A-C). Nas coculturas, após a modulação sob as mesmas concentrações e condições, as microgliais não apresentaram nenhuma alteração morfológica, no entanto, ocorreu uma diminuição de 70 e 80 % da população de células tumorais (Fig. 3 A-D).

Estas alterações foram melhores visualizadas após a imunomarcação com a proteína estrutural de microglia IBA-1, onde nas condições controle (Fig. 4A) apresentou uma marcação contínua em todo o citoplasma e muitas células mostraram-se com uma morfologia radial. Após o tratamento com a apigenina 50 μ M (Fig. 4B) a marcação mostrou-se mais na área perinuclear e a proporção de células sem as projeções radiais foram aumentadas, como mostrado nas setas brancas (Fig. 4 B e C). Em seguida, foi realizada uma quantificação das células com morfologia ameboide e foi verificada uma proporção de 54% de células com um fenótipo ativado (Fig 4 D). Para comprovar o efeito ativador da apigenina, uma marcação para OX-42 foi realizada nas células, sendo que a proporção de células positivas a este marcador foi 36% no tratamento com a apigenina e em menos de 10% para o tratamento controle (Fig 4 H). O efeito morfogênico da apigenina na cultura de microglia foi também evidenciado através da coloração de Rosefield. Em condições controle as células apresentaram-se ramificadas (Fig. 4 L), entretanto, após a modulação com a apigenina, as células mostraram-se menos ramificadas e com um perfil ameboide (Fig. 4 M e N).

Alterações ultraestruturais nas culturas de microglias após 48 h de tratamento com o flavonoide apigenina foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. A análise da morfologia microglial indicou que após o tratamento com 50 μM as células apresentaram um aumento de volume celular e das organelas citoplasmáticas, bem como com o aumento do número de pseudópodos (Fig 3 J). Entretanto, nas culturas tratadas com o flavonoide a 100 μM houve uma redução do tamanho da célula e do núcleo, sugerindo toxicidade (Fig 3 I).

4.3.3 Ativação microglial

Para verificar a capacidade fagocítica das microglias após a modulação com a apigenina foi realizada uma imunocitoquímica com IBA-1, que marca somente as microglias, a fim de observar a interação da microglia com as células de glioblastomas. Como mostrado na figura 5 B, em condições controle as microglias apresentam-se distantes das células tumorais e a proporção destas células é muito maior, tendo em vista a ausência da marcação para o IBA-1. Entretanto, após a modulação com o flavonoide, em ambas as concentrações, foram observadas uma maior interação das microglias com os gliomas, como também uma redução na quantidade de células de glioblastoma (Fig. 5 C-D).

Além disso, foi verificado um aumento de 42% e 57% na quantidade de microglia com o fenótipo fagocítico, após o tratamento com 50 e 100 μM de apigenina, respectivamente (Fig 5).

4.3.4 Regulação de perfil imunológico

A verificação da polarização de macrófagos para o perfil M1 e M2 é uma grande ferramenta nos estudos imunofarmacológicos. Neste sentido, para verificar a polarização das microglias, após a modulação com o flavonoide apigenina, foi feita uma imunocitoquímica para as proteínas CD68 e CD206, marcadores de macrófago/microglia do perfil M1 e M2, respectivamente, como também foi dosados citocinas do perfil inflamatório e regulatório.

Foi observado pela intensidade de fluorescência que, em condições controle, as microglias apresentaram uma polarização para o perfil M2, tendo em vista que a

imunomarcação mostrou-se diminuída para a proteína CD68 (Fig. 6 A) e aumentada para a proteína CD206 (Fig. 6 D). No entanto, quando as células foram expostas nas concentrações de 50 e 100 μ M foi evidenciada uma inversão na proporção de expressão destes marcadores, indicando uma polarização para o perfil M1 após 48 h (Fig. 6 B-F).

Vários estudos têm atribuído aos flavonoides uma atividade inflamatória. Buscando investigar um possível potencial inflamatório da apigenina neste modelo de estudo os níveis do Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interleucina-10 secretados pelas células no meio de cultura foram quantificados através do ELISA sanduíche após 48 h dos tratamentos. Os níveis de TNF no controle com DMSO 0,1% foram de $126,43 \pm 1,98$ μ g/ml. Nas culturas de microglia expostas ao flavonoide apigenina na concentração de 50 μ M, os níveis da citocina inflamatória TNF aumentaram para $279,82 \pm 3,75$ μ g/ml, enquanto que naquelas culturas exposta à concentração de 100 μ M os níveis de TNF diminuíram para $79,43 \pm 2,51$ μ g/ml (Fig 6 G). Nas coculturas ocorreram uma diminuição da citocina TNF de $236,87 \pm 2,13$ μ g/ml nas condições controle DMSO 0,1%, para $116,24 \pm 3,01$ μ g/ml e $98,73 \pm 1,91$ μ g/ml nos tratamentos com apigenina a 50 e 100 μ M, respectivamente (Fig. 6 J). De maneira semelhante, ocorreu uma diminuição na secreção da citocina regulatória IL-10 após a exposição das culturas (microglia e cocultura) ao flavonoide nas concentrações de 50 e 100 μ M (Fig 6 H e 6 K).

4.3.5 Regulação de fatores tróficos

A mensuração de nitrito pelo método de Griess revelou que após a exposição ao flavonoide apigenina, as células tiveram uma alteração nos níveis de óxido nítrico (NO). Nas culturas de microglia isoladas não ocorreu variação significativa nos níveis de nitrito (Fig. 6 I). Em contrapartida, nas coculturas quando tratadas com o flavonoide em ambas as concentrações de 50 e 100 μ M apresentaram diminuição de 0,1 μ g/ml na produção de NO em relação ao controle DMSO 0,1% (Fig 6 L).

4.3.6 Efeitos migratórios do meio condicionado microglial em células de glioma

Os gliomas apresentaram uma grande capacidade migratória e as células da microglia influenciaram estas células neste mecanismo. A ação do flavonoide apigenina sobre a migração de células de glioma C6 foi investigada em culturas de células de glioblastoma submetidas ao meio condicionado de culturas de microglia (MCM) previamente tratadas com o flavonoide apigenina (50 e 100 μ M, MCMA50 e MCMA100, respectivamente). Na condição controle DMSO 0,1%, desde 24 h após o início do experimento, é possível visualizar células C6 migrando para a zona de lesão da monocamada, e o fechamento quase que completo ao final do tempo de 24 h (Fig. 7 D). O efeito migratório foi evidenciado em maior quantidade e de forma mais rápida quando as células foram tratadas com DMSO 0,1% contendo SFB 10% (controle positivo), resultando no fechamento total ao final das 24 h de tratamento (Fig. 7 C). Entretanto, a exposição das culturas de glioblastoma aos MCMA50 e MCMA100 inibiu a migração de células para a área lesionada desde 24 h após o tratamento (Fig. 7 I).

Buscando investigar os fatores que influenciaram a migração das células tumorais, após a modulação com o meio condicionado da microglia por 48 h, o sobrenadante da cultura foi coletado e dosado a citocina IL-6, cujo papel modulador da migração de células de glioblastoma já é conhecido. Como mostrado na figura 6 K as culturas de células de glioma que foram moduladas com o meio condicionado contendo SFB 10% (controle positivo) apresentaram níveis elevados de $434,76 \pm 3,02$ μ g/ml desta citocina no meio de cultura celular, quando comparado ao controle (DMSO 0,1%) de $223,41 \pm 2,78$ μ g/ml. Em contrapartida, os níveis da citocina IL-6 nas células que receberam o meio condicionado pré-tratado com apigenina nas concentrações de 50 e 100 μ M (MCMA50 e MCMA100), mostraram-se diminuídos para $69,35 \pm 0,73$ μ g/ml e $87,14 \pm 1,23$ μ g/ml, respectivamente. Os níveis de nitrito foram também dosados nestas condições e, com exceção das células tratadas com DMSO + SFB 10%, os níveis de NO não tiveram alterações após o tratamento com o flavonoide (Fig. 7 J).

4.3.7 Ensaio de proliferação

O efeito da apigenina na proliferação celular das células de microglia tratadas com o meio condicionado das células de C6 (MCC6) foi avaliado utilizando

o ensaio de incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), que ocorre durante a síntese de DNA em células que estão em proliferação.

As células de microglia quando foram moduladas com MCC6 em condições controle (DMSO 0,1%), apresentaram uma proliferação aumentada (Fig. 8 A). No entanto, as microglias ao serem expostas ao meio condicionado das células de C6 tratadas com apigenina a 50 e 100 μ M (MCC6A50 e MCC6A100) tiveram uma diminuição da proliferação celular, evidenciada pela ausência de marcação do BRDU (Fig. 8 D e G). Observamos também uma capacidade morfogênica dos MCC6A50 e MCC6A100 nas células de microglia, em que se observa a marcação mais dispersa ao redor do citoplasma e as células com uma morfologia radial (Fig. 8 E e I). Em contrapartida, nas condições controle as microglias tratadas com o meio condicionado mostraram-se com a morfologia ameboide, sugerindo uma ativação microglial (Fig. 8 C).[

4.3.8 Efeitos quimiotáticos

Ensaio de quimiotaxia em culturas de células C6 previamente tratadas com os flavonoides revelaram que 24 h após a interação com microglia em sistema *Transwell* houve um aumento na proporção de células na membrana e atingiram a câmara inferior, quando comparado com o controle DMSO 0,1%. Como era de se esperar nas culturas crescendo na presença de meio com DMSO 0,1% contendo SFB 10 % (controle positivo) houve em efeito quimiotático maior para a microglia em relação à migração com o controle DMSO 0,1% (Fig 9 A e B), Em condições controle (DMSO 0,1%) poucas microglias migraram para camada inferior. No entanto, o tratamento das células com o flavonoide apigenina induziu efeito quimiotático sobre atração para as células da microglia (Fig. 9 C e D). A análise quantitativa dos ensaios de quimiotaxia mostrou um aumento significativo da migração da microglia de forma dose-dependente aos tratamentos com apigenina (50 e 100 μ M) (Fig. 9 E).

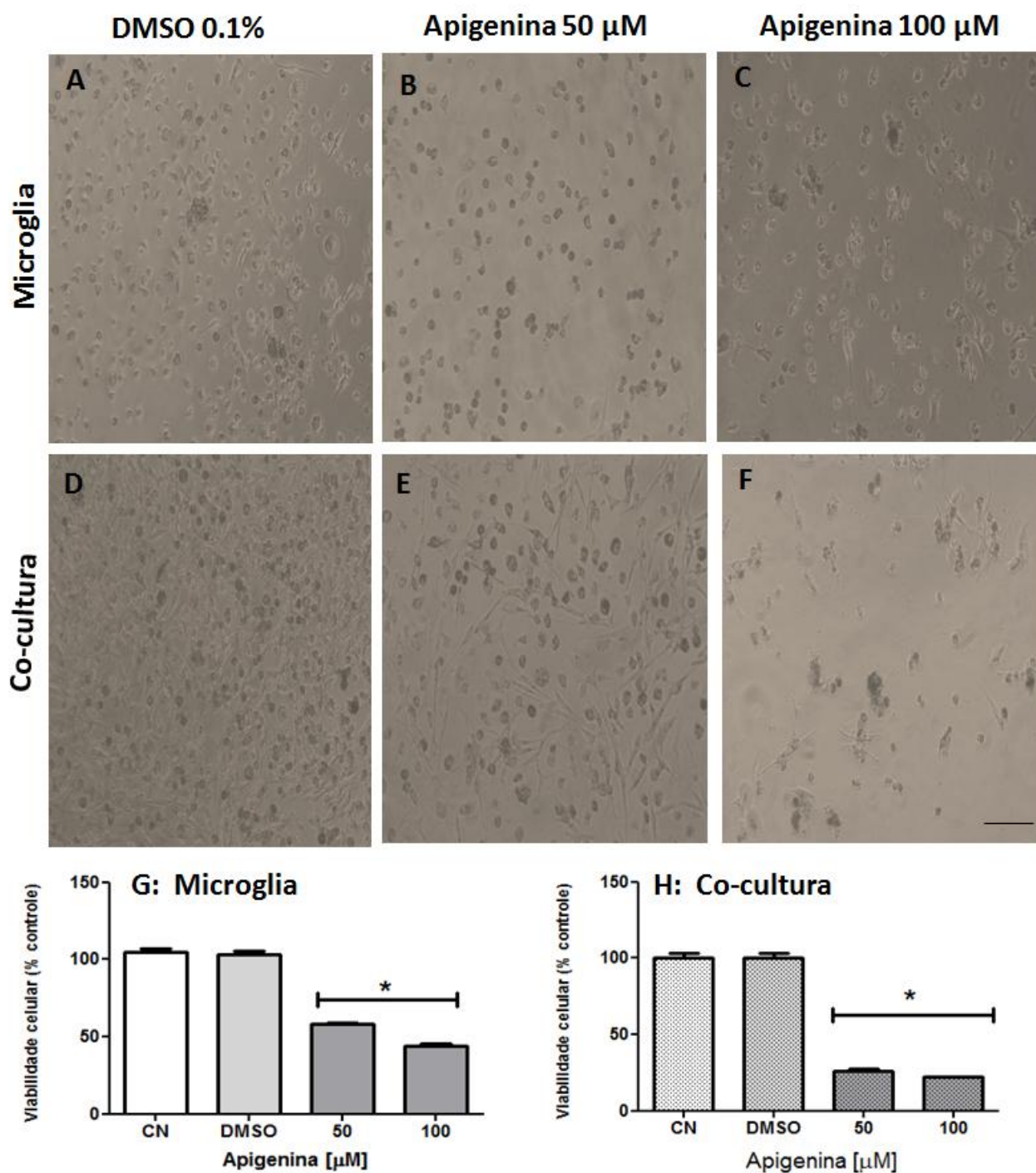


Figura. 2. Efeito do flavonoide apigenina sobre a viabilidade de células microgliais e cocultura de microglia/glioma C6 após 48 h de tratamento. Microscopia por contraste de fase de culturas de microglia (A-C) e cocultura microglia/glioma C6 (D-F) nas condições controle (DMSO 0,1%) (A e D) e tratadas com apigenina nas concentrações de 50 μM (B e E) e 100 μM (C e F). Viabilidade celular medida através do teste do MTT em cultura de microglia e cocultura em condições controle negativo (CN), controle com DMSO 0,1% (DMSO), apigenina 50 e 100 μM após 48 h de tratamento (G-H). Resultados expressos em média ± desvio padrão em relação ao controle DMSO 0,1% considerado como 100% de viabilidade celular. * P < 0.05 em relação ao DMSO 0,1%. Objetiva 40 X e barra de escala= 100 μm.

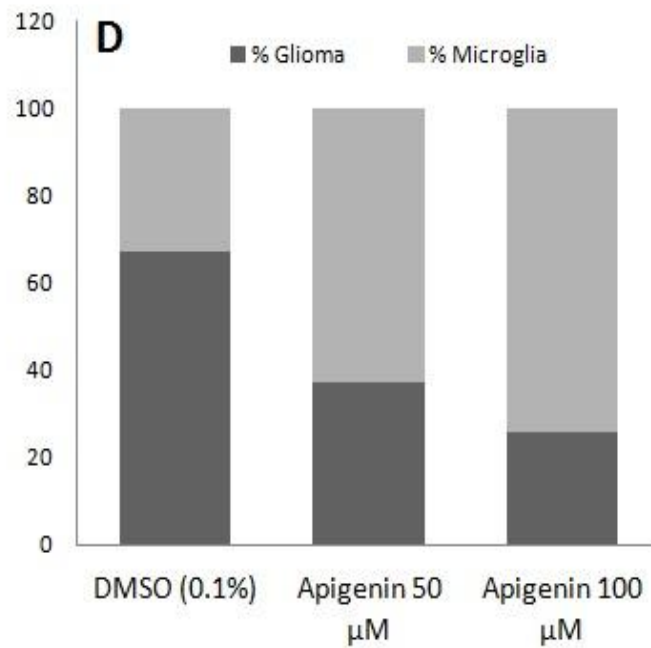
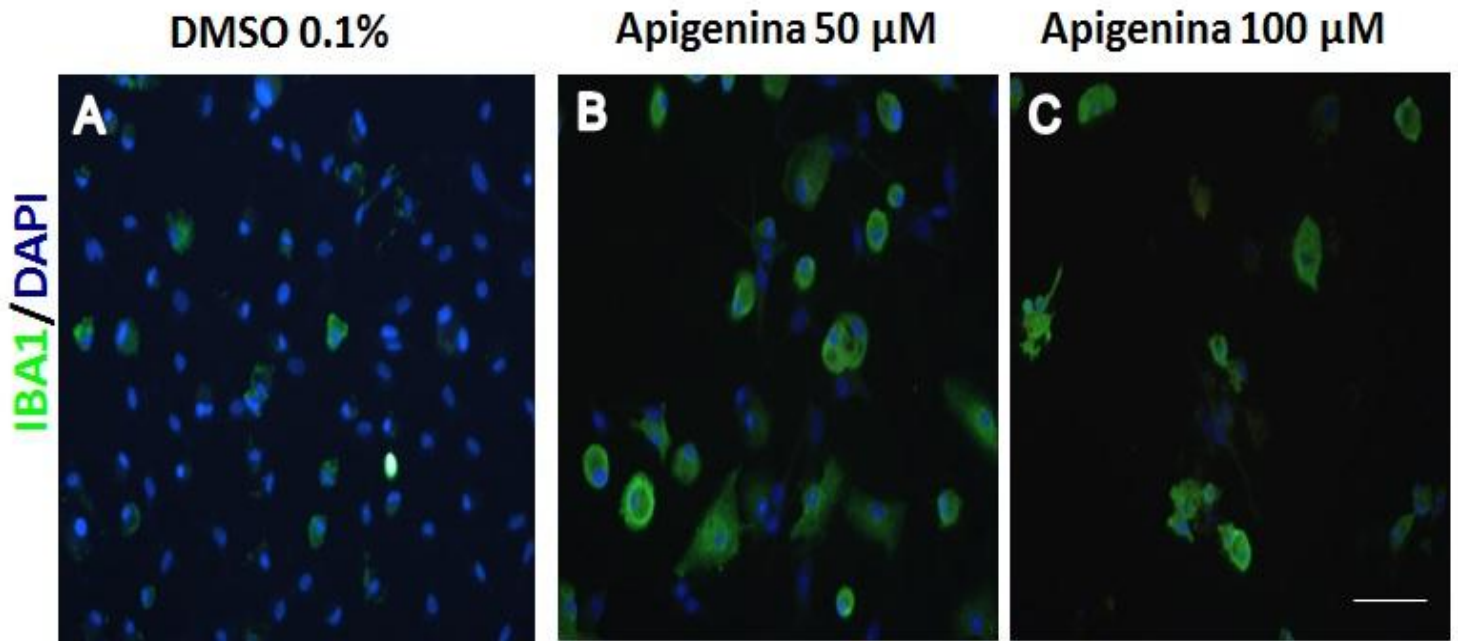


Figura 3- Marcação imunocitoquímica para IBA-1(em verde) e DAPI (em azul) em co-culturas microglia/glioblastoma C6 em condições controle (DMSO 0,1%) (A), tratadas com apigenina 50 μM (B) e apigenina 100 μM (C). Contagem de células positivas para IBA1 em co-cultura (D). Resultados expressos em relação ao controle DMSO 0,1%, considerado como 100%. (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido). Objetiva 40 X e barra de escala= 100 μm .

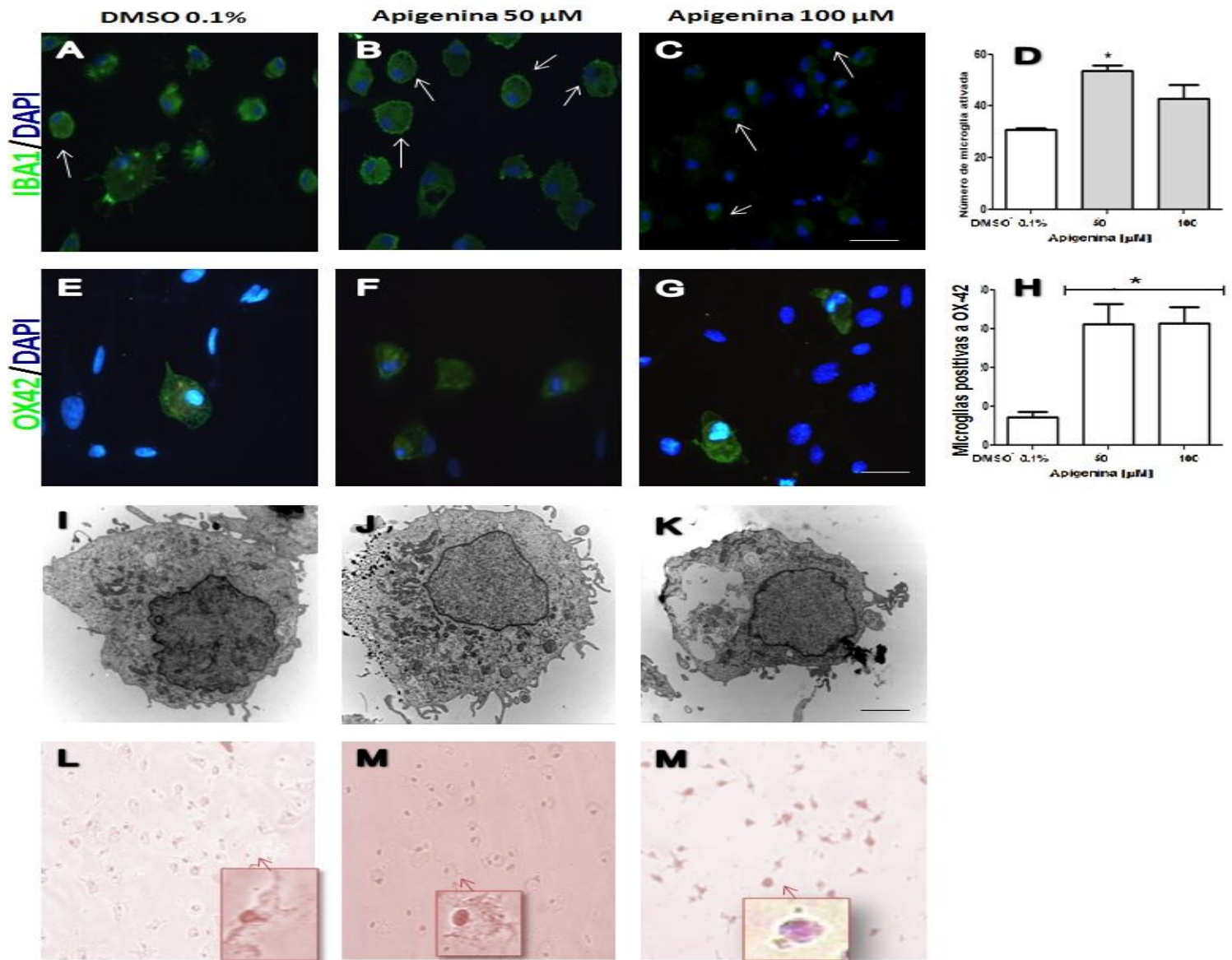


Figura 4- Efeito do flavonoide apigenina sobre a morfologia de células microglicais após 48 h de tratamento. Marcação imunocitoquímica para IBA-1(em verde) e para DAPI (em azul) em condições controle (DMSO 0,1%) (A), após tratamento com apigenina nas concentrações de 50 μ M (B) e 100 μ M (C). Contagem de microglicias ativadas com morfologia ameboide (D). Marcação imunocitoquímica para OX-42 (verde) e para DAPI (azul) em condições controle (DMSO 0,1%) (E) e após tratamento com apigenina nas concentrações de 50 μ M (F) e 100 μ M (G). Contagem de microglicias positivas à proteína OX-42 (H). Microscopia de transmissão de microglicias em condições controle(DMSO 0,1%) (I) e após tratamento com apigenina nas concentrações de 50 μ M (J) e 100 μ M (K). Coloração de Rosenfield de microglicias em condições controle (DMSO 0,1%) (L) e após tratamento com apigenina nas concentrações de 50 μ M (M) e 100 μ M (N). Maior aumento nas figuras objetiva 400 X. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. (*) $p < 0.05$ em relação ao controle DMSO 0,1%. (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido). Setas mostram células com morfologia ameboide. Objetiva 40X e barra de escala= 100 μ m.

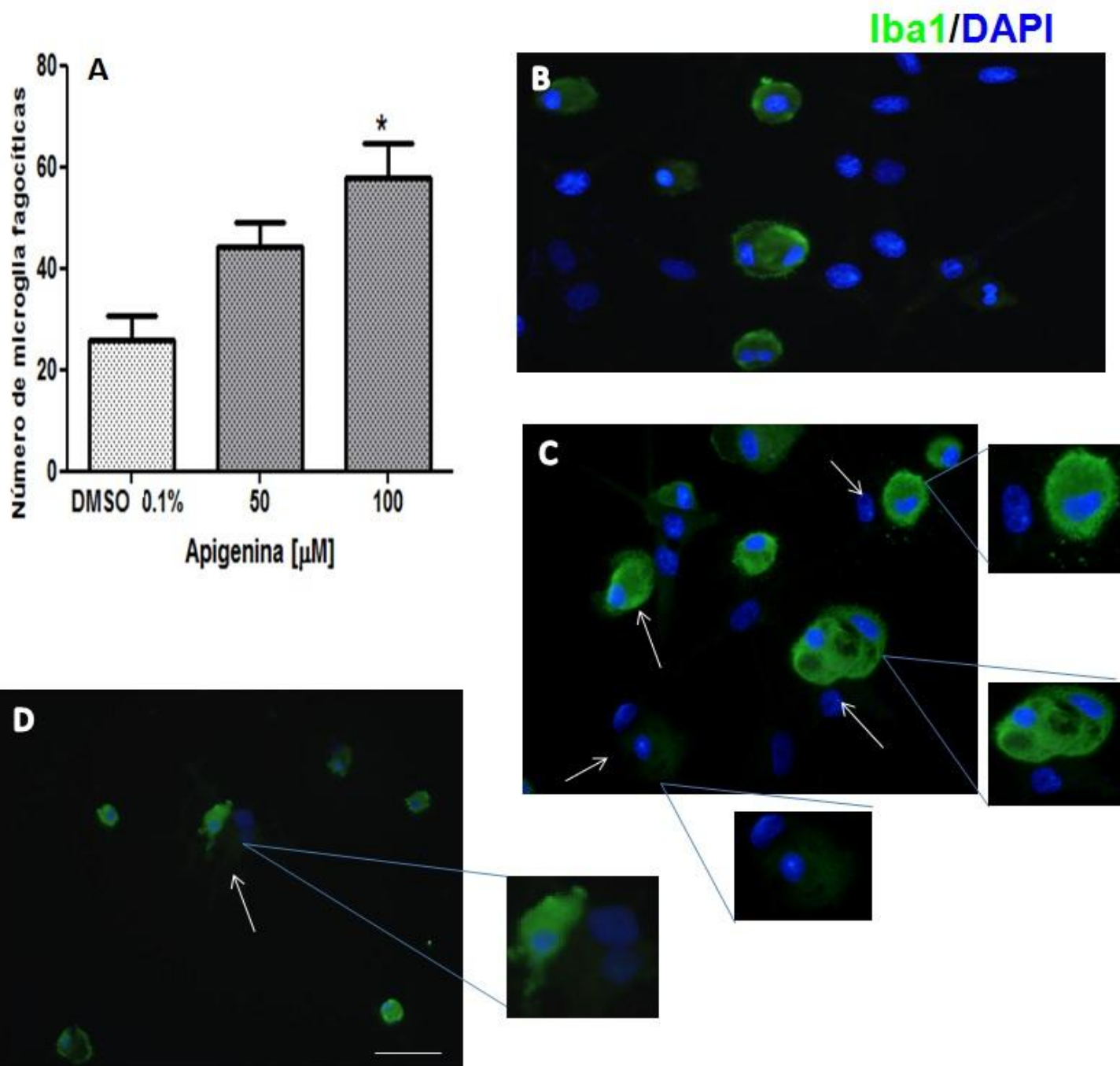


Figura 5 – Efeito do flavonoide apigenina sobre a capacidade fagocítica das microglias em cocultura microglia/glioblastoma C6 após 48 h de tratamento. Contagem de células com morfologia fagocítica em condições controle (DMSO 0,1%), tratadas com apigenina nas concentrações de 50 μM e 100 μM . (A) imunocitoquímica para IBA-1 (em verde) e DAPI (em azul) em coculturas microglia/C6 em condições controle (DMSO 0,1%) (B), e tratadas com apigenina 50 μM (C) e 100 μM (D). Maior aumento com a objetiva 63 X mostra a microglia fagocitando a C6. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. (*) $p < 0.05$ em relação ao controle DMSO 0,1%. (DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol diidroclorido). Objetiva 40 X e barra de escala= 100 μm .

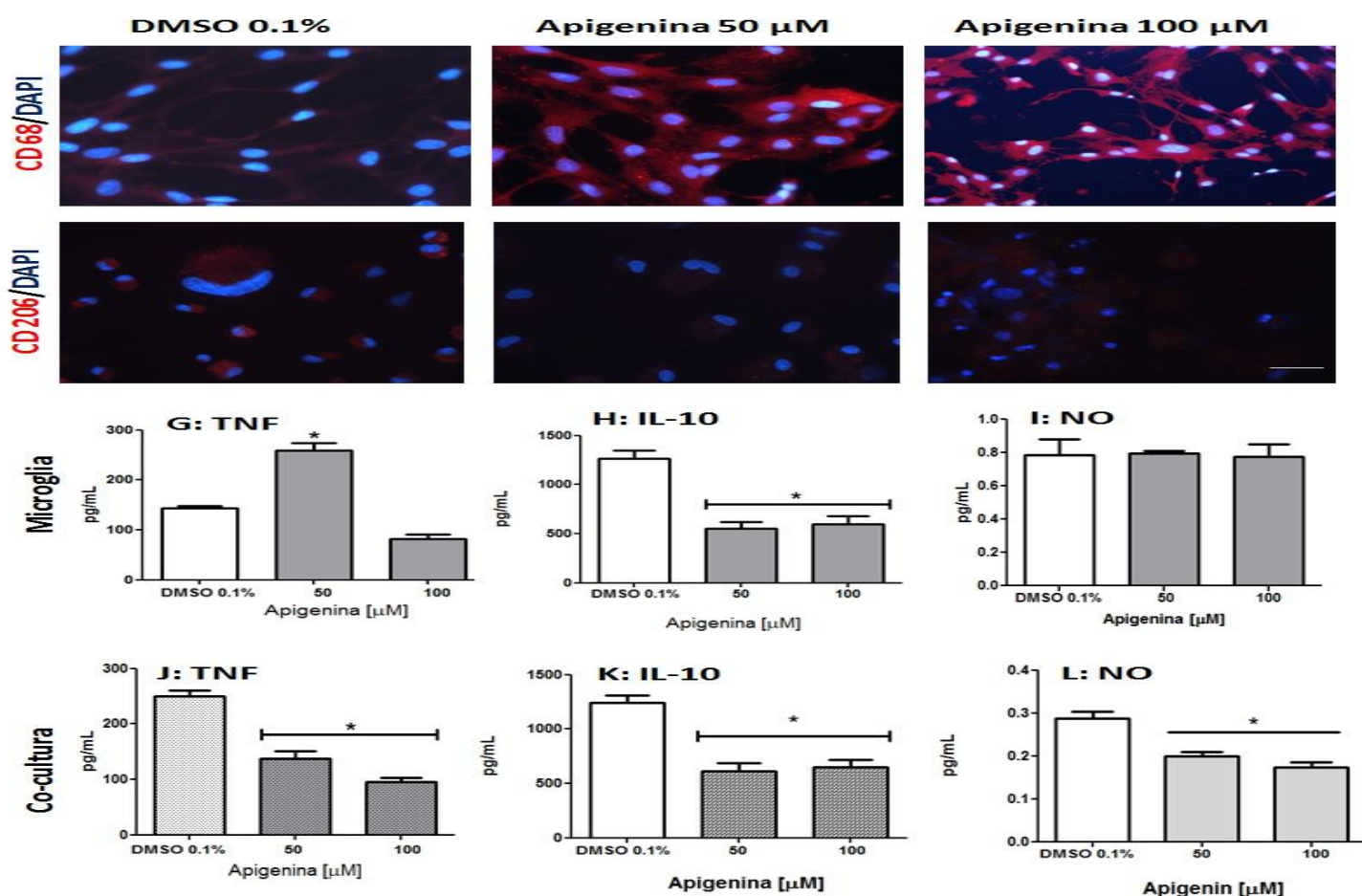


Figura 6- Efeito da apigenina na expressão de marcadores da polarização microglial e de fatores tróficos em culturas de microglia e cocultura microglia/glioblastoma C6 após 48 h de tratamento. Marcação imunocitoquímica para proteína CD68 (em vermelho), marcador específico de microglias M1, em culturas de microglia em condições controle (DMSO 0,1%) (A) ou tratadas com o flavonoide apigenina nas concentrações de 50 μ M (B) e 100 μ M (C). Marcação imunocitoquímica para proteína CD206 (em vermelho), marcador específico de microglias M2 em culturas microglia em condições controle (DMSO 0,1%) (D) ou tratadas com o flavonoide apigenina nas concentrações de 50 μ M (E) e 100 μ M (F). Em azul marcação para o agente intercalante de DNA 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI). Mensuração por ELISA sanduiche de níveis das citocina TNF no meio de culturas de microglia (G) e de co-culturas microglia/glioma (J) em condições controle (DMSO 0,1%) ou tratadas com apigenina 50 μ M e 100 μ M. Mensuração por ELISA sanduiche de níveis das citocina IL-10 no meio de culturas de microglia (H) e de coculturas microglia/glioma (K) em condições controle (DMSO 0,1%) ou tratadas com apigenina 50 μ M e 100 μ M. Mensuração de nitrito (NaNO_2), baseada na reação de Griess, no meio de culturas de microglia (I) e de coculturas microglia/glioma (L) em condições controle (DMSO 0,1%) ou tratadas com apigenina 50 μ M e 100 μ M. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. (*) $p < 0.05$ em relação ao controle DMSO 0,1%. Objetiva 40X e barra de escala= 100 μ m.

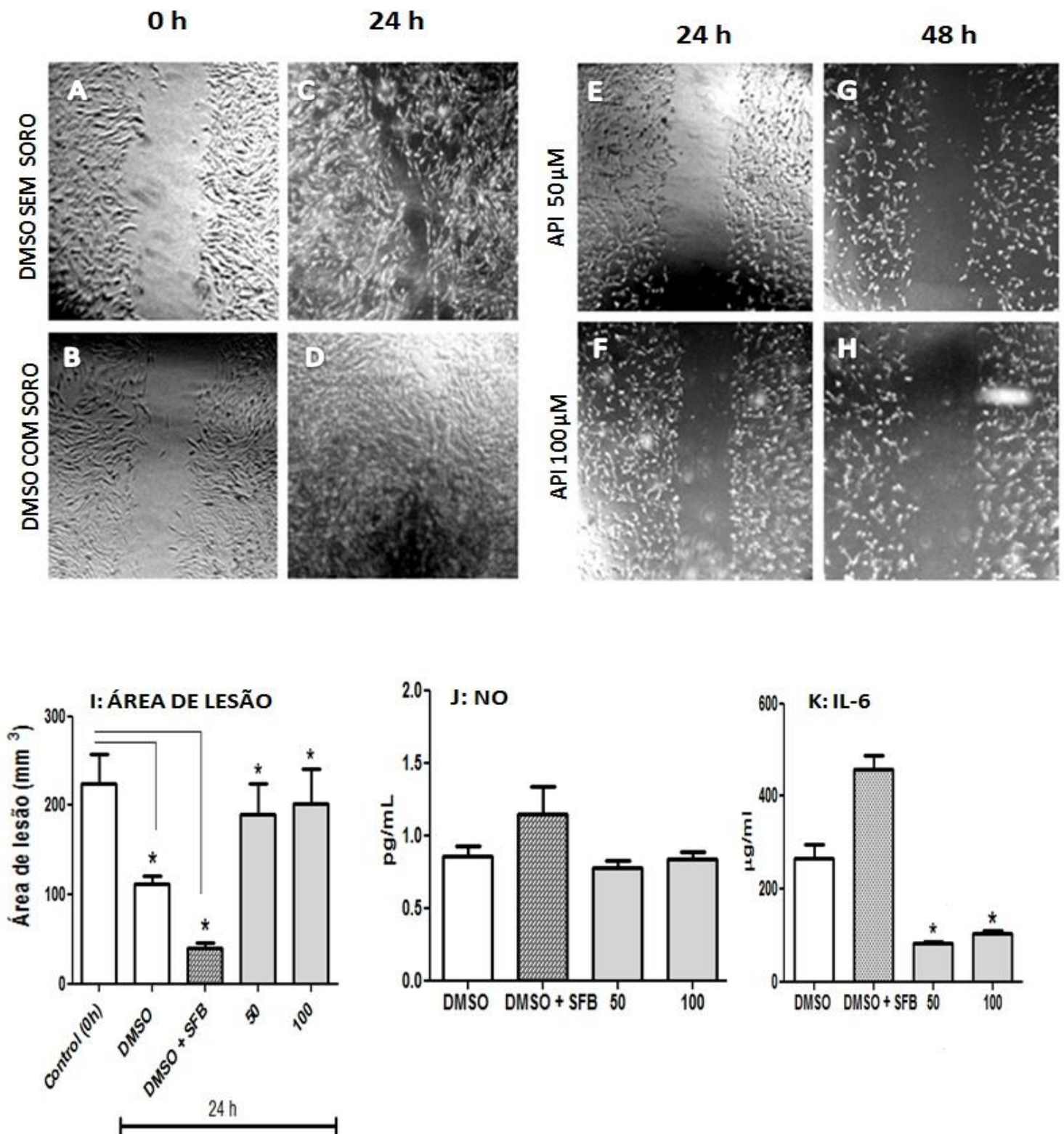


Figura 7- Efeito do meio condicionado de microglias (MCM) tratadas com meio controle (DMSO, 0,1%), controle contendo 10% de SFB (DMSO + SFB, controle positivo) e com o flavonoide apigenina nas concentrações de 50 µM e 100 µM, sobre a migração das células de glioma da linhagem C6, avaliado após 0, 24 e 48 h de experimento (A-H). Área de lesão (I). Mensuração de nitrito (NaNO₂) baseada na reação de Griess após 48 h de tratamento (J). Dosagem de IL-6 no sobrenadante celular após 48 h de migração (K). Resultados expressos em média ± desvio padrão. (*) p < 0.05 em relação ao DMSO 0,1%. Objetiva 40X.

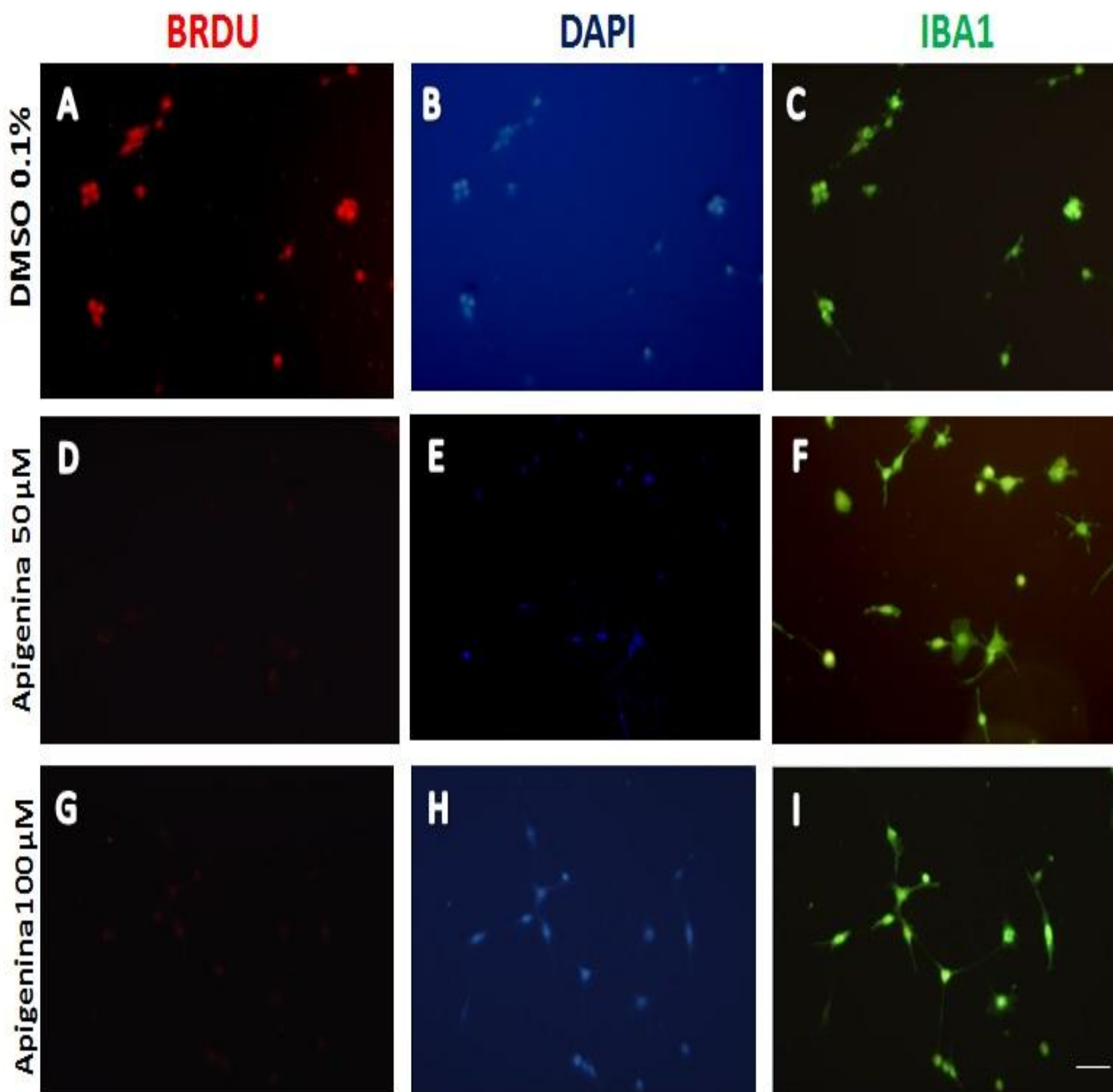


Figura 8- Avaliação, do efeito do meio condicionado de culturas de células de glioblastoma da linhagem C6 sobre a proliferação e diferenciação microglial por imunomarcação da incorporação de nucleotídeo bromodioxido de uridina (BrdU). Células de microglias tratadas por 24 h com meio condicionado de C6 em condições controle (DMSO 0,1%) (A-C) ou tratadas com apigenina nas concentrações de 50 μ M (D-F) e 100 μ M (G-I), imunomarcadas para BrdU (vermelho) (A,D,G), contra coradas com DAPI (azul) (B,E,H) ou imunomarcadas para proteína IBA-1 (verde) (C,F,I). (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido). Barra de escala = 100 μ m.

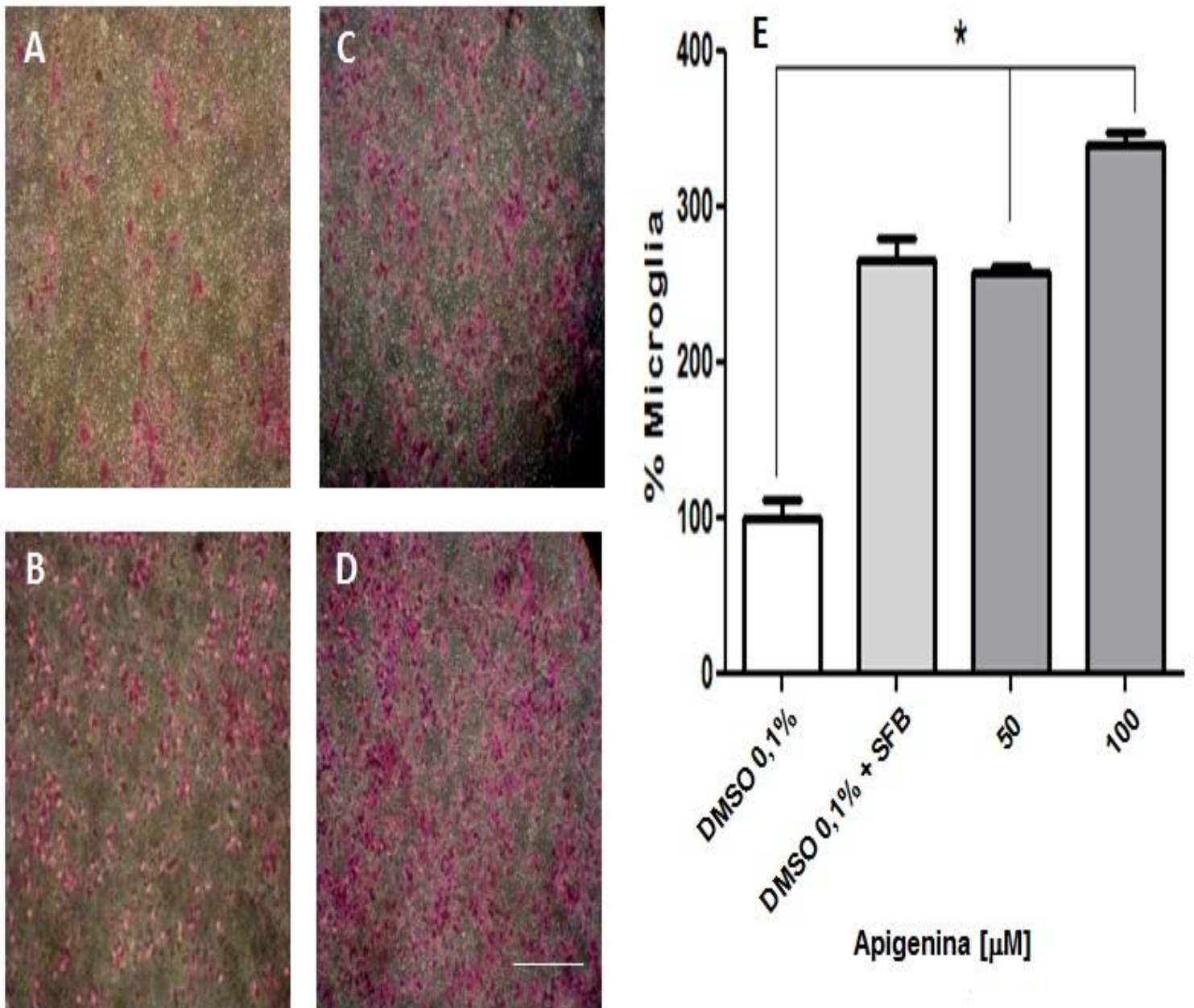


Figura 9: Ensaio de quimiotaxia para microglia em sistema Transwell realizados em culturas de glioblastoma C6 submetidas ao tratamento por 24 h com apigenina. Coloração Rosenfeld das microglias que migraram para a câmara inferior com culturas de células C6 em condições controle (DMSO 0,1%) (A), tratadas com DMSO 0,1% + SFB 10% (DMSO + SFB, controle positivo) (B), tratadas com apigenina 50 μM (C) e 100 μM (D). Quantificação das microglias que migraram para a camada inferior nas diferentes condições experimentais (E) Resultados expressos com media \pm desvio padrão em relação ao controle DMSO 0,1%, considerado como 100% de migração da microglia. Obj. 40x. (*) $p < 0.05$ em relação ao DMSO 0,1%. Barra de escala = 100 μm .

4.4 DISCUSSÃO

Diversos estudos *in vitro* tendem a se aproximar cada vez mais com modelos animais. Neste contexto, os estudos que utilizam cocultura mimetizam, embora de forma reduzida, um ambiente cada vez mais próximo dos modelos *in vivo* no diz respeito ao microambiente celular, e interações entre subpopulações de células em um tecido. .

Os estudos de biologia do glioblastoma *in vitro* necessitam simular uma interação com as células residentes do sistema imune no SNC. Sendo assim, as coculturas microglias/glioblastoma mostram-se eficazes na compreensão dos mecanismos imunocelulares envolvidos no comportamento agressivo desta neoplasia. Em nosso estudo, para investigar a atividade imunomoduladora do flavonoide apigenina, extraído das folhas de *Croton betulaster* Mull (BARBOSA, 2003), utilizamos como modelo experimental células de glioblastoma da linhagem murina C6, caracterizada e estabelecida por Ben et al. (1968) e amplamente adotada no estudo de drogas antitumorais, em cocultura com células de microglia obtidas de ratos Wistar neonatos.

Os flavonoides apresentam uma diversidade de funções fisiológicas, incluindo a capacidade de modular o sistema imune no cérebro (Spencer, 2012). Neste trabalho objetivamos investigar o efeito do flavonoide apigenina, tendo em vista a sua diversidade de funções biológicas e antitumorais. Cardenas et al. (2006) divulgaram em sua pesquisa *in vitro* que o flavonoide apigenina inibiu a proliferação e viabilidade de células de câncer de mama, melanoma, colo uterino e adenocarcinoma. Além disso, este composto induziu apoptose em células de leucemia e de carcinoma (ZHENG et al., 2005; VARGO et al., 2006). Outros estudos demonstraram a eficácia da apigenina em inibir a proliferação, induzir apoptose de células prostáticas e parada do ciclo celular em G1/S (BEKTIC et al., 2006; SEO et al., 2011). Ademais, gliomas e hepatomas, apresentaram grande toxicidade a este flavonoide (WATJEN et al., 2007; SEIBERT et al., 2011; SANTOS et al., 2015; COELHO et al., 2016). Em um estudo prévio investigamos o potencial antitumoral e imunomodulador do flavonoide apigenina em células de glioma na linhagem C6, sendo observada toxicidade, inibição da migração e regulação de

fatores tróficos que influenciam no crescimento e migração tumoral (COELHO et al., 2016). Por outro lado, outros estudos desenvolvidos em células de glioblastoma humano da linhagem GL-15 mostraram também que a apigenina é capaz de inibir a proliferação e induzir sua diferenciação, além de promover a diminuição na expressão de fatores pró-angiogênicos (VEGF e TGF β -1) (FREITAS et al., 2008).

Alguns estudos têm observado que a microglia compõem uma grande parte da massa tumoral do glioma (BADIE, 2001). Outros estudos têm relatado que as células da microglia associadas aos gliomas tornam-se hiporresponsivas, com sua capacidade de estimulação reduzida (CHARLES et al., 2011). Sendo assim, uma droga que iniba o crescimento da microglia e modifique seu comportamento ativando-a para atacar o tumor, mostra-se eficaz. Neste trabalho, verificamos que, após o tratamento com a apigenina, as microglias tiveram a sua morfologia alterada, aumentaram à expressão do marcador OX-42, bem como exibiram um fenótipo fagocítico contra as células tumorais.

Um novo fármaco antiglioma deve ativar as microglias e restabelecer a sua função natural de realizar a fagocitose das células tumorais. Em nosso estudo verificamos que o tratamento com o flavonoide apigenina nas concentrações de 50 e 100 μ M durante 48 h foi capaz de reduzir a viabilidade de células microglias isoladas, bem como no sistema de cocultura microglia/glioblastoma C6. Entretanto, a citotoxicidade foi observada em maior quantidade na cocultura, apesar de que, Silva et al. (2007), Pitanga et al.(2012) e Coelho et al. (2016) revelaram que o flavonoide rutina e apigenina não alteraram a viabilidade de células gliais, em culturas mistas. No entanto, em nosso modelo o flavonoide apigenina mostrou-se citotóxico especificamente para a microglia. Essa citotoxicidade pode ser explicada pela ausência de astrócitos em nosso modelo de estudo, que são as principais células que participam da metabolização e detoxificação de drogas no SNC (TARDY, 2001).

Durante danos ao tecido nervoso, 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 glioblastoma ainda não é

totalmente compreendido, pois muitas vezes a sua função tende a favorecer o crescimento e migração tumoral (HAMBARDZUMYAN, GUTMANN & KETTENMANN, 2015). A apigenina nas concentrações de 50 e 100 μM mostrou-se efetiva em reduzir a proliferação microglial, em ambos os modelos de estudo adotados neste artigo, e ainda proporcionou uma ativação fagocitária nas microglias remanescentes após 48 horas de tratamento.

Kostianovsky et al. (2008) observaram também que os monócitos cultivados junto com astrócitos humanos ou com células de glioblastoma conferem uma tolerância 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, tendo em vista que umas das características 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 citocinas são moléculas importantes para a ativação e regulação do sistema imune e podem ter um papel importante na sobrevivência do glioblastoma (ALBULESCU et al., 2013). As citocinas estão envolvidas na resposta imunológica e na interação entre as células do SNC normais e com o tumor. Neste estudo, foi demonstrado que em condições controle o nível da citocina anti-inflamatória IL-10, secretada pelas células em culturas de microglia e cocultura, é duas vezes maior do que da citocina inflamatória TNF, indicando um perfil de resposta imunológica do tipo Th2. No entanto, após a modulação com o flavonoide apigenina na concentração de 50 μM ocorreu uma inversão dos níveis destas citocinas secretadas no meio de cultura, indicando uma mudança para o perfil Th1. A IL-10 está envolvida na progressão do tumor, neste sentido, estes compostos vegetais podem atuar inibindo a produção desta citocina (YU et al., 2007). O balanço do perfil da resposta Th2 para Th1 pode ser uma estratégia eficaz contra os tumores e a apigenina mostrou-se eficaz nessa alteração. Assim sendo, considerando que a apigenina alterou o perfil de secreção de citocinas inflamatórias, esse flavonoide também pode ser considerado como um agente imunomodulador importante.

Já está bem estabelecido que a microglia, a depender do ambiente em que se encontra, apresenta um perfil de resposta diferente (GOLDMANN e PRINZ, 2013, NAKAGAWA e CHIBA, 2014). Mostramos em nosso modelo que em condições controle as microglias apresentam um perfil de resposta polarizado ao perfil M2, pois a expressão do marcador CD206 encontra-se elevada e a expressão do marcador CD68 diminuída. Entretanto, após a modulação com a apigenina essa relação se inverte. Xue et al. (2017) demonstraram que o ácido clorogênico inibe o crescimento de glioblastoma através da repolarização de macrófagos M2 para M1. De maneira semelhante aos nossos resultados, Mukherjee et al., 2016 utilizaram a curcumina e alteraram a polarização macrofágica para o perfil M1 e acabaram eliminando as células de glioblastomas. E ainda, Flugel et al. (1999) afirmaram que a microglia é capaz de efetivamente funcionar como célula apresentadora de antígenos (APC) e mais recentemente Arcuri et al., 2017 em sua revisão de literatura discutem a importância de novos tratamentos para alterar o perfil M2/M1 durante a interação microglia/glioblastoma com o objetivo de eliminar as células tumorais.

Observamos neste estudo, através da microscopia de transmissão, a formação de pseudópodos nas células microgliais, bem como um aumento nuclear e de organelas citoplasmáticas. Tambuyzer et al. (2009) observaram, durante o estímulo da microglia, que 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. Isto permite que essas células 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.

Mecanismos envolvidos na migração e adesão de células tumorais são importantes para a malignidade dos glioblastomas. Estes tumores são altamente invasivos e sofrem influencia do estroma tecidual, principalmente das microgliais (BADIE, 2001). Para verificar a capacidade antimigratória do flavonoide apigenina foi realizado um ensaio com o meio condicionado da microglia tratado com este flavonoide. Quando as células de glioblastoma, nos ensaios de migração, foram

submetidas ao tratamento com o meio condicionado da microglia em condição controle, verificamos um efeito migratório das células de glioblastomas C6, indicando uma influência de fatores solúveis liberados pela microglia que favorecem a invasão tumoral. No entanto ao serem tratadas com apigenina (50 μM e 100 μM) foi verificada uma inibição da migração.

O comportamento migratório das células microgliais parece estar relacionado a modificações no citoesqueleto (ILSCHNER & BRANDT, 1996). Várias moléculas da matriz extracelular parecem influenciar as modificações morfológicas da microglia, sendo a aquisição do fenótipo ramificado acompanhado por alterações químicas dos microtúbulos. A forte interação entre gliomas e microglia foi demonstrada nesse estudo pela inibição da migração do glioma pela interação com o meio condicionado da microglia. A redução da migração das células de glioma tratadas com o meio condicionado da microglia com a apigenina pode ser explicada possivelmente pela alteração nos níveis da produção da citocina IL-6, que se mostrou elevada nas condições controle e diminuída após tratamento com apigenina.

Os ensaios de quimiotaxia com células da microglia, sob efeito de células de glioblastomas tratadas com os flavonoides, mostraram que a apigenina, induziu a produção de fatores quimiotáticos que favoreceram a migração de células microgliais. Estes resultados confirmam a ação quimiotática do flavonoide apigenina em células da microglia, reforçando assim o potencial antitumoral deste flavonoide. Estudos realizados por Silva (2014) demonstraram o potencial quimiotático de flavonoides em células da microglia e macrófagos peritoneais, o que reforça a importância dos macrófagos na resposta inflamatória antitumoral.

A resistência do glioblastoma aos principais tratamentos utilizados na clínica aponta para a necessidade de importância de estudos mais amplos em busca de novos compostos quimioterápicos antitumorais mais eficazes. As recentes descobertas sobre a relação microglia-glioblastoma tornam-se úteis 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 combate ao tumor. Os resultados aqui apresentados são muito promissores, pois mostram o potencial do flavonoide apigenina como uma possível estratégia terapêutica adjuvante futura contra os gliomas malignos, através da combinação com drogas já utilizadas. Por fim, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão desta relação, bem como, os efeitos antitumorais dessas moléculas.

4.5 REFERÊNCIAS

ANDERSON, J. C.; MC FARLAND. B.C. AND GLADSON, C. L. New molecular targets in angiogenic vessels of glioblastoma tumours. **Expert Rev Mol Med.** v.7, p.10-23, 2008.

BADIE B.; SCHATNER J.; PRABAKARAN S.; PAUL J.; VORPAHL J. Expression of fas ligand by microglia: Possible role in glioma immune evasion. **Journal of Neuroimmunology.** v.120, p.19–24, 2001.

BARBOSA, P.R.; FASCIO, M.; MARTINS, D.; GUEDES, M.L.S.; ROQUE, N.F. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics And Ecology**, n.31, p.307-308, 2003.

BEKTIC, J.; GUGGENBERGER, R.; SPENGLER, B.; CHRISTOFFEL, V.; PELZER, A.; BERGER, A.P.; RAMONER, R.; BARTSCH, G.; KLOCKER, H. The flavonoid apigenin inhibits the proliferation of prostatic stromal cells via the MAPK-pathway and cell-cycle arrest in G1/S. **Maturitas.** n.55, p.37-46, 2006.

BENDA P, LIGHTBODY J, SATO G, LEVINE L, SWEET W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science** 161:370–371. 1968;

BRAGANHOL, E.; ZAMIN, L.L.; CANEDO, A.D.; HORN, F.; TAMAJUSUKU, A.S.; WINK, M.R.; SALBEGO, C.; BATTASTINI, A.M. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. **Anticancer Drugs** n.17, n.6, p.663-67, 1 2006

CARDENAS, M.; MARDER, M.; BLANK, V.C.; ROGUIN, L.P. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell line. **Bioorg Med Chem** n.1 p.14 p. 966-2971 2006

COELHO, P.; FREITAS, B.; PITANGA, P.; SILVA, A.; OLIVEIRA, N.; COSTA, S. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Braz J Pharmacognosia** n. 26 p.34–43. 2015

COELHO, P.; OLIVEIRA, M.; SILVA, A.; PITANGA, B.; SILVA.; FARIA, G.; SAMPAIO, G.; COSTA, M.; SOUZA, S.; COSTA, S. The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells **Anticancer Drugs** 2016

COSTA, S.L.; PAILLAUD, E.; FAGES, C.; ROCHETTE-EGLY, C.; JOUAULT, H.; PERZELOVA, A.; TARDY, M. Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. **Eu. J Cancer** v.37 p.520-530. 2001

DAS, A., BANIK, N. L., RAY, S. K. Flavonoids Activated Caspases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells But Not in Human Normal Astrocytes **Cancer** v.1 n.116 p.164–176 2010

DUBOIS, L. G.; CAMPANATI, L.; RIGHY, C.; SPOHR, T. C.; PORTO-CARREIRO, ISABEL ; PEREIRA, CLAUDIA MARIA ; BALÃÇA-SILVA, JOANA ; KAHN, S. A ; MOURA-NETO, V . Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, p. 00, 2014

FLUGEL, A.; LABEUR, M.S.; GRASBON-FRODL, E.M.; KREUTZBERG, G.W.; GRAEBER, M.B. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. **Int J Dev Neurosci** v.17 p.547–556. 1999.

FREITAS, S.; COSTA, S.; AZEVEDO, C.; CARVALHO, G.; FREIRE S.; BARBOSA, P.; VELOZO, E.; SCHAER, R.; TARDY, M.; MEYER, R.; NASCIMENTO, I. Flavonoids Inhibit Angiogenic Cytokine Production by Human Glioma Cells **Phytother. Res.** 2010

GOLDMANN, T; PRINZ, M; Role of Microglia in CNS Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*. v13. 2013

HANSEN, M.B; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/ cell kill. **J Immunol Methods**, n.119 p.203-10. 1989.

HILDEBRAND, J.; DEWITTE, O.; DIETRICH, P.Y.; TRIBOLET, N. Management of malignant brain tumours. *Eur. Neurol* v.38 p.238-253.1997.

IELPOA M.T.L.; BASILEB,A.; MIRANDAA, R.; MOSCATIELLOA,V.; NAPPOA,C.; SORBOA,S.; LAGHIA, E.; RICCIARDIA, M.M.; RICCIARDIA, L.; VUOTTOA, M.L. Immunopharmacological properties of Flavonoids. **Fitoterapia** v.71. 2010.

ILSCHNER, S. & BRANDT, R. The transition of microglia to a ramified phenotype is associated with the formation of stable acetylated and detyrosinated microtubules. **Glia**, v 18 p129-140,1996.

KOSTIANOVSKY, A.M.; MAIER, L.M.; ANDERSON, R.C.; BRUCE, J.N.; ANDERSON, D.E.; Astrocytic regulation of human monocytic/microglial activation. **J Immunol.** v.181 p.5425-32, 2008.

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

PITANGA, B.P.S. Efeitos de flavonoides sobre a ativação microglial e viabilidade de células de glioblastoma. Tese (Doutorado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, p 144. Salvador, 2012.

NAKAGAWA, Y and CHIBA, K. Role of Microglial M1/M2 Polarization in Relapse and Remission of Psychiatric Disorders and Disease. **Pharmaceuticals.** n7.v12 p.1028-1048. 2014

NONES, J., STIPURSKY, J., COSTA, S. L., GOMES, F. C. A. Flavonoids and Astrocytes Crosstalking: Implications for Brain Development and Pathology **Neurochem Res** n. 35 p.955–966, 2010.

PRADOS, M.D.; LEVIN, V. Biology and treatment of malignant glioma. **Semin Oncol** n. 27, p. 1–10., 2000.

ROGGENDORF, W.; STRUPP, S.; PAULUS, W.. Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. **Acta Neuropathol** n.92 p.288–293, 1996

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. , R.S. EL-BACHÁ , E.S. VELOZO , G.P. SAMPAIO , FREIRE, S.M., TARDY, M., COSTA, S.L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin **Food Chemistry** n.127, p. 404–411, 2011

SEO, Y. J.; KIM, B. S.; CHUN, S. Y.; PARK, Y. K.; KANG, K. S.; KWON, T. G. Apoptotic Effects of Genistein, Biochanin-A and Apigenin on LNCaP and PC-3 Cells by p21 through Transcriptional Inhibition of Polo-like Kinase-1 **Urology** n.26 p.1489-1494 2011

SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; SOUZA, C. S.; FREITAS, S. R. V.-B.; VASCONCELLOS, V.; FREIRE, S. M.; VELOZO, E. S.; TARDY, M.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; COSTA, S. L. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures **Cell Biol Toxicol** 2008

SILVA, A. B. **Efeito modulatório e quimiotático de flavonoides na interação macrófagos/microglia com glioma.** **Dissertação** (Mestrado em Imunologia) - Universidade Federal da Bahia, p 96. Salvador, 2014.

STREIT, W.J.; WALTER, S.A.; PENNELL, N.A.; Reactive microgliosis. **Prog Neurobiol.** V.57 p.563– 581. 1999

TAMBUYZER, B.R.; PONSAERTS, P.; NOUWEN, E.J. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. **J Leukoc Biol** v.85 p.352-70. 2009.

VARGO, M.A.; VOSS, O.H.; POUSTKA, F.; CARDOUNEL, A.A.A.J.; GROTEWOLD, E.; DOSEFF, A.L. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the

activation of PKC delta and caspases in leukemia cell. **Biochem Phammacol** v.14 p. 681-692. 2006.

WATJEN, W.; WEBER, N.; LOU, Y.-j. , WANG, Z.; CHOVOLOU, Y.KAMPKOTTER, A.; KAHL, R. PROKSCH, P. Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells **Food and Chemical Toxicology** n.45 p.119-124 2007

XUE, N.; ZHOU, Q.; JI M.; JIN, JING.; LAI, FANG.; CHEN, JU.; ZHANG, M.; JIA, J.; YANG, H.;ZHANG, J.; LI, W.; JIANG,D.;CHEN, X. Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype. **Nature** v.7. 2017.

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D.; Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT 3 in the tumor microenviroment. **Nat. Rev. Immunology** n.7 p41-51 2007

ZHAI, H.; FRANK, L. AND TSIRKA H. S. E., Microglia/Macrophages Promote Glioma Progression. **Glia** v.59 p.472–485, 2011.

ZHENG, P.W.; CHIANG, L.C.; LIN, C.C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. **Life Sci** n.76 v.12p.1367-79. 2005

5. ARTIGO CIENTÍFICO II

EFEITO DO FLAVONOIDE APIGENINA EXTRAÍDO DE *Croton betulaster* MULL NA VIABILIDADE, DIFERENCIAÇÃO E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO.

RESUMO

INTRODUÇÃO E OBJETIVO: Glioblastomas são as neoplasias mais agressivas e comuns que atingem o SNC. Nossos estudos anteriores demonstram uma capacidade antitumoral, morfogênica e imunomodulatória de flavonoides em células de glioblastomas humanos. O flavonoide apigenina extraído da planta *Croton betulaster* Mull, apresenta um importante papel como inibidor do crescimento de células de glioblastomas, alterando o perfil de citocinas inflamatórias. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da apigenina, no crescimento e viabilidade das células de glioblastoma humano (U-251) e células tronco de glioblastoma (TG1 e OB1), bem como investigar os mecanismos de morte e seus efeitos antitumorigênicos e imunomoduladores. **MÉTODOS E RESULTADOS:** Observamos que o flavonoide apigenina reduziu a viabilidade celular de forma dose e tempos dependentes das células de glioblastomas quando comparado com o controle. Por citometria de fluxo, observou-se um aumento da intensidade de fluorescência para marcação com anexina V e formação de vacúolos autofágicos indicando uma capacidade indutora de morte por apoptose e autofagia nas células de glioblastoma. Alterações morfológicas e na expressão das proteínas GFAP, β -3 tubulina, nestina e Bmi1 após o tratamento com o flavonoide sugerem uma diferenciação astrocitária e neuronal. Foram observadas também uma atividade antitumorigênica do flavonoide em células de glioblastomas implantadas no encéfalo de ratos, através de alterações morfológicas como astrogliose e microgliose verificadas por imunohistoquímica. Pela técnica de RT-PCR foi demonstrada uma alteração do perfil TH2 para TH1 indicando uma atividade imunomoduladora deste flavonoide nos vários modelos em estudo. **CONCLUSÕES:** Estes resultados sugerem que o flavonoide apigenina inibe o crescimento e a migração celular, além de alterar a morfologia e o perfil regulatório de proteínas imunomodulatórias em glioblastomas, podendo contribuir para o tratamento dessas neoplasias no SNC.

Palavras chaves: Flavonoide, apigenina, diferenciação, apoptose, glioblastoma

5.1 INTRODUÇÃO

Gliomas são tumores intracraniais malignos que atingem as células gliais no SNC (ANDERSON et al., 2008). Sua classificação segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) varia em quatro graus, sendo o glioblastoma humano o mais agressivo (BENJAMIN et al., 2003). A sua incidência nas últimas décadas tem aumentado e estudos recentes mostram que são os mais comuns das neoplasias primárias cerebrais, além de ter uma ocorrência em todas as idades. No entanto, sua prevalência é maior em homens e pessoas brancas entre 45 e 70 anos (REARDON & WEN, 2007).

Seus aspectos morfológicos de alta vascularidade densa, grande proliferação endotelial celular, além de possuir um crescimento rápido, tornam estes tumores altamente recidivos (LAKS et al., 2010). A constituição celular em um único tumor apresenta uma grande variação (CLARKE et al., 2010) que por sua vez, pode dificultar o protocolo terapêuticos para os glioblastomas. É descrito na massa tumoral dos gliomas uma população de células tronco tumorais que são altamente resistentes aos tratamentos quimioterápicos e responsáveis pela recidiva da neoplasia (Patru et al., 2010)

Atualmente, o protocolo para estes tumores é multissistêmico, onde se associam a remoção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia (WANG, 2004). Dentre os compostos químicos utilizados, merecem destaque a TMZ e os compostos da nitrosureia (TATOR et al., 1977; GERMANO et al., 2010). Estudos recentes demonstram que fatores antiangiogênicos são fundamentais na redução tumoral, onde o VEGF, IFN- β e TGF- β merecem importância (MERZKAK et al., 1994; HONG et al., 2000). Novas pesquisas estão em busca para uma melhor eficácia nos tratamentos para os gliomas, como os retinóides (COSTA et al., 2001), flavonoides (SILVA et al., 2008). Apesar dos avanços na oncologia clínica a expectativa de vida para um paciente diagnosticado com o glioblastoma humano dificilmente não ultrapassam os 14 meses (SENGER et al., 2003).

Os flavonoides são compostos polifenólicos produzidos pelas plantas e que apresentam diversas características biológicas. Dentre as suas principais atividades, a antitumoral tem despertado o interesse da comunidade científica

(HERTOG et al., 1992). Nossos estudos têm demonstrado que flavonoides possuem uma atividade antitumoral em células de glioblastomas humanos e não são tóxicos para células normais do SNC (SILVA et al., 2008; SANTOS et al., 2011). O flavonoide apigenina vem sendo utilizado em diversas pesquisas biológicas, principalmente por sua atividade antitumoral em diversas linhagens de células (MAK et al., 2006; UJIKI et al., 2006) e mostrou-se tóxica para células de glioblastomas e indutora de apoptose (DAS et al., 2010).

Neste contexto, este estudo procurou investigar o metabolismo do flavonoide apigenina sob a viabilidade, diferenciação e regulação de citocinas inflamatórias em linhagens de células derivadas de glioblastoma multiforme humano da linhagem U-251 e células tronco de glioblastomas da linhagem TG1 e OB1.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 O flavonoide apigenina

O composto foi obtido sob a forma de pó e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma Chemical (Co) em solução estoque de 100 mM que foi mantida sob proteção da luz à -20°C. A diluição final do reagente foi obtida no momento do tratamento diluindo-se a solução concentrada diretamente no meio de cultura. As células foram expostas aos flavonoides pelo período de 24, 48 e 72 h nas concentrações finais de 1 a 100 µM. O meio com o veículo de diluição do flavonoide (DMSO 0,1%) foi utilizado como controle experimental.

5.2.2 Cultura de células

As células de glioblastoma humano da linhagem U-251 foram conservadas em uma solução de 90% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) à razão de 1×10^6 células/mL e estocadas em criotubos no nitrogênio líquido. Todos os experimentos foram realizados até a décima passagem de células e quando atingiam a confluência foram descoladas das placas de cultura

por uma solução contendo 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS. Culturas de células confluentes, cultivadas em placas de 100 mm foram dissociadas utilizando-se uma solução de tripsina 0,05% e EDTA 0,02% diluídos em PBS, e replaqueadas em placas poliestireno de 4 cm de diâmetro ou de 96 poços (TPP), a uma densidade inicial de 2×10^5 células/cm² em meio Dulbecco modificado (DMEM, Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,011 g/L de ácido pirúvico, 2 mM de L-glutamina, 100UI/mL de penicilina G e 7 mM de glicose, e incubadas a 37^o C em atmosfera úmida e controlada, contendo 5% de CO₂. Segundo protocolo já bem estabelecido por (COSTA et al., 2001). Vinte quatro horas após a distribuição das células nas placas, estas foram tratadas com o meio controle (DMSO 0,1%) ou com o flavonoide apigenina diluído diretamente no meio de cultura suplementado, em concentrações variando de 1 a 100 µM, por um período de 24, 48 ou 72 horas.

As células da linhagem TG1 e OB1, derivadas do tumor maligno humano foram cultivadas no laboratório de *Plasticità Gliale* e mantidas de acordo com o protocolo descrito por Patru *et al.* (2010). 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.

5.2.3 Análise da citotoxicidade e viabilidade celular

5.2.3.1 Redução dos Sais de Tetrazólio (MTT)

O teste de redução dos sais de tetrazólio é realizado por uma dosagem colorimétrica sensível, quantitativa e confiável, utilizada para medir a viabilidade, proliferação e a atividade celular (HANSEN et al., 1989). Seu princípio baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais de células vivas em converter o brometo de 3-(dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) um substrato amarelo em cristais de formazan de cor violácea (produto). As células cultivadas em placas de 96 poços foram expostas ao flavonoide apigenina por 24, 48 e 72 h. Depois de decorrido o tempo de exposição, o meio de cultura foi desprezado e foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços 100 µl de uma solução de MTT

(Sigma, M2128) em meio DMEM (Cultilab) a uma concentração final de 1mg/mL. As células foram incubadas em estufa controlada a 37°C, 5% de CO₂ por 2 h. Em seguida, foram adicionados 100 µl/poço de um tampão de lise, contendo 20% de SDS e 50% de DMF, pH 4,7, sendo a placa incubada em seguida por 12 h a 37 °C, para a dissolução completa dos cristais de formazan. A absorção óptica de cada amostra em octuplicata foi feita a um comprimento de onda de 490 nm, utilizando o leitor de microplaca THERMO PLATE modelo TP-reader. O tamanho da amostra (n) para cada grupo foi de oito (8) e os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata. Os resultados foram apresentados como a porcentagem da viabilidade (média e desvio padrão) em relação ao controle com DMSO (0,1%), considerado como 100%.

5.2.3.2 Ensaio de viabilidade celular WST

Para verificar a sensibilidade das células-troncos de glioblastoma ao flavonoide foi realizada o ensaio de viabilidade celular pela redução do 4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno dissulfonato (WST 1, Roche, France) em cristais de formazan. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 e tratadas com os flavonoide nas concentrações de 1 a 100 µM durante 24 e 72 h mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi assegurada pela redução do WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno dissulfonato, Roche, France) para os cristais de formazan. No final do período de tratamento foram adicionados as células 10% de WST-1 ao meio de cultura e então decorreu-se mais 3 h. A absorvância foi mensurada em 430 nm, no leitor de placa Expert Plus V1.4 ASYS. A viabilidade celular também foi verificada com a contagem celular usando o azul de tripan (Sigma) a uma concentração final de 0.1% e analisadas sob microscopia de contraste de fase.

5.2.4 Alterações morfológicas

5.2.4.1 Microscopia por contraste de fase

Os efeitos do flavonoide apigenina sobre a morfologia celular foi observada inicialmente por microscopia de contraste de fase. Após 48h de exposição à

apigenina nas concentrações de 50 e 100 μ M, as células de U-251 foram analisadas em microscopia com contraste de fase, com filtro verde (Nikon TS-100) e em seguida, fotografado por uma câmera digital (Nikon E-4300). As células de TG1 e OB1 foram analisadas no microscópio (Eclipse E800, Nikon, USA). Imagens foram adquiridas com a câmera digital (DXM 1200, Nikon) usando o software Lucia (Laboratory Imaging). Imagens foram processadas usando o Adobe Photoshop (Adobe Systems). Foram analisadas 10 campos para cada tratamento em três experimentos independentes.

5.2.4.2 Análise imunocitoquímica da expressão da proteína GFAP, β -3 Tubulina e nestina e Bmi1

Após exposição ao flavonoide apigenina nas concentrações finais de 50 e 100 μ M, o meio de cultura foi desprezado e os poços com tapete celular foram lavados por três vezes com PBS em pH 7,4. As células foram então fixadas e permeabilizadas com metanol durante dez minutos a -20°C . O excesso de metanol foi desprezado e as placas ficaram em repouso, abertas, até completa evaporação e secagem do metanol. A seguir as células foram reidratadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,2% e bloqueadas com PBS/BSA 5% por 1 hora e incubadas com os anticorpos primários durante a noite em câmara úmida a 4°C . Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: policlonal de coelho contra GFAP (1:300, Dako Cytomation), policlonal de camundongo contra β -3 tubulina e policlonal de camundongo contra nestina (1:200, Santa Cruz) diluído em PBS/BSA 1%. Decorrido o tempo de incubação do anticorpo primário, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e incubadas com o anticorpo secundário, uma IgG de camundongo contra coelho ou contra camundongo conjugado à fluoresceína (FITC) diluído em PBS na proporção de 1:500, sob agitação lenta, por 1 h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA fluorescente 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) (5 μ g/mL) durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS, analisadas por microscopia de fluorescência e fotografadas com filme Kodak Cromo ISO100 em câmera Olympus AX-70. Para todas as reações, os controles negativos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos, com exceção da incubação com o anticorpo primário.

5.2.5 Ensaio de morte celular

De maneira semelhante ao ensaio de viabilidade celular, as células foram tratadas com controle (DMSO 0,1%) e com apigenina na concentração de 50 e 100 μM e analisadas após 48 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. Em seguida, as células foram recuperadas, lavadas com DMEM suplementadas com 10% SFB, centrifugadas por 5 minutos a 400g. Após incubação de 30 minutos com uma solução de PBS com-BSA a 2% e nova centrifugação, foram adicionados ao *pellet* 90 μL de uma solução contendo 2 μL de anexina V conjugada a fluoresceína e 88 μL de tampão de ligação (*Binding Buffer*), sendo incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Foram adicionados 5 μL de iodeto de propídio (PI) no momento da aquisição, sendo adquiridos 10.000 eventos por condição. A leitura da fluorescência da anexina V foi por citometria em fluxo feita e adquiridas através do aparelho FACS calibur (Becton & Dickinson) 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 de apoptose e células positivas tanto para PI quanto para anexina V foram consideradas na fase avançada da apoptose.

5.2.6 Ensaio de autofagia

Para realizar o ensaio de autofagia, as células foram tratadas com apigenina nas concentrações de 50 e 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos à 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 suplementadas com 10% SFB e

centrifugadas por 5 minutos a 400g. Foram adicionados no *pellet* 250 µL de PBS com 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. A leitura da fluorescência do laranja de acridina foi feita por citometria em fluxo e adquiridas através do aparelho FACS calibur (Becton & Dickinson) no canal FL-1 e FL-2.

Para verificar a intensidade de fluorescência dos vacúolos lisossomais foi utilizado um fluorímetro Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Após o tratamento com apigenina nas concentrações de 50 e 100 µM por 72 h, as células foram tratadas com laranja de acridina (1 µg/mL) (Sigma) durante 15 minutos à temperatura ambiente e analisadas em fluorímetro. As células apresentaram uma fluorescência verde que foi mensurado a 502 nm (excitação) e 525 nm (emissão). Entretanto, os vacúolos autofágicos mostram-se com uma fluorescência laranja que foi mensurada em 460 nm (excitação) e 650 nm (emissão). A razão entre esses valores de fluorescência verde e laranja foi calculado para determinar a disfunção lisossomal. Três experimentos independentes foram realizados.

5.2.7 Ensaio de migração

Para avaliar o potencial do flavonoide apigenina em inibir a migração das células de U-251 foi realizada um ensaio em monocamada celular. As células tumorais foram plaqueadas em placas de 24 poços (TPP) a uma concentração de 50 mil células/ poço. Após a formação de uma monocamada celular confluenta foi promovida uma lesão uniforme com o auxílio de uma ponteira de 200 µl de cultivo. Em seguida, realizou-se uma lavagem nas células com PBS estéril, para retirar as células desprendidas durante a lesão. Em seguida modularam-se as placas com 50 e 100 µM de apigenina em meio de cultura DMEM sem SFB e o controle com DMSO 0,1%. Após 24, 48 e 72 h as células foram observadas por microscópio de

contraste de fase e fotografadas. Foram fotografados 5 campos de 3 experimentos independentes.

5.2.8 Cirurgia estereotáxica

Para verificar a capacidade do flavonoide apigenina em inibir a formação e o crescimento tumoral de glioblastoma em ratos foi realizada uma cirurgia estereotáxica com o xenotransplante de células da linhagem U-251 pré-tratadas com o flavonoide apigenina na concentração de 50 μ M ou tratadas com DMSO 0,1% durante 24 h e injetadas nos animais.

5.2.8.1 Animais experimentais

Os animais utilizados foram ratos Wistar macho, com idade aproximadamente de 3 meses e pesando entre 300 a 350 gramas. Os animais foram cedidos pelo biotério da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA e foram mantidos em gaiolas com água e alimentos a vontade. Esse experimento foi aprovado pelo comitê de ética para utilização de animais de laboratório CEUA-ICS, cujo número do registro é 15.09.

5.2.8.2 Cirurgia estereotáxica e micro-injeção

Os animais foram pesados para o cálculo da administração anestésica, onde a mesma ocorre com o cloridato de ketamina (KETALAR) e cloridato de xilazina (ROMPUM). Com o auxílio do atlas estereotáxico para ratos, localizou-se a região do caudado putamem a ser incisada e com o auxílio de broca odontológica abriu-se um pequeno orifício na caixa craniana para a injeção das células tumorais. Esse procedimento foi realizado com cuidado para que não ocorresse perfuração da meninge e nem do córtex cerebral do animal. No dia da cirurgia as células de U-251 tratadas durante 24 h foram removidas dos frascos de cultura com solução de tripsina 0,2%/ EDTA 0,02% em PBS. 500 mil células em meio sem SFB foram adicionados numa solução de 5 μ l. No momento da injeção toda a suspensão

celular foi aspirada sob agitação constante na seringa de Hamilton previamente fixada no aparelho de estereotaxia.

Ao término da cirurgia os animais foram postos em gaiolas individualizadas e monitorados diariamente.

5.2.8.3 Coleta do tecido nervoso

Os ratos com implantes de células tumorais foram eutanasiados após 30 dias do implante de células tumorais. Durante a perfusão intracardíaca realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica foi injetado inicialmente PBS 1X com pH 7.4 e em seguida adicionado paraformaldeído a 4% na temperatura de 4° C.

Decorrido o procedimento de perfusão o encéfalo foi removido da cavidade craniana e imerso na solução de paraformaldeído a 4% para pós-fixação durante 24 h.

5.2.8.4 Preparação dos tecidos e análises histológicas

Foram realizados nos encéfalos cortes coronais de aproximadamente 5 mm de espessura incluindo a região dos implante de células tumorais. As amostras foram então processadas em solução de etanol em concentração crescente (10-100%) para desidratação e posteriormente embebido e embocado em parafina. Foram realizados cortes de 4 µm em micrótomos, onde os mesmos foram fixados em lâminas previamente tratadas com Poli-Lisina e passaram por processos de colorações tradicionais de hematoxilina-eosina (HE) para identificação tumoral e análise histopatológica.

5.2.9 Imunohistoquímica

Para a realização das reações imunohistoquímicas, após a perfusão e fixação dos encéfalos, procedeu-se com a imersão dos mesmos em uma solução de sucrose a 30% durante 3 dias. Em seguida, foram realizados cortes de 25 µm de todo o encéfalo com o auxílio de um criostato na temperatura de – 20° C e

coletados em lâminas de vidro superfroast. Os tecidos foram lavados 3 X com PBS, depois seguiu-se com a incubação de PBS Triton 0,3% por 20 minutos e o bloqueio das ligações inespecíficas com uma solução de NGS 5% durante uma hora. Após o bloqueio, os cortes foram expostos diretamente aos anticorpos primários policlonal de coelho contra GFAP (Z0334, Dako Cytomation) na concentração de 1:200, monoclonal de camundongo contra IBA1 (Abcam) e policlonal de coelho contra VEGF (Santa Cruz) na concentração de 1:100, todos durante a noite em câmara úmida. Após este procedimento, os cortes foram lavados três vezes em PBS por cinco minutos e então expostos aos anticorpos fluorescentes secundários (contra coelho e contra mouse) acoplados à FITC ou Cy3 (DakoCytomation) por 2 horas. Depois, os cortes foram lavados 3X na solução de PBS prosseguiu-se com a marcação nuclear utilizando o reagente DAPI por 20 minutos. Os cortes foram lavados com PBS e as lâminas seladas com fluoromount.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Nikon TE 300, sendo fotografadas 10 imagens por tratamento.

5.2.10 Extração de RNA e qRT-PCR

Para quantificar a expressão do mRNA de genes codificadores de proteínas de interesse, foi realizada uma análise por PCR quantitativo. Para isto, o RNA total das amostras de encéfalos de ratos com as células tumorais foram extraídos. Três replicatas biológicas de cada grupo experimental foram coletadas. O RNA foi extraído utilizando o protocolo o reagente Trizol® (Catálogo # 15596026, Invitrogen LifeTechnologies), de acordo com as especificações do fabricante. A integridade e concentração de RNA total foram avaliados utilizando o auxílio do Nano Espectro KASVI (cat# K23-0002). Posteriormente o RNA (2,5 µg) foi tratado com DNase utilizando o Ambion® DNA-free™ kit (ambion cat# AM1906) e a síntese do cDNA foi realizada utilizando Super Script® VILO™ Master Mix (invitrogen, life technologies™, cat# MAN0004286) seguindo as instruções do fabricante. A PCR em tempo real foi realizado utilizando Ensaios de Expressão Gênica *Taqman*® (Applied Biosystems, CA, USA) que contêm dois iniciadores para amplificar a sequência de interesse e a sonda específica *Taqman*® MGB, marcada com o fluoróforo FAM a com o TaqMan® Universal Master Mix II com UNG

(Catálogo # 4440038 invitrogen, life technologies™). As identificações dos ensaios para os genes quantificados neste estudo foram: TNF (Rn01525859_g1), IL1B (Rn00580432_m1), IL10 (Rn00563409_m1), IL4 (Rn01456866_m1), NOS2 (Rn00561646_m1), IGF1 (Rn00710306_m1) todas de ratos. A PCR em tempo real foi realizada utilizando o instrumento QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, CA, USA). As condições de termociclagem foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. β -actina (Rn00667869_m1 para amostras derivadas de rato e Hs99999903_m1 para amostras derivadas de humanos) e HPRT1(Rn01527840_m1 rato, e Hs02800695_m1 humano) foram utilizados como genes de referência (controles endógenos) para normalização dos dados de expressão gênica.

5.2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média 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 Student-Newmann-Keuls (GraphPad Prisma 5.0- California, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efeitos do flavonoide apigenina na viabilidade tumoral

Visando determinar a sensibilidade das células de U-251 foi realizado o teste do MTT, que determina a viabilidade celular através da medida da função de desidrogenases mitocondriais. Quando comparado ao controle (DMSO 0,1%) foi observado que o flavonoide apigenina apresenta uma toxicidade sobre as células dose dependente, sendo que nas concentrações testadas (1-100 μ M) a toxicidade foi observada a partir da concentração de 50 μ M nos tempos de 24 e 48 h (fig 1A e B). Em contrapartida, sob as mesmas condições o flavonoide apresentou toxicidade já na concentração de 10 μ M no tempo de 72 h (fig 1 C).

Para verificar a sensibilidade das células tronco de glioma da linhagem TG1 e OB1 foi realizado o teste de WST. Foi verificado que no tempo de 24 h somente a concentração de 100 μ M mostrou-se tóxica para as células (fig 2F e G). Entretanto, quando as células foram expostas nas mesmas concentrações no tempo de 72 h, as células de ambas as linhagens mostraram-se sensíveis ao flavonoide na concentração de 50 e 100 μ M (fig 2H e I). A linhagem TG1 sob as mesmas condições mostrou-se mais sensível do que as células da linhagem OB1.

Outra possibilidade de verificar a toxicidade de substâncias a células-troncos tumorais é observar o tamanho celular após a exposição aos compostos. Neste sentido, quando as células foram expostas ao flavonoide na concentração de 50 μ M por 72 h ocorreu uma redução no tamanho celular (fig 2 E).

5.3.2 Efeitos do flavonoide sobre a morfologia das células

A indução de mudança morfológica do flavonoide apigenina nas células tumorais foi analisada por microscopia de contraste de fase. As análises revelaram que nas culturas de U-251, as células mostraram em condições controle uma monocamada apresentando um fenótipo bipolar, além de uma confluência total na placa. No entanto, quando expostas ao flavonoide nas concentrações de 50 e 100 μ M durante 48 horas, alterações importantes no número e no fenótipo de células aderidas foram verificadas. Nestas culturas as células apresentaram um fenótipo também bipolar, porém com citoplasma retraído, núcleo bastante refringente, prolongamentos delgados, e uma redução significativa no número de células aderentes às placas (fig 1 D, E e F).

A morfologia das células tronco tumoral em condições controle DMSO 0.1% mostra-se como um agregado de células que em virtude do seu estado de quiescência tende a proliferar-se e formar colônias (fig 1 A e C). Quando estas células foram tratadas com o flavonoide houve uma desagregação das colônias celulares, indicando uma interrupção da capacidade auto renovativa destas células-troncos (fig 1 B e D).

5.3.3 Indução de Morte Celular Programada

A capacidade de induzir morte celular programada pelo flavonoide apigenina foi inicialmente determinada através da citometria em fluxo para Anexina V nas células de U-251. Nas culturas de células tratadas com o flavonoide na concentração de 50 e 100 μM , 72 h após tratamento, $33,76 \pm 2,65$ e $42,86 \pm 5,51$ células positivas à anexina foram marcadas e um evento raramente presente nas culturas em condições controle $5,58 \pm 0,69$ (DMSO 0,1%) (fig 3).

5.3.4 Análises de vias de morte

A análise da formação de vacúolos autofágicos indicador de morte foi verificado pelo teste de laranja de acridina por citometria de fluxo, fluorimetria e fluorescência celular. Quando comparado com o controle (DMSO 0,1%) as células tratadas com o flavonoide apigenina 50 e 100 μM durante 72 h apresentaram marcação positiva para este corante com um aumento significativo, indicando a formação de vacúolos autofágicos (Fig 4).

5.3.5 Expressão de marcadores estruturais de diferenciação celular

Para a visualização da capacidade morfogênica do flavonoide apigenina sobre as células de U-251, TG1 e OB1 foi realizado uma imunocitoquímica para marcadores protéicos do citoesqueleto nestina, Bmi1, GFAP e β -3 tubulina após 48 h de exposição ao flavonoide nas concentrações de 50 e 100 μM .

A análise da expressão da proteína Nestina indicadora de célula indiferenciada mostrou uma elevada expressão para este marcador em condições controle nas células de U-251, TG1 e OB1, bem como para o marcador Bmi1 marcador de células tronco indiferenciadas. Após a modulação ao flavonoide observou-se uma redução da expressão desses marcadores, sugerindo uma possível diferenciação. As células apresentaram uma possível reatividade glial, em função do aumento da expressão de GFAP observada após tratamento com apigenina em 50 e 100 μM . Em paralelo também observamos um aumento da expressão da expressão da β -3 tubulina, indicando também uma diferenciação neuronal. Uma diminuição da celularidade, bem como retração citoplasmática e alteração do padrão de distribuição das proteínas, que se apresentou mais difusa no citoplasma acompanhando as modificações fenotípicas. Através desta técnica

observamos as células em condições controle apresentaram marcação difusa para a proteína nestina indicadora de células imaturas (fig 5 A). De maneira semelhante as células, expressam a proteína GFAP de forma homogênea distribuída na região citoplasmática (fig 5 D) e algumas células foram positivas para a β -3 tubulina (fig 5 G). Com a modulação as células aumentaram a expressão desses marcadores tanto em níveis celulares, quanto em nível de intensidade (fig 5 E a H). Além do mais, as células diminuíram sua marcação para o marcador nestina (fig 5 B e C). De maneira semelhante estes resultados repetiram-se nas linhagens de células tronco tumorais da TG1 e OB1. Essas características sugerem o flavonoide apigenina como um importante modulador morfológico.

5.3.6 Ensaio de Migração Celular

A caracterização da migração celular foi verificada após modulação com o flavonoide apigenina em diferentes tempos. Verificamos que o flavonoide quando comparado com a condição controle (DMSO 0,1%) e o controle positivo do teste DMSO 0,1% com SFB tem uma diminuição da migração celular, indicando assim um efeito antimigratório deste flavonoide (Fig 7).

5.3.7 Atividade antitumorigênica *in vivo*

Um dos grandes questionamentos com estudos realizados com compostos naturais é a sua eficácia em animais de laboratório. Neste sentido, investigamos o efeito antitumorigênico do flavonoide apigenina em células de glioblastoma da linhagem U-251 tratadas com 50 μ M de apigenina e xenotransplantados intracranialmente no caudado putamem em ratos imunocompetentes por 30 dias. Quando comparado com o animal controle que recebeu DMSO 0.1% observamos que o tamanho tumoral foi em média duas vezes maior que os animais que receberam as células pré-tratadas com a apigenina (fig 8 E). Além do mais nas análises histopatológicas nos animais controles foram evidenciados uma lesão macroscópicas, com uma área de necrose central sugestiva de uma neoplasia (fig 8 A). Para confirmar este achado uma coloração HE foi realizada para a visualização da composição celular e como mostrado na fig 8 C e D células neoplásicas foram visualizadas em ambos os grupos com características de atipia celular, figura de mitose, alterações morfológicas nucleares e uma grande

variedade celular, além de áreas necrosadas. Entretanto no grupo controle apesar dessas características se repetirem, observou-se uma maior quantidade de células tumorais e uma menor quantidade de áreas necrosadas.

5.3.8 Ambiente tumoral

Durante uma lesão cerebral, as células da glia tentam controlar a alteração e modificam a sua morfologia e alteram a expressão de proteínas estruturais. Neste sentido, buscamos observar qual o comportamento das células astrocíticas e das microglias diante da presença de células de um glioblastoma humano. Os astrócitos manifestam-se numa reação chamada de astrocitose reativa, em que estas células para conter o espalhamento da lesão e proteger o tecido aumentam a expressão da GFAP e modifica a sua morfologia. As células da microglia respondem da mesma forma, porém diante de um tumor elas modificam a sua morfologia e ficam hiporesponsivas ao tumor.

Desta forma, realizou-se uma imunohistoquímica para GFAP visando a marcação destes astrócitos que estariam realizando este fenômeno de astrogliose na área tumoral, como também nas áreas próximas ao tumor. Como mostrado na figura 9 em condições controle os astrócitos mostram-se muito mais aumentados e reativos na área tumoral, já na área peritumoral observou-se uma quantidade aumentada de astrócitos, porém a sua morfologia mostrou-se inalterada. Nos animais injetados com as células tratadas com apigenina a astrogliose mostrou-se menos reativa e a quantidade de astrócitos foi menor.

De maneira semelhante, foi realizada uma imunohistoquímica para IBA-1 visando a marcação microglial. Como esperado, nas condições controle houve um aumento da microglia, com uma alteração do fenótipo para uma morfologia ameboide, indicando uma ativação desta célula. Na área peritumoral, foi observada uma diminuição da quantidade de microglia, com a mesma morfologia da área tumoral. Por outro lado, nos animais com células tratadas com apigenina as microglias das áreas tumoral mostraram-se ativadas e na área peritumoral não foi observada nenhuma alteração morfológica.

5.3.9 Avaliação da expressão gênica de marcadores para progressão tumoral

O perfil de resposta imunológico cerebral diante de um glioblastoma é muito variável. As células, em especial as microglias e astrócitos, mostram-se imunoreativos e secretam citocinas e fatores tróficos que influenciam o crescimento e migração tumoral. Diante disso, objetivando-se saber o perfil de resposta do ambiente tumoral a expressão gênica através do RT-PCR foi realizada em ambos os hemisférios cerebrais, pois verificamos através da imunohistoquímica uma variação na morfologia e intensidade de marcadores específicos para estas células nos diferentes hemisférios cerebrais.

Sendo assim, ainda que de forma não repetitiva, verificamos a expressão de duas citocinas inflamatórias a TNF e IL1 β que no hemisfério com o tumor nas condições controle mostraram-se elevadas quando comparados com o mesmo hemisfério que recebeu as células tumorais pré-tratadas com a apigenina.

De maneira semelhante, verificamos a expressão das citocinas regulatórias IL-4 e IL-10 que em tumores cerebrais apresentam-se elevadas, indicando um ambiente imunossupressor. A IL-4 teve uma redução mais significativa quando comparada com a IL-10, que por sua vez mostrou-se muito mais elevada.

Por fim, para avaliarmos o prognóstico destes animais verificamos a expressão gênica para a IGF1, uma proteína produzida pelo fígado que no caso do glioblastoma mostra-se elevada. Logo, um tratamento farmacológico eficaz deve induzir a sua diminuição e o aumento de iNOS. No encéfalo com as células pré-tratadas com a apigenina houve uma redução nos valores desta expressão quando comparado ao encéfalo com o tumor controle.

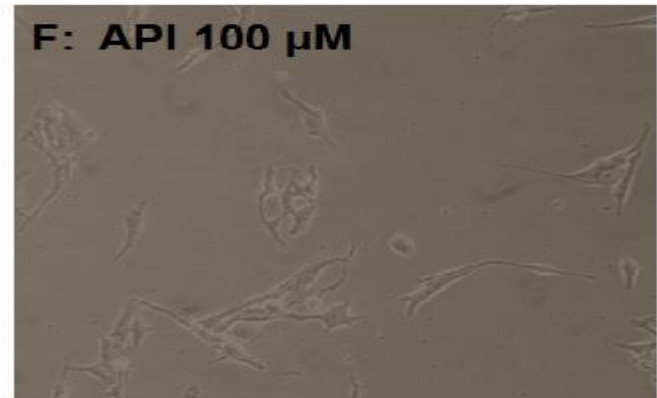
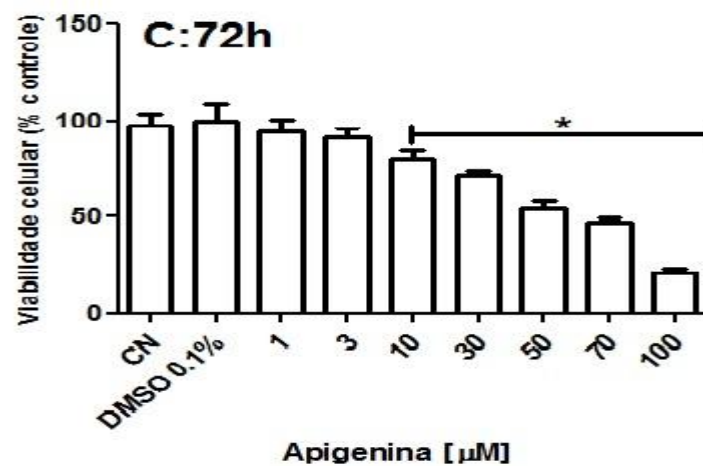
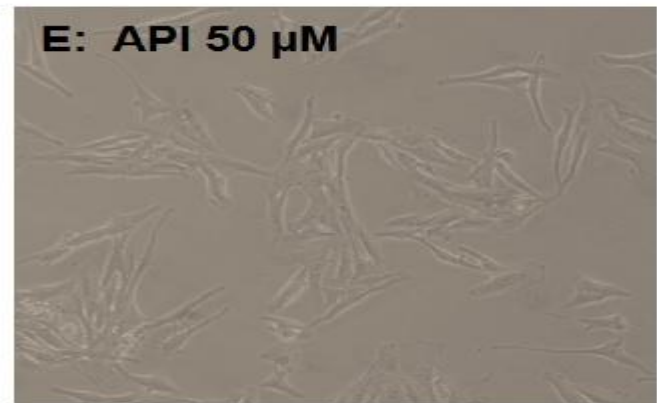
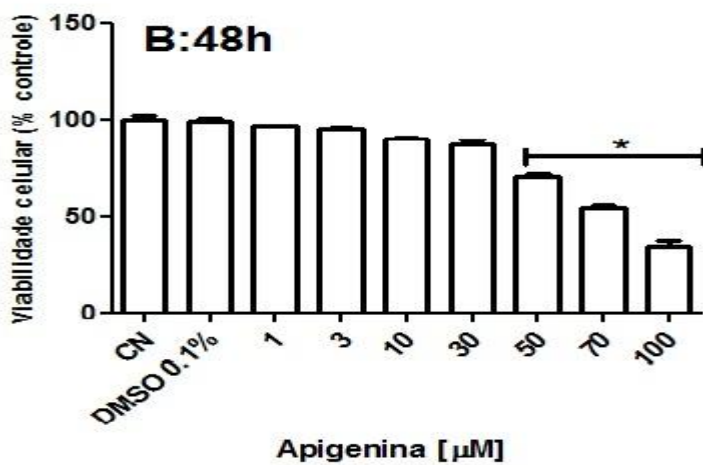
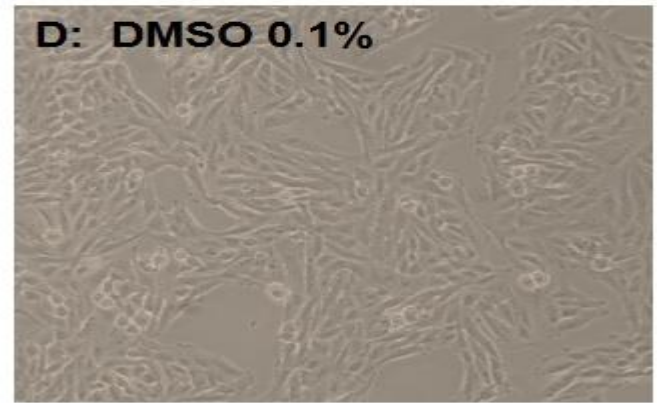
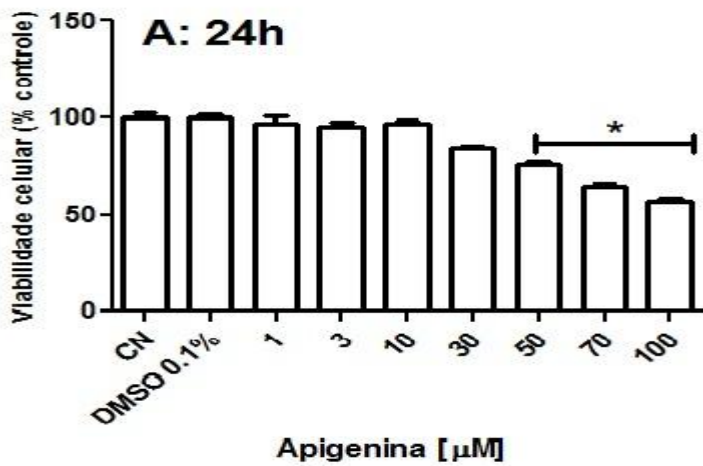


Figura 1: Efeito do flavonoide apigenina sobre a viabilidade das células de glioblastoma humano U-251 verificadas pelo teste do MTT. Cultura de U-251 após 24 (A), 48 (B) e 72 h (C) de tratamento. Microscopia por contraste de fase em condições controle (DMSO 0,1%) (D), e após tratamento com apigenina 50 µM (E) e 100 µM (F) durante 72 h. Resultados expressos em média ± desvio padrão, como porcentagem em relação ao DMSO 0,1% CN considerado como 100%. (*) $p < 0.05$ em relação ao controle DMSO 0,1%. Barra de escala = 100 µm

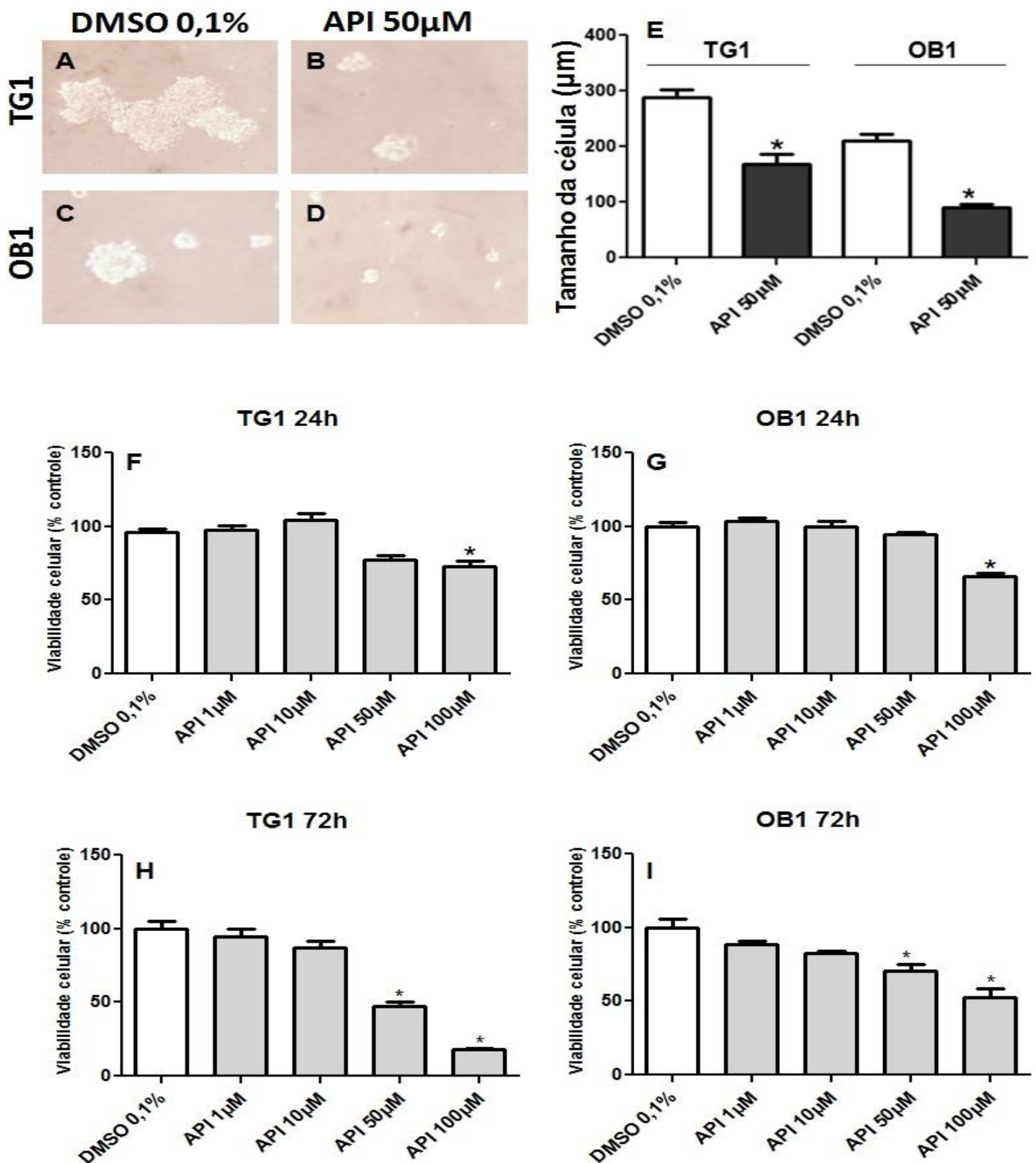


Figura 2: Efeito do flavonoide apigenina sobre a viabilidade e morfologia das células TG1 e OB1 avaliados pelo teste WST. Microscopia por contraste de fase em condições controle (DMSO 0,1%) e tratadas com apigenina 50 μM durante 72 h (A-D). Medida da área celular em μm (E) . Teste do WST em células de TG1 e OB1 após 24 h e 72 h de tratamento (F-I). Resultados expressos em média ± desvio padrão. P < 0.05 em relação ao controle DMSO 0,1%, considerado como 100%. (*) p < 0.05 em relação ao controle DMSO 0,1%. Barra de escala = 100 μm

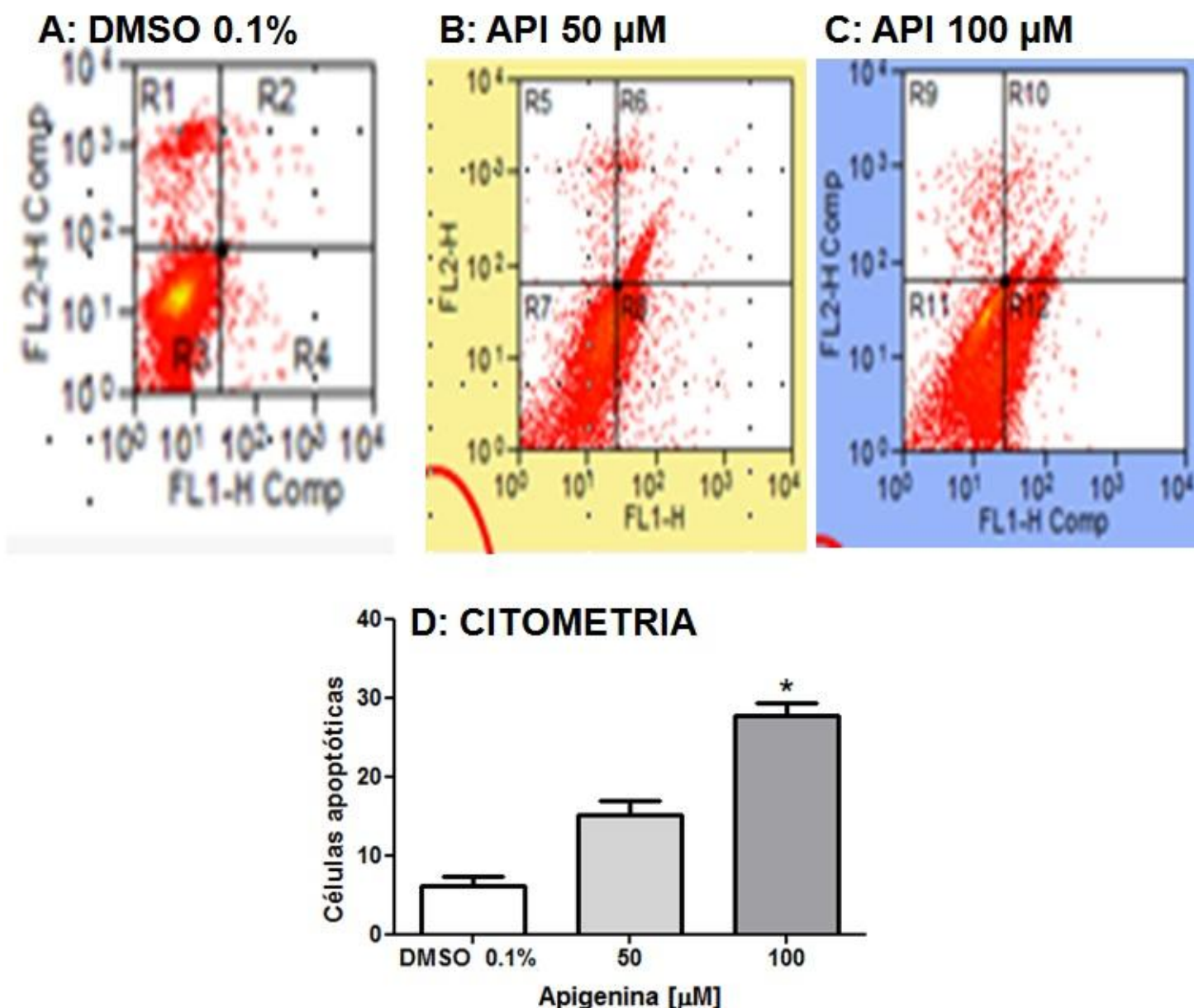


Figura 3 – Citometria em fluxo para Anexina V em células tumorais da linhagem U-251 após 72h de exposição ao controle (DMSO 0,1%) ou ao flavonoide apigenina nas concentrações de 50 e 100 μM . Histograma em condições controle (A), tratados com apigenina 50 μM (B) e 100 μM (C). No histograma, o primeiro quadrante inferior esquerdo significa as células vivas, o segundo quadrante inferior direito as células apoptóticas, o quadrante superior direito indica apoptose tardia e a o esquerdo as células em necrose. Gráfico representado a percentagem de células apoptóticas nos diversos tratamentos (D). Leitura da fluorescência da anexina V realizada por citometria em fluxo no aparelho FACS calibur (Becton & Dickinson) no canal FL-1 e a do iodeto de protídeo (IP), no canal FL-2. (*) $p < 0.05$ em relação ao controle DMSO 0,1%.

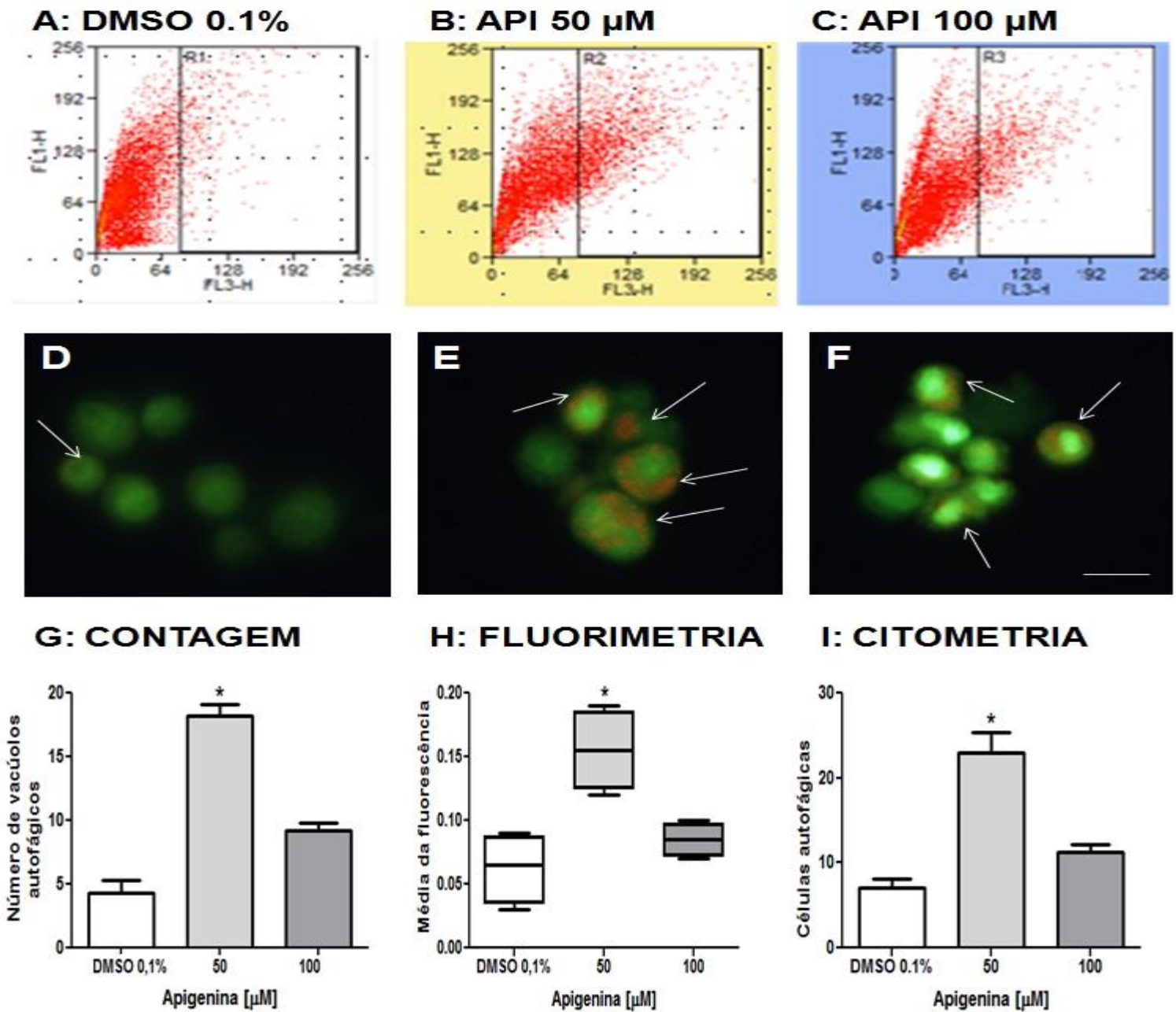


Figura 4- Análise da indução de autofagia pela apigenina em células de glioblastoma humano U-251 após 72 h por citometria em fluxo. Histograma representando a distribuição das células em condições controle (A), tratadas com apigenina 50 μ M (B) e 100 μ M (C). O primeiro quadrante esquerdo significa as células vivas, o segundo quadrante direito as células com vacúolos autofágicos. Células em fluorescência com visualização dos vacúolos autofágicos em laranja (D,E,F). Contagem de células com vacúolos autofágicos (G). Densidade de fluorescência a 570 nm. Número de células autofágicas medidas no citômetro de fluxo (I). (*) p < 0.05 em relação ao controle DMSO 0,1%. Setas indicam os vacúolos autofágicos. Obj de 400 X e barra de escala 100 μ m.

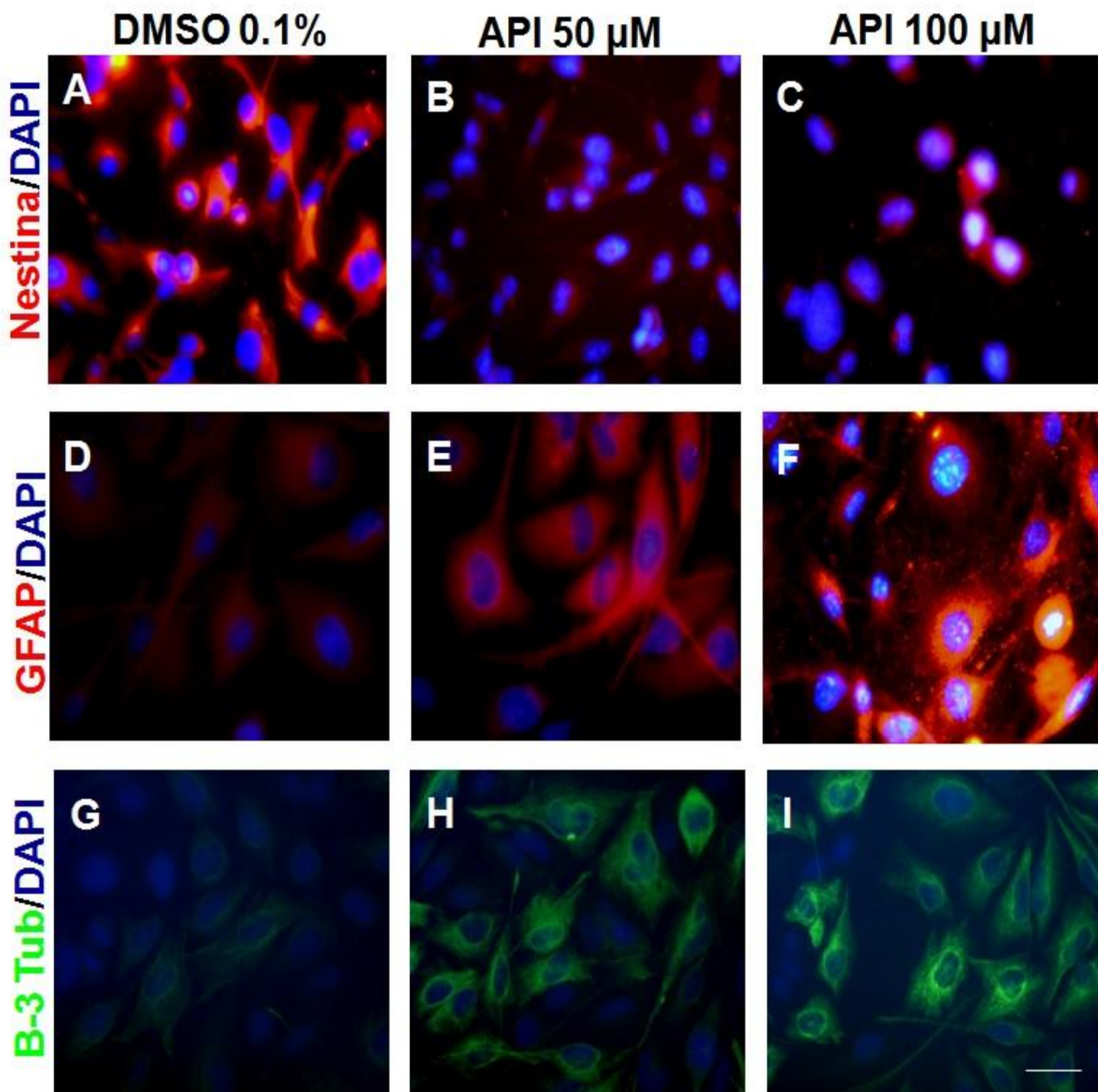


Figura 5: Imunocitoquímica das proteínas do citoesqueleto nestina (em vermelho), GFAP (em vermelho) e beta III tubulina (B-3 Tub, em verde) e marcação para DAPI (em azul) em células da linhagem U251 exposta ao meio controle (DMSO 0,1%), apigenina 50 μ M e 100 μ M durante 72 h. (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido). Barra de escala = 100 μ m. Objetivas 40 x

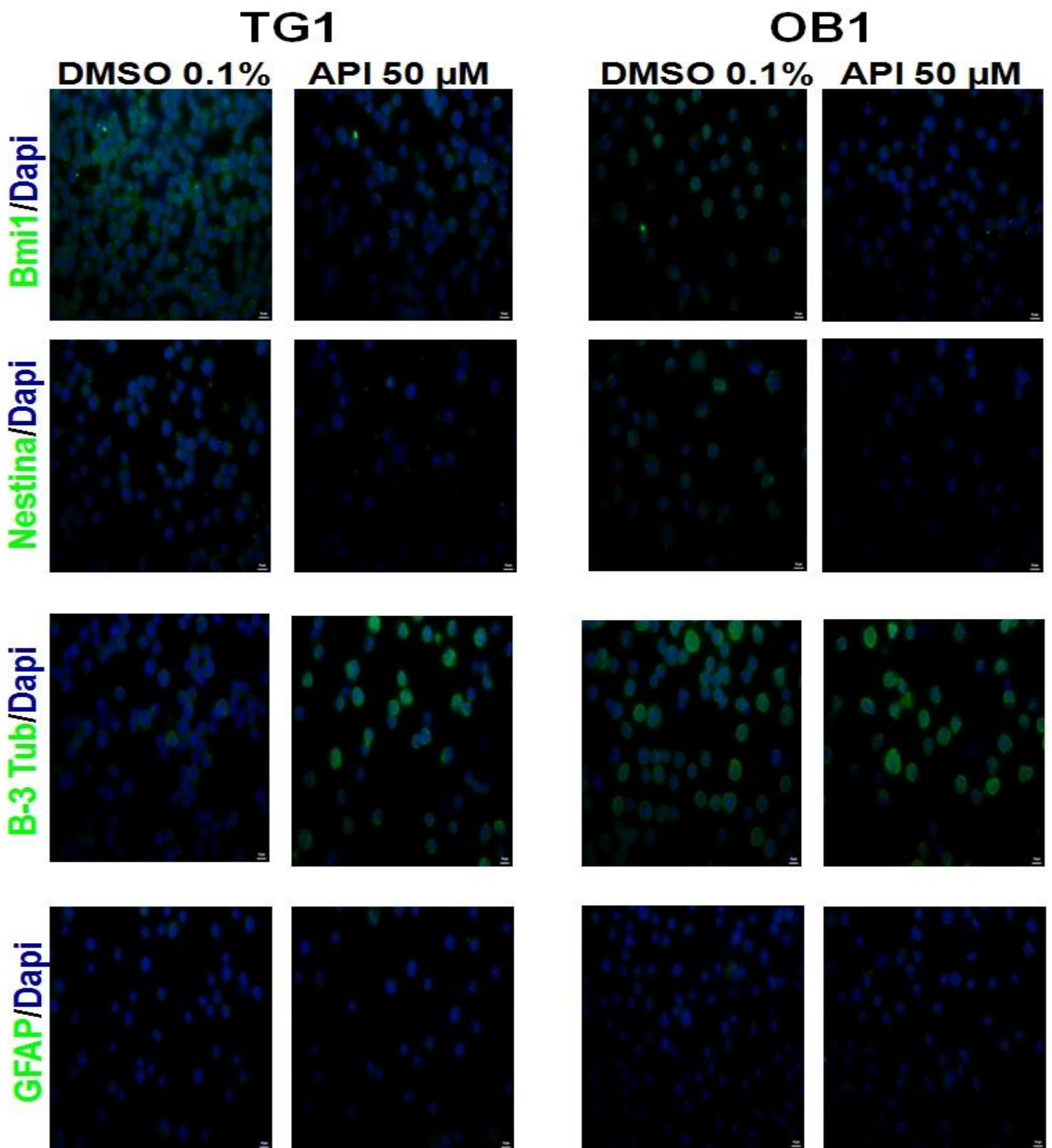


Figura 6: Imunocitoquímica das proteínas do citoesqueleto Bmi1, nestina, beta III tubulina (B-3 Tub) e GFAP, (todas em verde), marcação para DAPI (em azul) e em células da linhagem TG1 e OB1 exposta ao meio controle (DMSO 0,1%) ou tratadas com apigenina nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M durante 72 h. (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido). Barra de escala = 50 μ m. Objetivas 40 x.

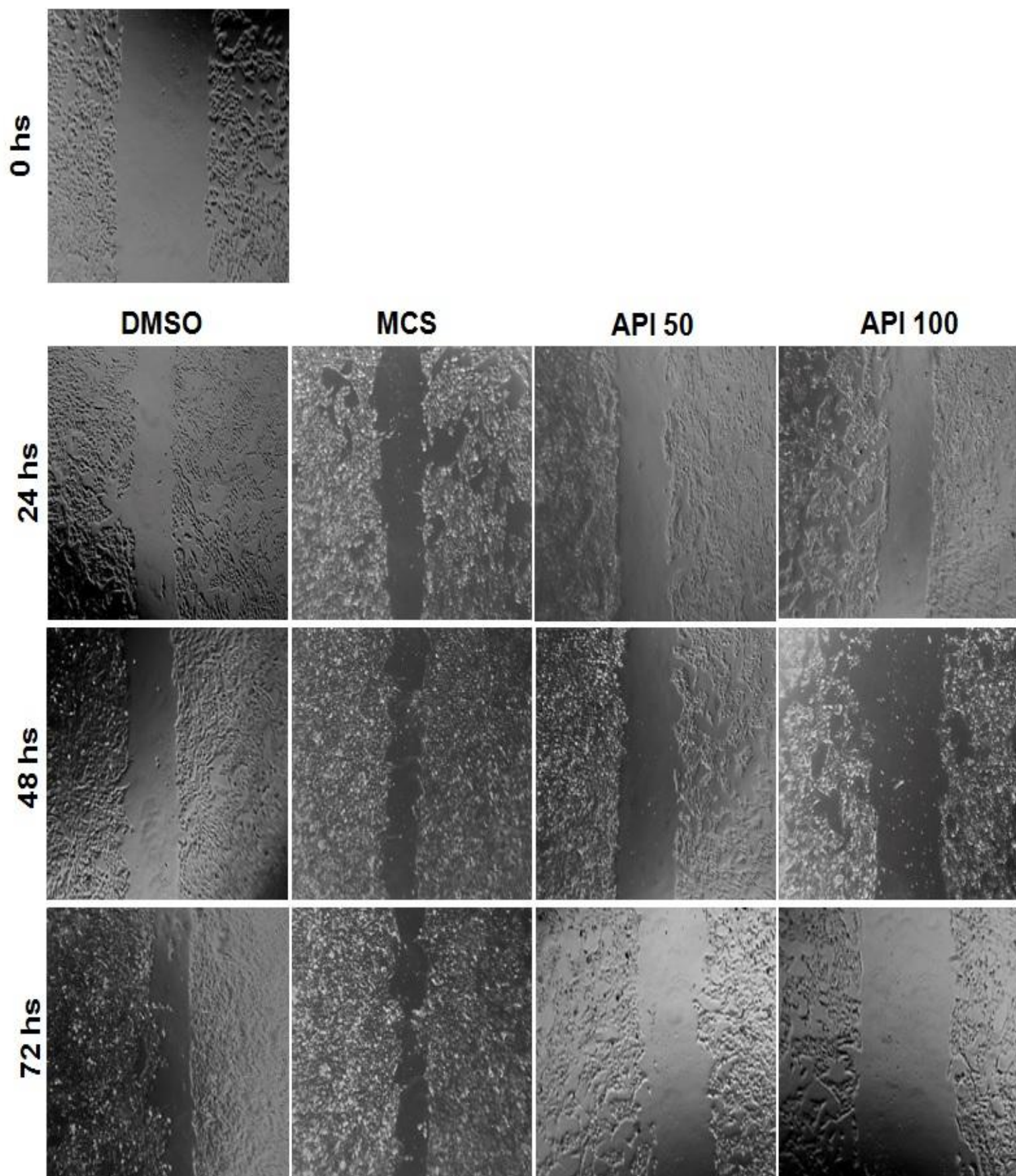


Figura 7- Avaliação da migração celular das células de glioblastoma humano U-251 tratadas com meio controle (DMSO 0,1%), meio com soro (DMSO 0,1% + SFB 10%) ou com o flavonoide apigenina na concentração de 50 e 100 μM após 24, 48 e 72 h.

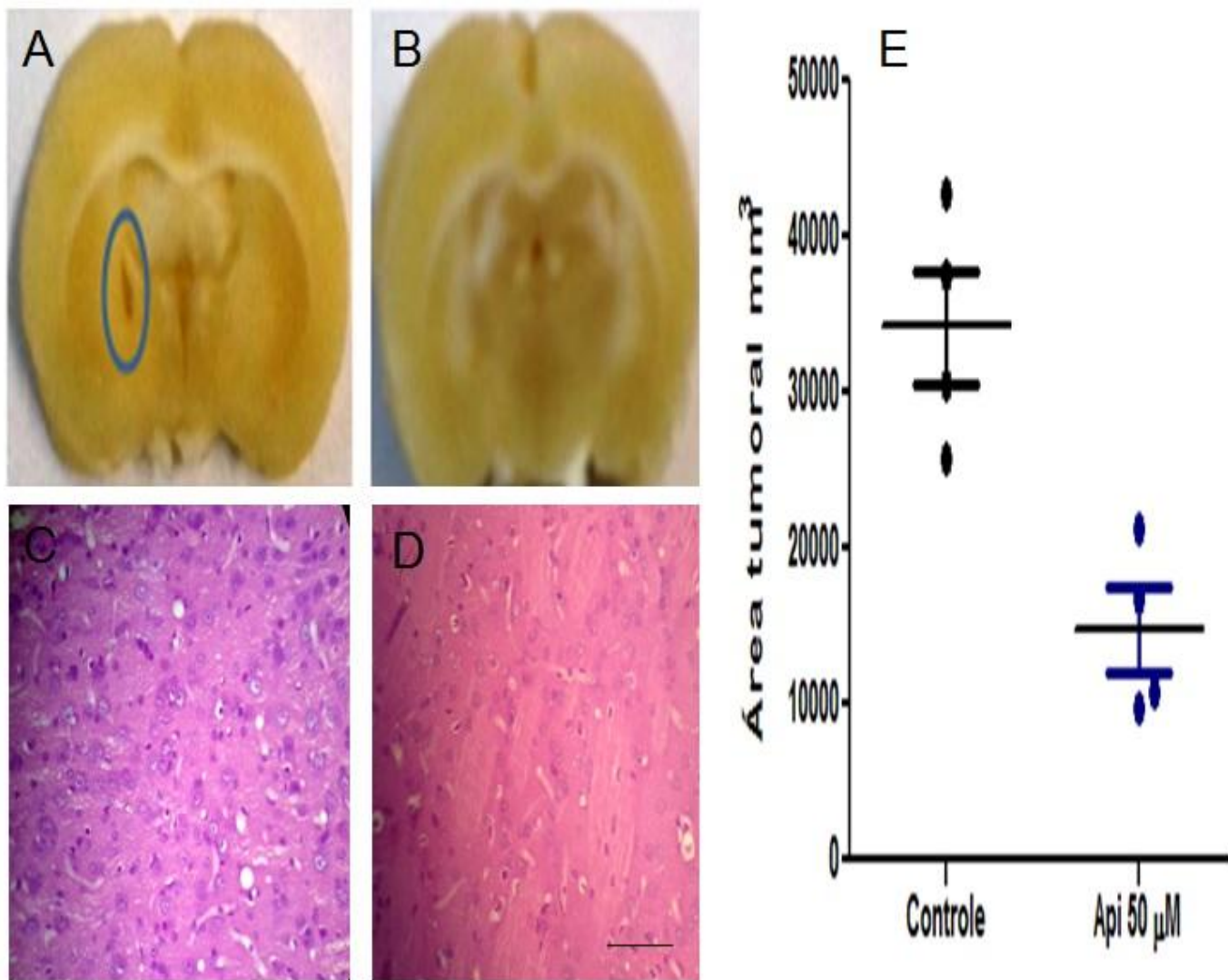
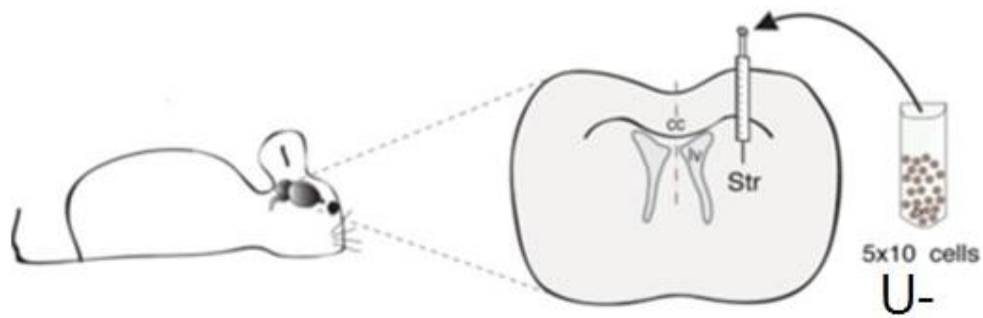


Figura 8- Avaliação do potencial antitumorigênico da apigenina em células de glioblastomas humanas U-251 xenotransplantadas em ratos. Avaliação macroscópica do encéfalo do animal controle que recebeu células de U-251 tratadas com DMSO 0.1% (A) e tratadas com apigenina (API) na concentração de 50 µM (B). Avaliação microscópica pela coloração de hematoxilina eosina em aumento de 100 X (C e D). Área tumoral em condições controle a após tratamento com apigenina (E). (*) $p < 0.05$ em relação ao controle DMSO 0,1%. Barra de escala = 100 µm.

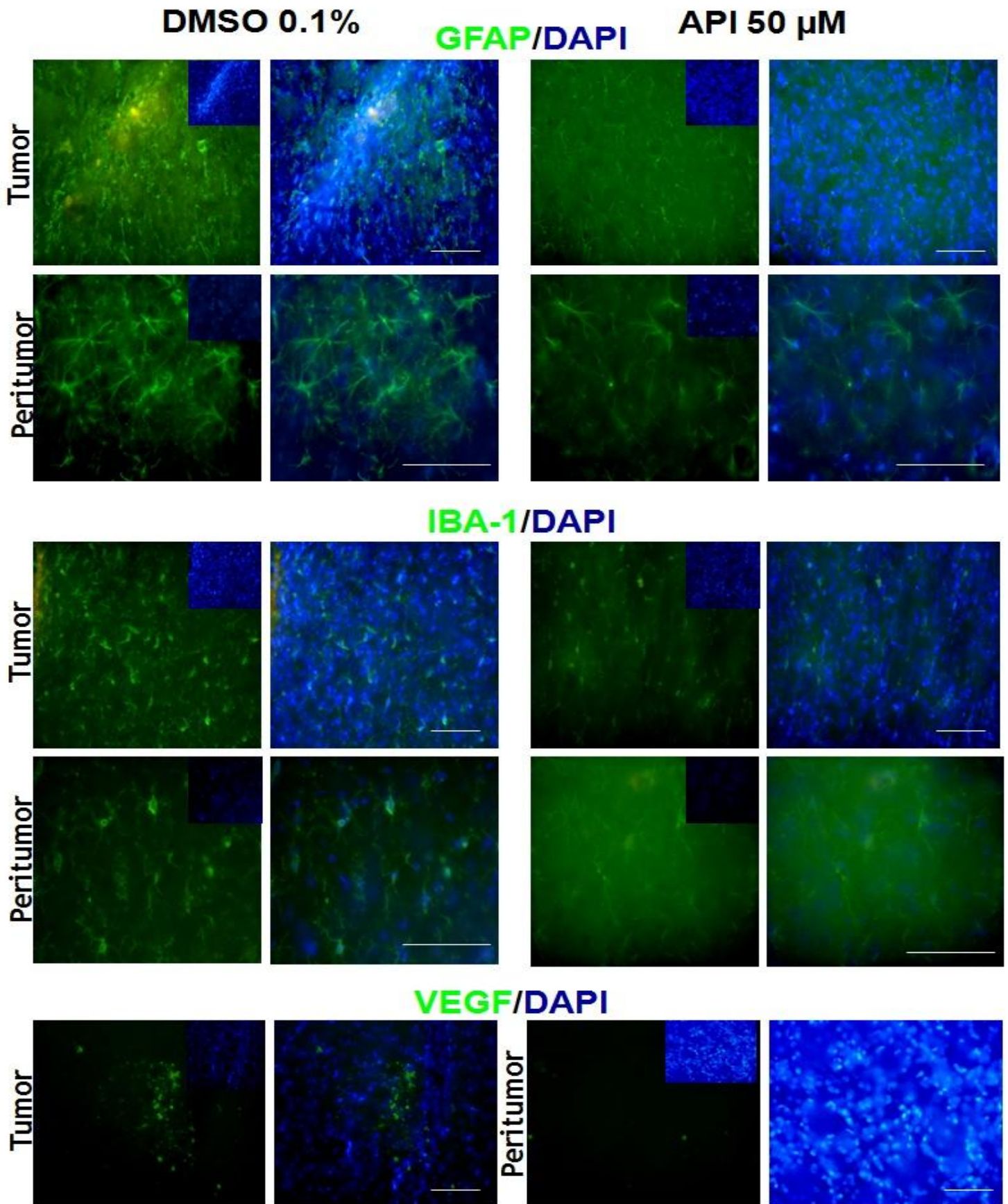


Figura 9: Avaliação do ambiente tumoral através de imunohistoquímicas em encéfalos de ratos com células de glioblastoma humano da linhagem U-251. Barra de escala = 100 μ m. Objetivas 20 X e 40

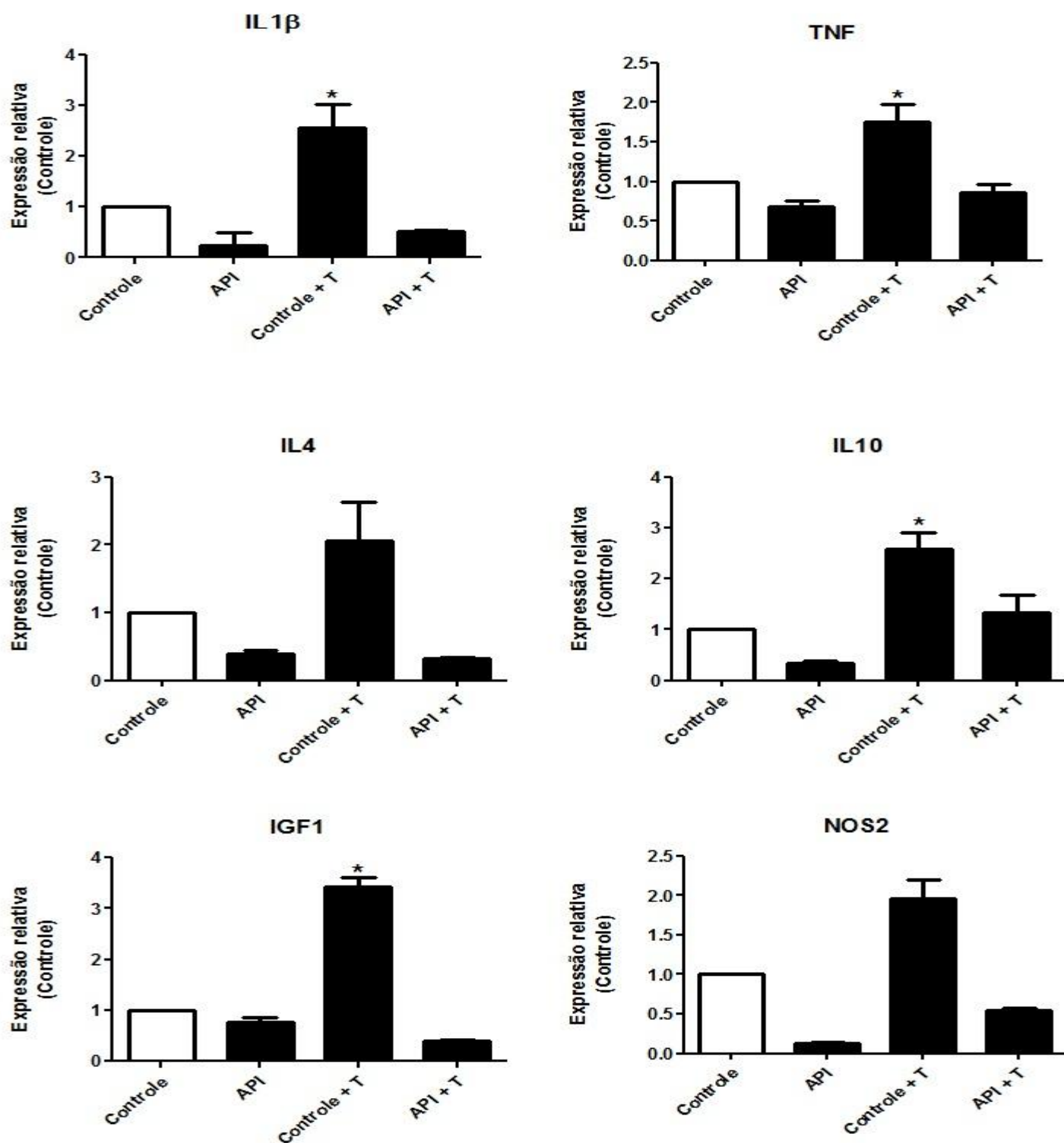


Figura 10: Avaliação do ambiente tumoral através do RT-PCR em encéfalos de ratos com células de glioblastoma humano da linhagem U-251. (*) $p < 0.05$ em relação ao controle DMSO 0,1%. (*) $p < 0.05$ em relação ao controle.

5.4 DISCUSSÃO

Diversos estudos *in vitro* com linhagens celulares tumorais são utilizados para investigar a atividade biológica de biocompostos naturais para serem utilizados no tratamento para essas patologias (YUNES & CALIXTO, 2001). Em nosso estudo utilizamos como modelo experimental células de glioblastoma humano da linhagem U-251 e células tronco de glioblastomas humanos da linhagem TG1 e OB1 caracterizadas e estabelecidas por Patru et al. (2010), para investigar a atividade antitumoral do flavonoide apigenina extraído das folhas de *Croton betulaster* (BARBOSA, 2003).

Inicialmente, determinamos através do teste de MTT se o flavonoide estudado inibe o crescimento das células de U-251 nas concentrações de 1-100 μM após 24 h de tratamento. A redução na concentração celular foi dose e tempo dependente, apresentando redução significativa a partir da concentração de 10 μM no tempo de 72 h. Diversos estudos na literatura demonstram a capacidade antitumoral de flavonoides em concentrações dose e tempo dependentes (KIMA et al. 2001; SANTOS et al. 2011; COELHO et al., 2016). Verificamos também pelo teste de WST a sensibilidade de células tronco derivadas de glioblastomas humanos à apigenina. Como esperado em virtude da alta resistência e malignidade das células troncos de glioblastomas aos tratamentos radioterápicos e quimioterápicos (PATRU et al., 2010) estas células foram menos sensíveis ao flavonoide quando comparado as células de glioblastomas sob as mesmas condições (PITANGA et al., 2012).

Nossos estudos revelaram igualmente que o flavonoide apigenina induz morte celular programada nas células de U-251, como demonstrado através da marcação da citometria em fluxo para anexina V, indicando um processo apoptótico (JELLINGER 2006; GREENE, et, al., 2007). Estes resultados mostram que a apigenina é capaz de reduzir a proliferação celular e apresenta um efeito inibitório através da indução de apoptose, propriedade fundamental na busca de fármacos com atividade antitumoral.

Os flavonoides estão despertando o interesse da comunidade científica, devido as suas propriedades biológicas, inclusive antitumorais. Scheck et al. (2006) demonstraram que o extrato total de *Scutellaria baicalenses*, o qual possui flavonoides em sua constituição, inibiu de forma dose dependente a viabilidade celular em linhagem de glioblastoma humano, além de inibir o crescimento e induzir apoptose. Essas pesquisas apontam este extrato como promissor adjuvante no tratamento de gliomas malignos. Ferguson et al. (2006) relataram que flavonoides presentes na *Vaccinia macrocarpa* (amora) induziram inibição da proliferação celular, parada do ciclo celular e apoptose em glioblastoma humano da linhagem U87. Branganhol et al. (2006) observaram que o flavonoide quercetina inibiu a proliferação celular na linhagem de glioblastoma humano U138MG e causou inibição da viabilidade celular, indução de apoptose e parada do ciclo celular na fase G2. Outros estudos mostraram redução da viabilidade celular em glioblastoma causada pelo flavonoide isoquercitrina (AMADO et al., 2009) O efeito inibitório de flavonoides foi igualmente verificado em outros tipos de células tumorais. Roy et al. (2007) demonstraram que o flavonoide bacaleina inibiu a proliferação de células tumorais de colon (HT-29) e câncer de próstata (DU-145) *in vitro*. YE et al. (2007) evidenciaram que os flavonoide extraídos de *Leistocolyx operculatus* induziram inibição da atividade metabólica e apoptose em linhagem de câncer de pulmão (SMMC-7721), pâncreas (8898), leucemia crônica (K562), câncer cervical uterino (HeLa) e carcinoma de pulmão (95-D).

Diversas pesquisas têm sido divulgadas atribuindo várias atividades biológicas aos mesmos flavonoides extraídos da planta *Croton betulaster* Mull. Estudo feito por Haidara et al. (2006), sugeriram que o flavonoide casticina pode ser importante na terapia contra câncer, pois este flavonoide inibiu a proliferação de linhagem celular de carcinoma epidermal *in vitro*. Kobayakawa (2004) atribuiu à casticina a parada do ciclo celular na fase G2-M, em linhagem celular de câncer de pulmão e carcinoma de colon, confirmando assim sua importante atividade antitumoral. O flavonoide penduletina mostrou atividade antitumoral nas células de câncer de mama (LI et al., 2005). No modelo de glioblastomas, Freitas et al., 2010 e Coelho et al., 2015 demonstraram a capacidade destes mesmo flavonoides em inibir a angiogênese e o crescimento tumoral de células da linhagem GL-15.

Diversos estudos na literatura demonstram a atividade antitumoral da apigenina. Cardenas et al. (2006), divulgaram em sua pesquisa *in vitro* que o flavonoide apigenina inibiu a proliferação e viabilidade de células de câncer de mama, melanoma, colo uterino e adenocarcinoma. Além disso, este composto induziu apoptose em células de leucemia e de carcinoma (ZHENG et. al. 2005; VARGO et. al. 2006). Bektic et. al. (2006) demonstraram a que a apigenina inibiu a proliferação de células prostáticas cancerígenas, além de pára o ciclo em G1/S. Outros estudos demonstraram a eficácia da apigenina em inibir a proliferação, induzir apoptose de células prostáticas e parar o ciclo celular em G1/S (BEKTIC et al, 2006; SEO et al, 2011). Além do mais, gliomas e hepatomas, apresentaram grande sensibilidade a este flavonoide (WATJEN et al, 2007; SEIBERT et. al. 2011).

Neste sentido os nossos resultados apontam o flavonoide apigenina como possível composto a ser utilizado no tratamento dos gliomas. Verificamos pela microscopia por contraste de fase, a capacidade da apigenina em induzir mudanças morfológicas nas células tumorais. Observamos que o tratamento com esse flavonoide na concentração de 50 e 100 μM induz modificações morfológicas nas células U-251, representadas por contração do corpo celular assim como emissão de prolongamentos. Estudo realizado por Coelho et al. (2015 e 2016) mostraram que flavonoides da *Croton betulaster*, inclusive a apigenina, possui um papel diferenciador nas células de glioblastoma da linhagem de glioma humano GL-15 e murino C6. Nossos resultados demonstram que a apigenina é capaz de induzir alterações fenotípicas nas células gliomatosas da linhagem U-251, TG1 e OB1. Essas alterações sugerem um potencial morfogênico que foi comprovado através da marcação para as proteínas nestina, Bmi1, GFAP e β -3 tubulina. O potencial morfogênico de flavonoides extraídos da *C. betulaster* Mull tem sido demonstrado em culturas primárias de neurônios corticais de ratos (SPHOR, 2010), e cultura de células de GL-15 (NONES et al., 2010). Além do mais, os nossos resultados corroboram com os da literatura indicando que os flavonoides apresentam propriedades morfogênicas e indutoras de morte celular programada. Nas células de U-251, TG1 e OB1 foram observadas inibição da proliferação celular e indução de diferenciação, além do aumento da morte celular por apoptose e indução autofágica. Estas propriedades são essenciais para um fármaco com atividade antitumoral e podem ser utilizadas na terapia adjuvante dos gliomas.

Este flavonoide possui em sua estrutura quantidades variadas de grupamentos hidroxila e metil. Diversas pesquisas apontam esta característica como um fator importante para as propriedades antitumorais desses compostos (SANTOS et al., 2015). Além do mais já foi descrito a passagem deste composto pela barreira hematoencefálica (POPOVIC et al., 2014)

A maioria dos experimentos com estereotaxia utilizam o xenotransplante, em especial com células tumorais humanas para desenvolvimento do tumor no SNC. Esta metodologia é mais eficaz, pois compara os resultados obtidos nos animais com o desenvolvimento da biologia tumoral dos humanos, principal objetivo dessas pesquisas científicas (KANTELHARDT et al., 2010; GARCIA et al., 2014). Novas metodologias utilizam biópsia de gliomas extraídas de pacientes humanos e as injetam diretamente nos cérebros de ratos para o estudo do comportamento tumoral individualizado, evitando assim controversas devido a utilização de linhagens diferentes estabelecidas a muito tempo nos laboratórios (WANG et al., 2009).

Os resultados obtidos nos experimentos de xenotransplante de células de glioblastoma humano em ratos mostraram-se semelhantes aos descritos na literatura, tendo em vista a formação e desenvolvimento do tumor em condições pré-estabelecidas. Nestas condições o glioblastoma não é capaz de metastizar e mantém suas características próprias ao apresentar uma grande densidade celular, pleomorfismo nuclear, presença de necrose e de células multinucleadas, indicando uma alta atividade mitótica (CALDOLFI et al., 2007; WANG et al., 2009). Igush et al. (2007) e Garcia et al. (2014) demonstraram, de maneira semelhante ao nosso trabalho, a capacidade dos astrócitos em realizar astrogliose na proximidade do tumor. Entretanto, esta reação não é uniforme ao longo dos hemisférios cerebrais, o que, de certa forma, demonstra um perfil de resposta diferenciado em cada região cerebral. As células da microglia comportaram-se na região tumoral com um fenótipo ameboide, expressando maior quantidade do marcador IBA-1. Nos nossos experimentos com animais que receberam células tratadas com apigenina, o comportamento celular no hemisfério contralateral ao implante das células tumorais foi semelhante ao encontrado por Garcia et al. (2014).

Albulescu et al.2013 verificaram no soro de pacientes com glioblastomas humanos que os níveis das citocinas IL1- β , TNF e IL-10 estavam elevadas, sendo estas envolvidas na progressão e agressividade tumoral, diferentemente da IL-4 que mostrou-se com os níveis baixos. Em nossos experimentos demonstramos que o pré-tratamento de células de glioma U-251 com apigenina resultou na redução da expressão gênica dessas citocinas nos encéfalos de ratos xentrasplataados, alterando o perfil TH2 para TH1 no microambiente cerebral. As citocinas inflamatórias IL1- β e TNF estão envolvidas diretamente na progressão e malignidades dos glioblastomas. A IL1- β regula a sobrevivência e invasão das células de glioblastoma (PAUGH et al., 2009). Esta citocina relaciona-se diretamente com a IL-6 e IL-8, que estão envolvidas no processo de migração tumoral (YEUNG et al., 2012). De maneira semelhante o TNF por estar hiper regulado induz invasão tumoral através da ativação de metaloproteinases através da produção de NF κ B pelas células tumorais. Neste sentido, tratamentos que reduzam a produção de TNF, como o resveratrol, tiveram a capacidade em inibir a invasão de células de glioblastomas da linhagem U-373 e C6 (RYU et al., 2011). Nossos resultados com a apigenina, portanto, mostraram-se eficazes na inibição da produção de TNF nos encéfalos de ratos e estão relacionados com o pouco crescimento de massa tumoral nos animais xenotransplantados.

Por outro lado, existem inúmeros estudos que demonstram que os glioblastomas secretam citocinas imunossupressoras para tornar o ambiente favorável ao seu crescimento e disseminação no SNC (KUMAR et al., 2006; COELHO et al., 2016). Em nosso modelo demonstramos que os níveis de IL-10 estão aumentados no hemisfério cerebral que recebeu as células de glioblastoma U251 controle (tratadas com DMSO 0,1%). Em contrapartida, no hemisfério cerebral de animais que receberam xentrasplantes de células pré-tratadas com apigenina os níveis de expressão da citocinas reduziram significativamente. Qiu et al.,2011 através de RT-PCR indicaram que os níveis de IL-10 em células tronco de glioblastomas humanos estão elevados, o que está relacionado com o seu alto poder de renovação celular. A IL-4 por sua vez está envolvida na inibição da proliferação celular e regulação da adesão de moléculas, que contribuem para a imunossupressão local (ALBULESCU et al., 2013). De maneira semelhante à IL-10 a apigenina mostrou-se capaz em inibir a expressão gênica desta citocina nos encéfalos dos ratos xenotransplantados com células tratadas com este flavonoide.

Estes resultados também estão em consonância com Xue et al. (2017) que verificaram inibição destas citocina com a utilização do ácido clorogênico.

O perfil de resposta TH1 nos glioblastomas é responsável por alterações imunológicas que favorecem a eliminação das células tumorais. Neste ambiente a produção do óxido nítrico sintase (iNOS) encontra-se elevada. Xue et al. (2017) mostrou aumento da expressão de iNOS após estímulo com LPS/IFN γ em co-culturas de células de glioblastoma/microglia humanas através da modulação com o ácido clorogênico. Nossos resultados apresentaram também uma elevação da expressão de iNOS nos ecéfalos de animais xenotransplantados com células pré-tratadas com a apigenina, sugerindo a apigenina como um bom regulador do perfil de resposta Th2 para TH1.

Estudos recentes demonstraram a presença e importância no bloqueio da expressão do IGF1 em células de glioblastoma extraídos de biopsias tumorais para diminuir o crescimento e sobrevivência das células (GONG et al., 2016). De modo semelhante, através do RT-PCR para IGF1, buscamos verificar a sua expressão gênica nos encéfalos de ratos. Em nossos experimentos demonstramos que as células pré-tratadas com o flavonoide apigenina diminuíram a expressão desta proteína, sugerindo um bom prognóstico a estes animais.

Os resultados aqui apresentados são muito promissores, pois mostram o potencial do flavonoide apigenina como uma possível estratégia terapêutica adjuvante futura contra os glioblastomas malignos. Por fim, estudos mais detalhados em nível de sinalização e receptores celulares são necessários para desvendar os mecanismos de ação deste flavonoide neste modelo de estudo.

9. REFERÊNCIAS

AMADO, N. G.; CERQUEIRA, D M.; MENEZES, F.S., SILVA, J. F. M., MOURA-NETO, V.; ABREU, J. G. Isoquercitrin isolated from Hyptis fasciculata reduces glioblastoma cell proliferation and changes b-catenin cellular localization **Anti-Cancer Drugs**, v. 20 n.7 p.543-552, 2009.

ANDERSON, J. C.; MC FARLAND. B.C. AND GLADSON, C. L. New molecular targets in angiogenic vessels of glioblastoma tumours. **Expert Rev Mol Med.**, v.7, p.10-23, 2008.

BARBOSA, P.R.; FASCIO, M.; MARTINS, D.; GUEDES, M.L.S.; ROQUE, N.F. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics And Ecology.**, n.31, p.307-308, 2003.

BEKTIC, J.;GUGGENBERGER, R.;SPENGLER, B.;CHRISTOFFEL, V.;PELZER, A.;BERGER, A.P.;RAMONER, R.;BARTSCH, G.;KLOCKER, H . The flavonoid apigenin inhibits the proliferation of prostatic stromal cells via the MAPK-pathway and cell-cycle arrest in G1/S. (Maturitas) n.55 p.37-46. 2006

BRAGANHOL, E.; ZAMIN, L.L.;CANEDO, A.D.;HORN, F.; TAMAJUSUKU, A.S.;WINK, M.R.; SALBEGO, C.; BATTASTINI, A.M. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. **Anticancer Drugs** n.17 n.6 p.663-671 2006

CANDOLFI, M.; CURTIN, J.F.; NICHOLS, W. S.; MUHAMMAD, AKM. G.; KING, G.. D.; M, LERNER, J.; LOWENSTEIN, P. R.; CASTRO, M. G. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. **J Neurooncol.** n.85 v.2, p.133–148. 2007.

CARDENAS, M.; MARDER, M.; BLANK, V.C.; ROGUIN, L.P.Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell line. **Bioorg Med Chem** n.1 p.14 p. 966-2971 2006

COELHO, P.; FREITAS, B.; PITANGA, P.; SILVA, A.; OLIVEIRA, N.; COSTA, S. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Braz J Pharmacognosia** n. 26 p.34–43. 2015

COELHO, P.; OLIVEIRA, M.; SILVA, A.; PITANGA, B.; SILVA.; FARIA, G.; SAMPAIO, G.; COSTA, M.; SOUZA, S.; COSTA, S. The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells **Anticancer Drugs** 2016

COSTA, S.L.; PAILLAUD, E.; FAGES, C.; ROCHETTE-EGLY, C.; JOUAULT, H.; PERZELOVA, A.; TARDY, M. Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. **Eu. J Cancer** n.37 p.520-530. 2001.

DAS, A., BANIK, N. L., RAY, S. K. Flavonoids Activated Caspases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells But Not in Human Normal Astrocytes **Cancer** v.1 n.116 p.164–176 2010

FERGUSON, P.J.; KUROWSKA, E.M.; FREEMAN, D.J.; CHAMBERS, A.F.; KOROPATNICK, J. In vivo inhibition of growth of human tumor lines by flavonoid fractions from cranberry extract.**Nutr Cancer** n.56 v.1 p. 86-94. 2006

FREITAS, S. R. V.-B Efeito dos flavonoides de *cróton betulaster* mull no controle do crescimento e regulação de citocinas pró- angiogênicas vegf e tgf- β em células de glioblastoma multiforme humano [dissertação de mestrado] Universidade Federal da Bahia, Salvador Bahia, 2009. 102 p.

FREITAS, S.; COSTA,SILVIA.; AZEVEDO, C.; CARVALHO, G.; FREIRE,S.; BARBOSA, P.; VELOZO, E.; SCHAEER, R.; TARDY, M.; MEYER, R.; NASCIMENTO, I. Flavonoids Inhibit Angiogenic Cytokine Production by Human Glioma Cells. **Phytotherapy Research**. 2010

GONG, Y.; MA, Y.; SINYUK, M.; LOGANATHAN, S.; THOMPSON, R. C.; SARKARIA, J. N.; CHEN, W.; LATHIA, J. D.; MOBLEY, B. C.; CLARK, S. W.; WANG, J. Insulin-mediated Signaling Promotes Proliferation and Survival of Glioblastoma Through Akt Activation. **Neuro-Oncology** n.18 v.1 p.48-57. 2016.

GREENE, L. A.; LIU, D. X.; TROY, C. M.; BISWAS, S. C. (2007).Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 392–401, 2007.

HAGEMANN, T.; WILSON, J.; KULBE, H. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF- κ B and JNK. **Journal of Immunology**. v. 175, n. 2, p. 1197–1205, 2005.

HAIDARA, K.; ZAMIR, L.; SHI, QUI-WEN.; BATIST, GThe flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action . **Cancer Letters** n.242 p.180–190. .2006.

HANSEN, M..B; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/ cell kill. **J Immunol Methods**, n.119 p.203-10. 1989

HERTOG, M.G.L.;HOLLMAN, P.C.H.;KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J Agric Food Chem** n.40 p.2379–2383. 1992

HONG, Y.K.; CHUNG,D.S.; JOE, Y.A.; YANG, Y.J.; KIM, K.M.; PARK, Y.;S.;YUNG,W.K.A.; KANG, J.K. Efficient Inhibition of In Vivo Human Malignant Glioma Growth and Angiogenesis by Interferon- β Treatment at Early Stage of Tumor Development. **Clinical Cancer Research**. v.6, p.3354-3360, 2000

Iguchi Y., Mano K., Goto Y., Nakano T., Nomura F., Shimokata T., Watanabe SI, Hashizume Y. Miliary brain metastases from adenocarcinoma of the lung: MR imaging findings with clinical and post-mortem histopathologic correlation. **Neuroradiology**., v.49 p.35–39. 2007.

JELLINGER, K.A. Challenges in neuronal apoptosis. Review. **Current Alzheimer research**. Sep;3(4):377-391. 2006.

KANTELHARDT, S.R.; CAARLS, W.; VRIES, A.H.B.; HAGEN, G.M.; JOVIN, T.M.; SCHAEFFER, W.S.; ROHDE, V.; GIESE, A.; JOVIN, D.J.A. Specific Visualization of Glioma Cells in Living Low-Grade Tumor Tissue. **Plos One**. v.5, n.5, 2010

- KIMA, H., KIMB, Y. S., KIMA, S. Y., SUKA, K. The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production **Neuroscience Letters** n. 309 p.67-71 2001
- KOBAYAKAWA, J.; SATO-NISHIMORI, F.; MARIYASU, M.; MATSUKAWA, YG2-M arrest and antimetabolic activity mediated by casticin, a flavonoid isolated from *Vitex Fructus* (*Vitex rotundifolia* Linne fil.) **Cancer Lett.** n.10 v.208 p.59-64. 2004.
- KUMAR, R.; KAMDAR D.; MADDEN, L. Th1/Th2 cytokine imbalance in meningioma, anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme patients. **Oncology Reports.** v.15, n. 6, p.1513–1516, 2006.
- LAKS, D.R; VISNYEI, K.; KORNBLUM, H.L.; Brain Tumor Stem Cells as Therapeutic Targets in Models of Glioma. **Yonsei Med J.** v.51, n.5, p.633-640. 2010.
- LI, W.X.; CUI, C.B.; CAI, B.; WANG, H.Y.; YAO, X.S. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells. **J Asian Nat Prod Res.** n.7 v.4 p.615-626. 2005
- MAK, P.; LEUNG, Y.K.; TANG, W.Y.; HARWOOD, C.; HO, S.M . Apigenin suppresses cancer cell growth through ERbeta. **Neoplasia** n.8 v.11 p.896-904. 2006
- MERZAK, A.; MCCREA, S.; KOOCHECKPOUR, S.; PILKINGTON, G.J. Control of human glioma cell growth, migration and invasion *in vitro* by transforming growth factor β . **Br. J. Cancer.** V.70, p.199-203, 1994
- NONES, J., STIPURSKY, J., COSTA, S. L., GOMES, F. C. A. Flavonoids and Astrocytes Crosstalking: Implications for Brain Development and Pathology **Neurochem Res** n. 35 p.955–966 2010
- PATRU C, ROMAO L, VARLET P, COULOMBEL L, RAPONI E, CADUSSEAU J, RENAULT- MIHARA F, THIRANT C, LEONARD N, BERHNEIM A. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioma-neuronal tumors. **BMC Cancer** v.10. p. 66 2010
- PAUGH, B. S.; BRYAN, L.; PAUGH, S.W. Interleukin-1 regulates the expression of sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 284, no. 6, p. 3408–3417, 2009.
- POPOVIĆ, M.; CABALLERO-BLEDA, M.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; The flavonoid apigenin delays forgetting of passive avoidance conditioning in rats. **J Psychopharmacol**; v.28, p.498–501. 2014.
- QIU, B.; ZHANG, D.; WANG, C. IL-10 and TGF- β 2 are overexpressed in tumor spheres cultured from human gliomas. **Molecular Biology Reports.** v. 38, n. 5, p. 3585–3591, 2011.

REARDON, D.A.; WEN,P.Y.; Therapeutic Advantages in the Treatment of Glioblastoma: Rationale and Potential Role of Targeted Agents. **Oncologist**. v.11, n.2, p.152-164. 2007.

ROY, M.K.; NAKAHARA, K.; NA, T.V.; TRAKOONTIVAKORN, G.; TAKENAKA, M.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic extract of *Oroxylum indicum* inhibits proliferation of a cancer cell line in vitro via induction of apoptosis. **Pharmazie** n.62 v.2 p.149-153. 2007.

RYU, J.; KU, B.M.; LEE, Y.K. Resveratrol reduces TNF- α - induced U373MG human glioma cell invasion through regulating NF- κ B activation and uPA/uPAR expression. **Anticancer Research**. v.31, n.12, p. 4223–4230, 2011.

SPOHR, T.C.; STIPURSKY, J.; SASAKI, A.C.; BARBOSA, P.R.; MARTINS, V.; BENJAMIM, C.F.; et al. Effects of the flavonoid casticin from Brazilian *Croton betulaster* in cerebral cortical progenitors in vitro: direct and indirect action through astrocytes. **J Neurosci Res**; v.88 p.530–541. 2010

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. , R.S. EL-BACHÁ , E.S. VELOZO , G.P. SAMPAIO , FREIRE, S.M., TARDY, M., COSTA, S.L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin **Food Chemistry** n.127 p. 404–411 2011

SCHECK, A. C.; PERRY,K.; HANK, N. C.; CLARK, W. D. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine** n.6 v.27 p.1-9. (2006).

SEO,Y. J.; KIM, B. S.; CHUN, S. Y.; PARKM, Y. K.; KANG, K. S.; KWON, T. G. Apoptotic Effects of Genistein, Biochanin-A and Apigenin on LNCaP and PC-3 Cells by p21 through Transcriptional Inhibition of Polo-like Kinase-1 **Urology** n.26 p.1489-1494

SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; SOUZA, C. S.; FREITAS, S. R. V.-B.; VASCONCELLOS, V.; FREIRE, S. M.; VELOZO, E. S.; TARDY, M.; EI-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; COSTA, S. L. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures **Cell Biol Toxicol** 2008

TATOR, C.H.; DAY, A.; NG, R.; LIBERMAN, L. Chemotherapy of an Experimental Glioma with Nitrosoureas. **Cancer Research**. v.37, p. 476-481, 1977.

UJIKI, M.B.; DING, X.Z.; SALABAT, M.R.; BENTREM, D.J.; GOLKAR, L.; MILAM, B., TALAMONTI M.S.; BELL, R.H. JR.; IWAMURA, T.; ADRIAN, T.E. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. **Molecular Cancer** n.29 v.5 p76. (2006).

VARGO, M.A.; VOSS, O.H.; POUSTKA, F.; CARDOUNEL, A.A.A.J.; GROTEWOLD, E.; DOSEFF, A.L. Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC delta and caspases in leukemia cell. **Biochem Pharmacol** n.14 v.72 p.681-692. 2006.

WANG, H.; LI, M.; RINEHART, J.J.; ZHANG, R. Pretreatment with Dexamethasone Increases Antitumor Activity of Carboplatin and Gemcitabine in Mice Bearing Human Cancer Xenografts: In Vivo Activity, Pharmacokinetics, and Clinical Implications for Cancer Chemotherapy. **Clinical Cancer Research**. v.10, p.1633-1644, 2004.

WANG, D.; HOU, L.; WU, Li.; YU, X. Synthesis and Anti-tumor Activities of Novel Oxazinyli Isoflavonoids **Chem. Pharm. Bull** n.60 p. 513–520 2012

WATJEN, W.; WEBER, N.; LOU, Y.-j. , WANG, Z.; CHOVOLOU, Y. KAMPKOTTER, A.; KAHL, R. PROKSCH, P. Prenylation enhances cytotoxicity of apigenin and liquiritigenin in rat H4IIE hepatoma and C6 glioma cells **Food and Chemical Toxicology** n.45 p.119-124 2007

XUE, N.; ZHOU, Q.; JI M.; JIN, JING.; LAI, FANG.; CHEN, JU.; ZHANG, M.; JIA, J.; YANG, H.; ZHANG, J.; LI, W.; JIANG, D.; CHEN, X. Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype. **Nature** v.7. 2017.

YEUNG, Y. T.; BRYCE, N.S.; ADAMS, S. p38 MAPK inhibitors attenuate pro-inflammatory cytokine production and the invasiveness of human U251 glioblastoma cells," **Journal of Neuro-Oncology**, v.109. n. 1, p.35–44, 2012.

YUNES, A. R.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C.. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitofármacos no Brasil. **Química nova** n.24 v.1 p.147-152 2001

ZHENG, P.W.; CHIANG, L.C.; LIN, C.C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. **Life Sci** n.76 v.12 p.1367-79. 2005

6. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo realizado com o flavonoide apigenina extraído da planta *Croton betulaster* Mull permitiu demonstrar a atividade antitumoral, imunomodulatória e morfogênica do flavonoide apigenina sobre as células de microglia, microglia/C6 e células de glioblastoma humano. Através desta pesquisa concluímos que este composto possui atividades biológicas essenciais para o controle da proliferação, indução de diferenciação e ativação imunológicas sobre as células de glioblastoma e microglia.

A análise dos resultados experimentais demonstra que a atividade biológica do flavonoide sobre essas células depende do tempo de exposição e das concentrações adotadas. O flavonoide apigenina mostrou ser capaz de reduzir a celularidade em todas as culturas celulares utilizadas, induzir apoptose e autofagia, inibir a proliferação celular, diminuir a migração celular, além de induzir mudanças morfológicas nas células como diferenciação.

Verificamos que o flavonoide também apresenta uma grande capacidade em reduzir o processo de formação tumoral de células de glioblastoma em ratos. Além de diminuir os parâmetros relacionados com a malignidade destas neoplasias nesses modelos em estudo.

Este composto natural mostrou alterar a produção de citocinas. Tendo em vista as citocinas estarem envolvidas na resposta imunológica e na interação entre as células do SNC, os flavonoides podem ser visto como um agente imunomodulador. Nesta pesquisa mostramos que a apigenina aumentou a secreção de citocinas do perfil inflamatório. Além disso, a apigenina alterou a função da microglia frente ao tumor, aumentando sua atividade de combate, função fagocítica e quimiotaxia.

Além dos marcadores utilizados nesta pesquisa, é necessário investigar outras citocinas e proteínas de sinalização da resposta imune, para assim melhor esclarecer o papel modulador deste flavonoide. Isto possibilitará intervenções

precisas em etapas intracelulares fundamentais para inibição do processo tumorigênico, que é favorecido principalmente pelo aumento da citocina IL-10.

Com base nos resultados aqui obtidos e de outros encontrados na literatura, o desenvolvimento deste estudo nos permite confirmar a hipótese de que o flavonoide apigenina é um promissor fármaco para ser utilizado em associação aos quimioterápicos atuais no tratamento dos gliomas. Futuramente, outras pesquisas, principalmente com abordagens moleculares poderão ser realizadas para desvendar os caminhos utilizados por estas moléculas no combate as neoplasias cerebrais.

Concluimos, enfim, que o flavonoide apigenina, extraído da *Croton betulaster* Mull é um flavonoide que possui propriedades biológicas inibitórias, morfogênicas e imunomodulatórias que podem ser exploradas para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra glioblastomas malignos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, F. A.; CARVALHO, L. R.; GRINBERG, L. T.; FARFEL, J. M.; FERRETTI, R. E.; LEITE, R. E.; JACOB FILHO, W. ; LENT, R. ; HERCULANO-HOUZEL, S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **J Comp Neurol.**, v. 513, p. 532-41, 2009.

ANDERSON, J. C.; MC FARLAND. B.C. AND GLADSON, C. L. New molecular targets in angiogenic vessels of glioblastoma tumours. **Expert Rev Mol Med.**, n.7, p.10-23, 2008.

ALOISI, F.; SERAFINIA,B.; ADORINI, L. Glia-T cell dialogue. **Journal of Neuroimmunology**, n.107 p.111–117, 2000.

ALOISI, F. Immune Function of Microglia. **Glia**, v.36. p165-179. 2001

BAILEY, S.L.; CARPENTIER, P.A.; MCMAHON, E.J.; BEGOLKA, W.S.;MILLER, S.D. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. **Crit. Rev. Immunol.** 26: 149–188. 2006.

BALBACH, A. **As plantas curam**. 1 edição. E, condens. Itaquaquecetuba, SP. Missionária. 1992

BANDYOPADHYAY, S.; LION, J.M.; MENTAVERRI, R.; RICUPERO, D.A.; KAMEL, S.; ROMERO, JR. Chattopadhyay N. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin. **Biochem Pharmacol.**n.14 p.184-197 2006

BANISSI, C.;GHIRINGHELLI, F.; CHEN, L.; CARPENTIER, A.F . T reg Depletion with a Low-dose Metronomic Temozolomide Regimen in a Rat Glioma Model. **Cancer Immunol Immunother.** v. 58 p. 1627-1634 2009

BARBOSA, P.R. Flavonoides, Sesquiterpenos e Triterpenos das Folhas de *Croton betulaster* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). Programa de pós graduação em química.Universidade Federal da Bahia. Dissertação (Mestrado). 1999.

BARBOSA, P.R.; FASCIO, M.; MARTINS, D.; GUEDES, M.L.S.; ROQUE, N.F. Triterpenes of *Croton betulaster* (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics And Ecology**, v.31 p.307-308. 2003.

BARTHELD, C.S; BAHNEY, J; HERCULANO-HOUSEL, S. The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain: A review of 150 years of cell counting. **Research in Systems Neuroscience**. 2016

- BECKER, K. Innate and adaptive immune responses in CNS disease. **Clin Neurosci Res**, 2006
- BENT, M. J.; HEGI, M. E.; STUPP, R.(2006). Recent developments in the use of chemotherapy in brain tumours **Review. European Journal of Cancer** v.42 p.582-588.
- BITTNER, M.; SILVA, M.; AQUEVEQUE, P.; KUFER, J.; JAKUPOVIC, J.; MURILLO, R. (1997).Alkaloids And Other Constituents From Croton Chilensis. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química** v.42 p.223-228. 1997
- BLOCK, G.; PATTERSON, B. AND SUBAR, A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. **Nutr Cancer** n18 p.1–29 1992
- BRAGANHOL, E.; ZAMIN, L.L.;CANEDO, A.D.;HORN, F.; TAMAJUSUKU, A.S.;WINK, M.R.; SALBEGO, C.; BATTASTINI, A.M. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. **Anticancer Drugs** v.17 n.6 p 663-671 2006
- BRUNETON, J.. **Elementos de Fitoquímica Y de Farmacognosia. Drogas com Derivados formados por la extension Del fenilpropano**. Editorial Acribia S/a. p.157-420 1995
- BRUSSELMANS,K.; VROLIX,R.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. Induction of Cancer Cell Apoptosis by Flavonoids Is Associated with Their Ability to Inhibit Fatty Acid Synthase **Activity** v.280 n.7 p.5636 -5645. 2005
- BUKHARI, I.A.;KHAN, R.A.;GILANI, A.U.; SHAH, A.J.;HUSSAIN, J.; AHMAD, V.U. The analgesic, anti-inflammatory and calcium antagonist potential of Tanacetum artemisioides. **Arch Pharm Res** v.30 n.3 p.303-312. 2007
- CAI, S.Q.;WANG, R.;YANG, X.;SHANG, M.;MA, C.; SHOYAMA, Y. Antiviral flavonoid-type C-glycosides from the flowers of Trollius chinensis. **Chem Biodivers.** v.3 n.3 p.343-348 2006
- CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A. & CAPASSO, F. Flavonóids old and new aspects of a class of natural therapeutics drugs. **Life Sci** V.65 N.4 P.337-353 1999
- CHAMBAUT-GUERINN, A.M.; COSTA, S.L.; LEFRANÇOIS, T.; FAGES, C.; GAUTHEREAU, X.; TARDY, M. Effects of retinoic acid and tumour necrosis factor alfa on GL-15 glioblastoma cells. **Neuroreport** v.2 p.389-393.2000
- CHARLES, N. A., HOLLAND, E. C., GILBERTSON, R., GLASS. R., and KETTENMANN, H. The Brain Tumor Microenvironment. **Glia** n.59 p.1169-1180. 2011
- CHAUDHRY.I. H.; O'DONOVAN, D. G.; BRENCHLEY,P. E. C.; REID, H.; D ROBERTS.I. S. Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. **Histopathology** v.39 p.409-415. 2001.

CHENG, J.; RAJESH, A.; JUNXUAN, L. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v.276 p.371–378 2000.

COSTA, S.L.; PAILLAUD, E.; FAGES, C.; ROCHETTE-EGLY, C.; JOUAULT, H.; PERZELOVA, A.; TARDY, M. Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. **Eu. J Cancer** v.37 p.520-530. 2001

COTRAN,R.S.; KUMAR,V.; COLLINS,T. **Patologia Estrutural e Funcional Robbis**. 6ª edição. Guanabara Koogan. 233-1201 2000

CRAGG, G. M.; SCHEPARTZ, S. A.; SUFFNEZ, M.; GREVER, M. R.The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the lager- scale production of novel natural product anticancer and anti – HIV agents. **J. Nat Prod** v.56 p.1657-1668. 1993

DE CLERCQ, E.. Current Lead Natural Products For The Chemotherapy Of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. **Medicinal Research Reviews** v.20 p.323-349.2000

DAS, A., BANIK, N. L., RAY, S. K. Flavonoids Activated Caspases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells But Not in Human Normal Astrocytes **Cancer** v.1 n.116 p.164–176 2010

DEFFER, G.L.; ADLE-BIASSETTE, H.; RICOLFI, F.; MARTIN, L.; AUTHIER, F.J.; CHOMIENEN, C.; DEGOS, L.; DEGOS, J.D.. All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. **J Neur Oncol** v.34 p.169-177. 1997

DOK-GO, H; LEE, K.H.; KIM, H. J.; LEE, E. H.; LEE, J.; SONG, Y. S.; LEE, YONG-HÁ.; JIN,C.; LEE, Y.S.; CHO, J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (1)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Brain Research** n.965 p.130–136 2003

FARINA, C.; ALOISI, F. AND MEINL, E.. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **TRENDS in Immunology** .28 n.3 p.138-145 2007

FÉLIX, F.H.C; **Modelo de implante de tumor de Walker no cérebro de ratos**. UFCE, Fortaleza, 2001, 152 folhas. Dissertação de mestrado. UFCE, Fortaleza.

FERGUSON, P.J.; KUROWSKA, E.M.; FREEMAN, D.J.; CHAMBERS, A.F.; KOROPATNICK, J. In vivo inhibition of growth of human tumor lines by flavonoid fractions from cranberry extract .**Nutr Cancer** n.56 p.86-94.2006

FÓRMICA, J.V.; REGELSON, W Review Of The Biology Of Quercetin And Related Bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology** v.33 p.1061–1080.1995

FREITAS, S.; COSTA, S.; AZEVEDO, C.; CARVALHO, G.; FREIRE S.; BARBOSA, P.; VELOZO, E.; SCHAER, R.; TARDY, M.; MEYER, R.; NASCIMENTO, I. Flavonoids Inhibit Angiogenic Cytokine Production by Human Glioma Cells **Phytother. Res.** 2010

FRIEDMAN, H.S.; KERBY, T. AND CALVERT HI..Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. **Minireview** v.6 p.2585–2597. 2000

FRIEDMAN M.. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Mol Nutr Food Res** v.51 n.1 p.116-134 .2007

FUENTES, E.G.U.; EXPOSITO, F.N.; VILLAVERDE, M.; SOTO, A.M.; Tumores del sistema nervioso central. **Medicine.** v.10, n.25, p. 1672-1786, 2009.

GIULIETTI, A.M.; QUEIROZ,L.P. **Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica.** Instituto do milênio do semi-árido. Ministério da ciência e tecnologia.(IV).2006

GIULIAN, D.; LI, J.; LI, X.; GEORGE, J.; RUTECKI, P.A. The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. **Dev Neurosci.**v.16 p.128-36. . 1994

GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J Microglia: biology and pathology **Acta Neuropathol** n. 119. P. 89-105 2010

GUPTA, R.; SINGH, M.; SHARMA, A.Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. **Pharmacological Research** v.48 p.209–215 2003

HAIDARA, K.; ZAMIR, L.; SHI, QUI-WEN.; BATIST, G. The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action . **Cancer Letters** v.242 p.180–190. 2006.

HAMBARDZUMYAN, D.; GUTMANN, D.; KETTENMANN, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. **Nature Neuroscience** v.19 n.1 p.20-27. 2015

HART, M.G.; GRANT, R.; GARSIDE, R.; ROGERS, G.; SOMERVILLE, M.; STEIN, K. Temozolomide for high grade glioma. **Cochrane Database Syst Rev.** v.8 n.4 2008

HAVSTEEN, B.H. Biochemical and medical significance of flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics** v.96 p.67-202. 2002.

HE, F.; SUN, Y.E. Cells in focus: Glial cells more than support cells?.**The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p. 661–665,2007.

HERCULANO-HOUZEL, S.; MOTA, B.; LENT, R. Cellular scaling rules for rodent brains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.**, v. 103 n.32 p. 12138-43, 2006

HERCULANO-HOUZEL, S.; COLLINS, C. E.; WONG, P.; KAAS, J. H.; LENT, R. The basic nonuniformity of the cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 10. n.34, p. 12593-8, 2008.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J Agric Food Chem** n.40 p.2379–2383 1992

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMBOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutr. Câncer** v.20 p.21-29. 1993

HILDEBRAND, J.; DEWITTE, O.; DIETRICH, P.Y.; TRIBOLET, N. Management of malignant brain tumours. *Eur. Neurol* v.38 p.238-253.1997.

HOSTETTMAN, K.; MARSTON, A.J.; WOLFENDER, L.; MAILLARD, M. (1995). Screening for Flavonoids and Related Compounds in Sequential Isolation of Bioactive Compounds. **Akademiai, Kiado: Budapest**. p. 35-52.1995

HUSSAIN, F., YANG, D., SUKI, D., GRIMM, E., HEIMBERGER, A. B. Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients **Journal of Translational Medicine** n.4 p.15 2006

HWANG, S.H.; YOO, B.C.; JUNG, J.S.; OH, E.S.; HWANG, J.; SHIN, J.A.; KIM, S. CHA, S.; HAN, I.O. Induction of glioma apoptosis by microglia-secreted molecules: the role of nitric oxide and cathepsin B. **Biochim Biophys Acta** 2009

IELPOA M.T.L.; BASILEB,A.; MIRANDAA, R.; MOSCATIELLOA,V.; NAPPOA,C.; SORBOA,S.; LAGHIA, E.; RICCIARDIA, M.M.; RICCIARDIA, L.; VUOTTOA, M.L. Immunopharmacological properties of Flavonoids. **Fitoterapia** v.71. 2000

JAMSHIDI, J.; YOSHIMINE, T.; USHIO, Y.; HAYAKAWA, T. Effects of glucocorticoid and chemotherapy on the peritumoral edema and astrocytic reaction in experimental brain tumor. **J. Neurooncol.** v. 12, n. 3, p. 197-204, 1992.

JANEWAY, JR.C.A.; TRAVERS,P.; WALPORT,M.; SHLOMCHIK,M.J.. **Imunobiologia. O sistema immune na saúde e na doença.** Artmed (6). 2007

JANSEN,M.; HAMER,P.C.W.; WITNER,A.N.; TROOST,D.; NOORDEN,C.J.F. Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas. **Brain research Reviews** v.45 p.143-163 2004.

JING,F.; QIONG, Z.; LING-ZHI, L.; CHANG, XI.; XIAOWEN, H.; XIANGLIN, S.; BING-HUA, J. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1^α and VEGF expression. **Carcinogenesis** v.28 n.4 p.858–864.2007

KHAN, T.H.; SULTANA, S. Apigenin induces apoptosis in Hep G2 cells: possible role of TNF-α and IFN-γ. **Toxicology.** v.16 p.206-212 2006.

KEIME-GUIBERT, F.; CHINOT, O.; TAILLANDIER, L.; CARTALAT-CAREL, S.; FRENAY, M.; KANTOR, G.; GUILLAMO, J.S.; JADAUD, E.; COLIN, P.; BONDIAU, P.Y.; MENEI, P.; LOISEAU, H.; BERNIER, V.; HONNORAT, J.; BARRIE, M; MOKHTARI, K.; MAZERON, J.J.; BISSER,Y. A.; DELATTRE, J.Y. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. **N Engl J Med** v.356 n.15 p.1527-1535 2007.

- KANDU, T.; BHATTACHARYA, R.K.; SIDDIGI, M.; ROY, M. Correlation of apoptosis with comet formation induced by tea polyphenols in human leukemia cells. **J. Environ Pathol Toxicol Oncol.** v.24 n.2 p.115-128.2005
- KARGIOTIS, O.; RAO, J.S.; KYRITSIS.A.P.Mechanisms of angiogenesis in gliomas. **Journal of Neuro-Oncology** v.78 p.281–293.2006
- KIM, J.H.; KIM, J.H.; PARK ,J.A. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. **J Biochem Mol Biol** n.39 p.339–345 2006
- KOBAYAKAWA, J.; SATO-NISHIMORI, F.; MARIYASU, M.; MATSUKAWA, Y.G2-M arrest and antimetabolic activity mediated by casticin, a flavonoid isolated from *Vitex Fructus* (*Vitex rotundifolia* Linne fil.) **Cancer Lett.** n.10 p.59-64 2004
- KOSTIANOVSKY, A. M.; MAIER, L. M.; ANDERSON, R. C.;BRUCE, J. N., ANDERSON D. E. Astrocytic Regulation of Human Monocytic/Microglial Activation **The Journal of Immunology** n.181 p.5425-5432 2008
- KRIEGSTEIN, A.; GÖTZ M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. **Glia**, v.43, p.37-43, 2003
- KUETE V.; SIMO, I. K.; NGAMENI,B.; BIGOGA, J. D. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and four flavonoids from the twigs of *Dorstenia angusticornis* Engl. (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology** .v.1 2007
- LAKS, D.R; VISNYEI, K.; KORNBLUM, H.L.; Brain Tumor Stem Cells as Therapeutic Targets in Models of Glioma. **Yonsei Med J.** v.51, n.5, p.633-640. 2010.
- LEHNARDT, S. Innate Immunity and Neuroinflammation in the CNS: The Role of Microglia in Toll-Like Receptor-Mediated Neuronal Injury. **GLIA** n.58, p. 253–263 2010
- LENCINA, C.; PIRES, V.S.; GOSMANN, G.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P. Tilirosídeo em *Croton Gnaphalii* *Ball.* **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.11 p.89-93 2001
- LENT, R.. **Cem bilhões de neurônios conceitos fundamentais de neurociências.** Atheneu. 2004
- LI, W.X.; CUI, C.B.; CAI, B.; WANG, H.Y.; YAO, X.S_.Flavonoids from *Vitex trifolia* L. inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells. **J Asian Nat Prod Res;** v.7 n.4 p.615-626. 2005
- LOPES ,R.M; OLIVEIRA,T.T; NAGEM,T.J; PINTO,A.S.Flavonóides. Farmacologia de Flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais .**Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasil.**p.18-22. 2003
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no brasil:nativas exóticas cultivadas.** Nova odessa,SP. Instituto plantarium.v. 544.2002

LOUIS, D. N.; · PERRY, A; · REIFENBERGER, G.; DEIMLING, A. VON.; FIGARELLA-BRANGER, D.; · CAVENEE, W. K.; · OHGAKI, H.; · WIESTLER, O, D.; · KLEIHUES, P.; · ELLISON, D. W. . The 2016 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol.** n.831, p. 803-820-. 2016

LOWENSTEIN, C.J and SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell** n.70 p.705–707. 1992

LUCAS, SIAN-MARIE.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON,R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. British **Journal of Pharmacology** (147): p.232 -240. 2006.

MAK, P.; LEUNG, Y.K.; TANG, W.Y.; HARWOOD, C.; HO, S.M Apigenin suppresses cancer cell growth through ERbeta. *Neoplasia* v.8 n.11 p.896-904 2006.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUNON, M.J. Flavonoids: Properties And Anti-Oxidizing Action. **Nutrición Hospitalaria** v.17 p.271-278. 2002

MIDDLETON, E.J.R., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer **PHARMACOLOGICAL REVIEWS** v. 52, n. 4. p 673–751.2000

MINGHETTI, L. AND LEVI, G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. **Review Prog Neurobiol.** n.54 n.1 p.99-125.1998

MOLLER, M.; SUSCHKE, U.; NOLKEMPER, S.; SCHNEELE, J.; DISTL, M.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M .Antibacterial, antiviral, antiproliferative and apoptosis-inducing properties of *Brackenridgea zanguebarica* (Ochnaceae). **J Pharm Pharmacol.** p.58 n.8 p.1131-1138.2006

MOREST, D.K.; 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**, v.43, p.6-18, 2003

MORREALE, V.M.; HERMAN, B.H.; DER-MINASSIAN, V.; PALKOVITS, M.; KLUBES, P.; PERRY, D., CSIFFARY, A., LEE, A.P. A brain-tumor model utilizing stereotatic implantation of a permanent cannula. **J. Neurosurg.** v. 78, n. 6, p. 959-965, 1993.

NAKADA, M.; NAKADA, S.; DEMUTH, T.; TRAN, N. L.; HOELZINGER, D. B.; BERENS , M. E.. Molecular targets of glioma invasion Review. **Cell. Mol. Life Sci.** n.4 p.458 – 478. 2007

NAKAGAWA, Y and CHIBA, K. Role of Microglial M1/M2 Polarization in Relapse and Remission of Psychiatric Disorders and Disease. **Pharmaceuticals.** n7.v12 p.1028-1048. 2014

- NONES, J., STIPURSKY, J., COSTA, S. L., GOMES, F. C. A. Flavonoids and Astrocytes Crosstalking: Implications for Brain Development and Pathology **Neurochem Res** n. 35 p.955–966 2010
- NOONAN, D.M.; BENELLI, R.A.; LBINI, A. Angiogenesis and cancer prevention: a vision . **Recent Results Cancer Res** n.174 p.219-224. 2007
- OZCELIK, B.; ORHAN, I.; TOKER, G. Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. **Z Naturforsch** v.61 p 632-638. 2006
- OZEKI, T.; HASHIZAWA, K.; KANEKO, D.; IMAI, Y.; OKADA, HIROAKI. Treatment of Rat Brain Tumors Using Sustained-Release of Camptothecin from Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres in a Thermoreversible Hydrogel. **Chem. Pharm. Bull**, v.58, n.9, p. 1142-1147, 2010.
- PALMEIRA JÚNIOR, S.F..Contribuição Ao Conhecimento Quimiotaxonômico Da Família Euphorbiaceae.Estudo Químico De Duas Espécies Do Gênero Cróton (C. Sellowii Baill. E C. Brasiliensis Muell. Arg.). Maceió, 317p. Tese De Doutorado – Programa De Pós-Graduação Em Química E Biotecnologia, Universidade Federal De Alagoas.2005
- PANTEV, A.; IVANCHEVA, S.; STANEVA, L.; SERKEDJIEVA, J. (2006). Biologically active constituents of a polyphenol extract from *Geranium sanguineum* L. with anti-influenza activity. **Z Naturforsch** v.61 p.508-16 2006
- PELVIG,D.P.; PAKKENBERG,H.; STARK,A.K.; ANDPAKKENBERG,B. Neocortical glial cell numbers in human brains. **Neurobiol.Aging** v.29 p.1754–1762. 2008 .
- PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; VAN POEL, B.; VINGERHOETS, R.; TOTTE, J.; VAN DEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A In Vivo Wound Healing Activity Of Dragon's Blood (*Croton*spp.), A Traditional South American Drug, And Its Constituents. **Phytomedicine** n.2 p-17-22 . 1995.
- PINTO, J.; B.P.; SANTIAGO,E.A.; LAMEIRA,O.A.. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras. UFLA/FAEPE. 208p. 2000
- RANSOHOFF, R.M.; TANI, M.; GLABINSKI, A.R.; CHERNOSKY, A.; KRIVACIC, K.; PETERSON, J.W.; CHIEN, H.F.; TRAPP, B.D .Chemokines and chemokine receptors in model neurological pathologies: molecular and immunocytochemical approaches. **Methods Enzymol.**;n.287 p.319-48.1997
- RAVEN,P.H; EVERT,R.F; EICHHORN,S.E..**Biologia Vegetal. 6ª edição**. Guanabara koogan p.534-537.2001
- RICHTER, M.; EBERMANN, R.; MARIAN, B. .Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumour cells: Possible role of EGF receptor signalling. **Nutrition and Cancer-An International Journal** n.34 p.88-99. 1999
- ROY, M.K.; NAKAHARA, K.; NA, T.V.; TRAKOONTIVAKORN, G.; TAKENAKA, M.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic

extract of *Oroxylum indicum* inhibits proliferation of a cancer cell line in vitro via induction of apoptosis. **Pharmazie** n.62 v.2 p.149-153. 2007.

RUTTKA, J.T. AND SMITH, S.L. Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acid protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. **Cancer Res** n.55 p. 3624-3631. 1993

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of croton species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc** n.18 v.1 p.11-33. (2007).

SANTOS, P.M.L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R.M.. Flavonóides O-Glicosilados De *Croton Campestris* St.Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.15 p.321-325. 2005

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. , R.S. EL-BACHÁ , E.S. VELOZO , G.P. SAMPAIO , FREIRE, S.M., TARDY, M., COSTA, S.L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin **Food Chemistry** n.127 p. 404–411 2011

SCHECK, A. C.; PERRY, K.; HANK, N. C.; CLARK, W. D. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine** n.6 v.27 p.1-9. 2006.

SCHMITT-SCHILLIG, S.; SCHAFFER, S.; WEBER, C.C.; ECKERT, G.P.; MULLER, W.E. Flavonoids And The Aging Brain. **Journal of Physiology and Pharmacology** n.56 p.23-36. 2005.

SCHWARTZBAUM, J.A.; FISHER, J.L.; ALDAPE, K.D.; WRENSCH, M. Epidemiology and molecular pathology of gliomas. **Nature**. V.2, p.494-501, 2006.

SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; SOUZA, C. S.; FREITAS, S. R. V.-B.; VASCONCELLOS, V.; FREIRE, S. M.; VELOZO, E. S.; TARDY, M.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; COSTA, S. L. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF- α and NO release in primary glial cell cultures **Cell Biol Toxicol** 2008

SILVA, M. C. ; CARVALHO, J. C. T. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Plantas Medicinais**: In: J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. Anti-inflamatórios. Ribeirão Preto, SP, Tecmed, 480 2004.

SILVA, Penildo. **Farmacologia** 8 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara. P.148. 2010

SOFFIETTI, R.; RUDA, R.; TREVISAN, E.. New chemotherapy options for the treatment of malignant Gliomas. **Anticancer Drugs Review** n.18 v.6 p.621-32. 2007

SOLIMAN, K.F., MAZZIO, E.A. *In vitro* attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. **Proc Exp Biol Med** n.218 p. 390–397 1998

STANNARD, B.L. **Flora Of The Pico Das Almas**. Great Britain: Royal Botanic Gardens. p.853.1995

SZELÉNYI, J. Cytokines and the central nervous system. **Brain Research Bulletin** n.54 v.4 p.329–338. 2001

TAN, W.F.; LIN, L.P.; LI, M.H.; ZHANG, Y.X.; TONG, Y.G.; XIAO, D.; DING, J. Quercetin, A Dietary-Derived Flavonoid, Possesses Antiangiogenic Potential. **European Journal of Pharmacology** n.459 p.255-262. 2003

TARDY, M. Astrocyte et homeostasie. **Médecine Science** n.8v.7 p.799-804.1991

TARDY, M. Role Of Laminin Bioavailability In The Astroglial Permissivity For Neuritic Outgrowth. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências* n.74 v.4 p 683-690. 2002.

TUNICI, P.; IRVIN, D.; LIU, G.; YUAN, X.; ZHAOHUI, Z.; NG, H.; YU, J.S..Brain tumor stem cells: new targets for clinical treatments? **Neurosurg Focus. Review**.n.15p.20-27. 2006.

TOSONI,A.; FRANCESCHI, E.; POGGI, R.; BRANDES, A. A. Relapsed Glioblastoma: Treatment Strategies for Inicial and Subsequent Recorrences. **Current Treatment Options in Oncology**, 2016

UJIKI, M.B.; DING, X.Z.; SALABAT, M.R.; BENTREM, D.J.; GOLKAR, L.; MILAM, B., TALAMONTI M.S.; BELL, R.H. JR.; IWAMURA, T.; ADRIAN, T.E. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. **Molecular Cancer** n.29 v.5 p76. 2006.

VANDENBERG, S.R.,. Current diagnostic concepts of astrocytic tumors. **J Neuropathol Exp Neurol**. n.51, p. 644-57. 1992

VAN DER WATT, E. PRETORIUS, J.C.Purification And Identification Of Active Antibacterial Components In *Corpobrotus Edulid* L. **Journal Of Ethnopharmacology** n.76p.87-91. .2001

VANDIER, D.; RIXE, O.; BRENNER, M.; GOYETTE, A.; BESNARD, F. Selective killing of glioma cell lines using na astrocyte-specific expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene. **Cancer Res** n.58p.4577-4580.1998

VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. *Cells in focus* .The International **Journal of Biochemistry & Cell Biology** n.37p.17–21. 2005

- XIAO, D.; TAN, W.; LI, M.; DING, J.. Antiangiogenic potential of 10-hydroxycamptothecin. **Life Sci.** n.69p.1619-1628. 2001
- WILSON, C.B.; NORREL, H. JR, BARKER, M. Intrathecal injection of methotrexate (NSC-470) in transplanted brain tumors. **Cancer Chemother. Rep.** v.51, p. 1-6, 1967.
- WOOD, J.E.; MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; PERRY, N.B.; WALKER, J.R.L.; WARD, J.M. Biologically Active Compounds From *Ozothammus Leptophyllus*. New Zeland Journal Of Botany n.37p.167-174. 1999.
- YE, C.L.; LIU, Y.; WEI, D.Z. Antioxidant and anticancer activity of 3'-formyl-4', 6'-dihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone and (2S)-8-formyl-5-hydroxy-7-methoxy-6-methylflavanone. **J Pharm Pharmacol** n.59 v.4 p.553-559. 2007.
- YOKOYAMA,S.;HIRANO,Hi.;WAKIMARU,N.;SARKER,K.P.;KURATSU,J. Inhibitory effect of epigallocatechin-gallate on brain tumor cell lines in vitro **Neuro-Oncology** 2001
- YUNES, A. R.; PEDROSA, R.C.; FILHO,V.C.. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitofármacos no Brasil. **Química nova** n.24 v.1 p.147-152 2001
- ZHANG, Y.;VAREED, S.K.; NAIR, M.G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sci** n.76v.13p.1465-72. 2005.

8. ANEXO

8.1 Produção científica durante o doutorado

1. **COELHO, PAULO L.C.**; OLIVEIRA, MONA N.; DA SILVA, ALESSANDRA B.; PITANGA, BRUNO P.S.; SILVA, VICTOR D.A.; FARIA, GISELLE P.; SAMPAIO, GERALDO P.; COSTA, MARIA DE FATIMA D.; BRAGA-DE-SOUZA, SUZANA; COSTA, SILVIA L. The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells. **Anti-Cancer Drugs** , v.XX, p.1 - , 2016.

2. EL-HABR, ELIAS A.; DUBOIS, LUIZ G.; BUREL-VANDENBOS, FANNY; BOGEAS, ALEXANDRA; LIPECKA, JOANNA; TURCHI, LAURENT; LEJEUNE, FRANÇOIS-XAVIER; **COELHO, PAULO LUCAS CERQUEIRA**; YAMAKI, TOMOHIRO; WITTMANN, BRYAN M.; FAREH, MOHAMED; MAHFOUDHI, EMNA; JANIN, MAXIME; NARAYANAN, ASHWIN; MORVAN-DUBOIS, GHISLAINE; SCHMITT, CHARLOTTE; VERREAULT, MAITÉ; OLIVER, LISA; SHARIF, ARIANE; PALLUD, JOHAN; DEVAUX, BERTRAND; PUGET, STÉPHANIE; KORKOLOPOULOU, PENELOPE; VARLET, PASCALE; OTTOLENGHI, CHRIS; PLO, ISABELLE; MOURA-NETO, VIVALDO; VIROLLE, THIERRY; CHNEIWEISS, HERVÉ; JUNIER, MARIE-PIERRE A driver role for GABA metabolism in controlling stem and proliferative cell state through GHB production in glioma. **Acta Neuropathologica**., v.000,

3. ASSAD KAHN, S.; COSTA, S. L.; GHOLAMIN, S.; NITTA, R. T.; DUBOIS, L. G.; FEVE, M.; ZENIOU, M.; **COELHO, P. L. C.**; EL-HABR, E.; CADUSSEAU, J.; VARLET, P.; MITRA, S. S.; DEVAUX, B.; KILHOFFER, M.-C.; CHESHER, S. H.; MOURA-NETO, V.; HAIECH, J.; JUNIER, M.-P.; CHNEIWEISS, H. The anti-hypertensive drug prazosin inhibits glioblastoma growth via the PKC - dependent inhibition of the AKT pathway. **EMBO Molecular Medicine** . , v.XXX, p.XXX - , 2016.

4. **COELHO, PAULO LUCAS CERQUEIRA**; DE FREITAS, SANDRA REGINA VILLAS-BOAS; PITANGA, BRUNO PENAS SEARA; DA SILVA, VICTOR DIÓGENES AMARAL; OLIVEIRA, MONA NEVES; GRANGEIRO, MARIA SOCORRO; SOUZA, CLEIDE DOS SANTOS; EL-BACHÁ, RAMON DOS SANTOS; DE FÁTIMA DIAS COSTA, MARIA; BARBOSA, PEDRO ROCHA; DE OLIVEIRA NASCIMENTO, IVANA LUCIA; COSTA, SILVIA LIMA
Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.1, p.XXXXX - , 2015.

5. SANTOS, BALBINO L.; OLIVEIRA, MONA N.; **COELHO, PAULO.L.C.**; PITANGA, BRUNO.P. S.; DA SILVA, ALESSANDRA B.; ADELITA, T.; SILVA, VICTOR DIÓGENES A.; COSTA, MARIA DE F.D.; EL-BACHÁ, RAMON S.; TARDY, MARCIENNE; CHNEIWEISS, HERVÉ; JUNIER, MARIE-PIERRE; MOURA-NETO, VIVALDO; COSTA, SILVIA L.
Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. **Chemico-Biological Interactions**, v.242, 2015.

6. SILVA, VICTOR DIOGENES AMARAL; PITANGA, BRUNO PENAS SEARA; NASCIMENTO, RAVENA PREREIRA; SOUZA, CLEIDE SANTOS; **COELHO, PAULO LUCAS CERQUEIRA**; MENEZES FILHO, NOELIO; SILVA, ANDRÉ MÁRIO MENDES; COSTA, MARIA DE FÁTIMA DIAS; EL-BACHÁ, RAMON DOS SANTOS; VELOZO, EUDES DA SILVA; COSTA, SILVIA LIMA
Juliprosopine and juliprosine from Prosopis juliflora leaves induce mitochondrial damage and cytoplasmic vacuolation on co-cultured glial cells and neurons.. **Chemical Research in Toxicology**. , v.1, p.130807123720003 - , 2013.

8.2 Premiações durante o doutorado

- | | |
|-------------|--|
| 2016 | Melhor pôster do ano, IV Simpósio Latino-Americano de Neuroquímica e VII Simpósio de Atualização em Farmacologia |
| 2014 | SBBQ Award melhor poster, XLII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology |
| 2013 | Menção honrosa no prêmio Marcionílio Lins, XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular |