



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

PAULO LUCAS CERQUEIRA COELHO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL E
IMUNOMODULATÓRIA DO FLAVONOIDE APIGENINA,
EXTRAÍDO DE *CROTON BETULASTER MULL*, EM
CÉLULAS DE GLIOMA**

Salvador, BA
2013

1.0 INTRODUÇÃO

Gliomas são os tumores intracraniais que atingem as células gliais com maior frequência e representam mais de 50% de todas as neoplasias do Sistema Nervoso Central. Segundo a Organização Mundial de Saúde estes tumores são classificados de acordo com seu grau de malignidade, sendo o glioblastoma de grau IV o mais agressivo (ANDERSON et al., 2008). O prognóstico é reservado e raramente o paciente sobrevive mais de 18 (dezoito) meses após o diagnóstico (COTRAN et al., 2000; NAKADA et al. 2007; ANDERSON et al., 2008).

Os tratamentos aplicados aos glioblastomas são multidisciplinares, consistindo em quimioterapia, cirurgia e radioterapia, nos quais a sobrevida dos pacientes aumenta em alguns meses. A eficácia terapêutica é 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 convencional e diminuir os intensos efeitos colaterais (DEFER et al., 1997; VANDIER et al., 1998; CHAMOU-GUERIN et al., 2000; COSTA et al., 2001; JANSEN et al., 2004; TUNICI et al., 2006; SOFFIETTI et al., 2007).

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, principalmente uma atividade antitumoral, especialmente contra células de câncer de mama, pulmão, próstata, fígado e glioblastoma (CHENG et al., 2000; HAIDARA et al., 2006; ROY et al., 2007; YE et al., 2007; SANTOS et al., 2011). Pesquisa realizada por Freitas e colaboradores (FREITAS, 2009; FREITAS et al., 2010) destaca a atividade do flavonoide apigenina inibindo o crescimento e a regulação de fatores pró-angiogênicos em células de glioblastoma humano da linhagem GL-15.

Neste contexto, este estudo investigou *in vitro* a atividade do flavonoide apigenina, extraído da planta *Croton betulaster*, sobre células da linhagem de glioma murino C6 e

durante sua interação com as células microgliais. Investigamos seus efeitos na inibição do crescimento, diferenciação celular, regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias e vias de sinalização, na busca de novas drogas terapêuticas que atuem mais eficazmente contra os gliomas malignos.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS FUNCIONAIS DE CÉLULAS DO SNC

O Sistema Nervoso Central (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 eletricidade. Sua morfologia está adaptada para recepção, transmissão e geração de sinais nervosos (LENT, 2004). Estas células se diferenciam das células gliais por processos polarizados chamados de axônios e dendritos, os quais podem propagar potenciais de ação, fazer junções sinápticas com outros neurônios e células nervosas, além de liberar neurotransmissores (MOREST & SILVER, 2003).

Em contraste aos numerosos estudos sobre as funções neuronais no sistema nervoso, existe ainda um pouco conhecimento sobre as células gliais (HE F & SUN Y E., 2007). No encéfalo, a proporção geral entre neurônios e células não-neuronais chega a 1:1 (HERCULANO-HOUZEL et al., 2006, 2008; AZEVEDO et al., 2009). 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 (HERCULANO-HOUZEL et al., 2006, 2008; AZEVEDO et al., 2009). 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 (HERCULANO-HOUZEL et al., 2006, 2008; AZEVEDO et al., 2009).

As células gliais constituem unidades de sustentação, revestimento, defesa e modulação da atividade neuronal, sendo formado pelos astrócitos, microglia, oligodendrócitos e células endoteliais. Além disso, removem os neurotransmissores em excesso liberados pelos neurônios durante a transmissão sináptica e mantêm o balanço da força iônica do ambiente neuronal (FEI HE & YI E SUN, 2007).

Os astrócitos constituem cerca da metade de toda a população glial. 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, controle das concentrações de íons no meio extracelular e armazenamento de glicogênio; participam do mecanismo de cicatrização, detoxicação cerebral e defesa imune do tecido nervoso (TARDY, 1991; KRIEGSTEIN & GÖTZ, 2003).

Microglia são células pequenas, alongadas e desempenham funções semelhantes aos macrófagos no SNC, atuando como elementos fagocíticos, aumentando sua população nos casos de dano e inflamação, além de facilitar a sobrevivência dos neurônios pela secreção de substâncias neurotróficas ou através da ativação de astrócitos (GIULIAN et al., 1994). Os oligodendrócitos apresentam prolongamentos celulares fundamentais para a formação da bainha de mielina, garantindo a rápida e eficiente condução do impulso nervoso. As células ependimárias são remanescentes do epitélio embrionário e revestem as paredes dos ventrículos cerebrais, aqueduto e canal central da medula vertebral, promovendo junto aos plexos coroideos a formação do líquido cefalorraquidiano (LENT, 2004).

O tecido nervoso é protegido ainda pela barreira hematoencefálica (BHE), uma estrutura membranosa altamente seletiva, formada basicamente pelo endotélio dos vasos sanguíneos com junções altamente fechadas e astrócitos. Este componente físico é fundamental na regulação de macromoléculas e moléculas polares que circulam na corrente sanguínea para o encéfalo, mantendo o parênquima cerebral isolado da circulação sanguínea e permitindo um ambiente químico protegido e constante para o perfeito funcionamento do SNC (SCHMITT-SCHILLIG et al., 2005; KIM et al., 2006).

2.2 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 neurológicas agudas e crônicas como: a síndrome de Fisher, esclerose múltipla, doença de Huntington entre outras (BECKER, 2006; GRAEBER & STREIT, 2010).

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 perfeito funcionamento. A imunidade inata neste sistema é exercida primeiramente pelos astrócitos e microglia (HUSSAIN et al., 2006). 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 eliminação dos patógenos (BAILEY et al., 2006; BECKER, 2006).

Segundo Lucas et al. (2006), as células da glia respondem a diversos distúrbios, tais como: lesões traumáticas, 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).

Os astrócitos apresentam a capacidade de modificar a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, 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 citocinas como: IL-1, IL-3, IL-5, IL-6 e IL-8, secretam ainda TNF, TGF- β , INF- γ , GM-CSF, M-CSF, e os mediadores PGE₂, MCP-1 e IP-10 todas de fundamental importância para regulação de células promotoras da resposta imune (SZELÉNYI, 2001).

As microglias são as células do sistema imune residentes no SNC. Elas são 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 Szelényi (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, 2000). Sua quantidade varia ao longo do SNC e os astrócitos apresentam um grande papel na ativação destas células (RANSOHOFF, 1997; MINGHETTI & LEVI 1998; VILHARDT, 2005).

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

A presença no sistema nervoso central de citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias são consequências 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).

2.3 FISIOPATOLOGIA DE TUMORES CEREBRAIS MALIGNOS: O GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Gliomas são os tumores malignos intracraniais mais frequentes e representam mais de 50% de todas as neoplasias do SNC. De acordo com o tipo celular em que ocorrem, os gliomas são classificados em astrocitomas, oligodendrogliomas, tumores mistos e os ependimomas (FUENTES, 2009). Os astrocitomas malignos são classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de acordo com o seu grau de malignidade, sendo o grau IV o mais agressivo, onde se inserem os glioblastomas multiformes (HILDEBRAND et al., 1997).

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

O glioblastoma multiforme humano (Grau IV) é o mais agressivo tumor maligno que ocorre no SNC (figura 1). 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., 2007). 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 recidivantes (LAKS et al., 2010).

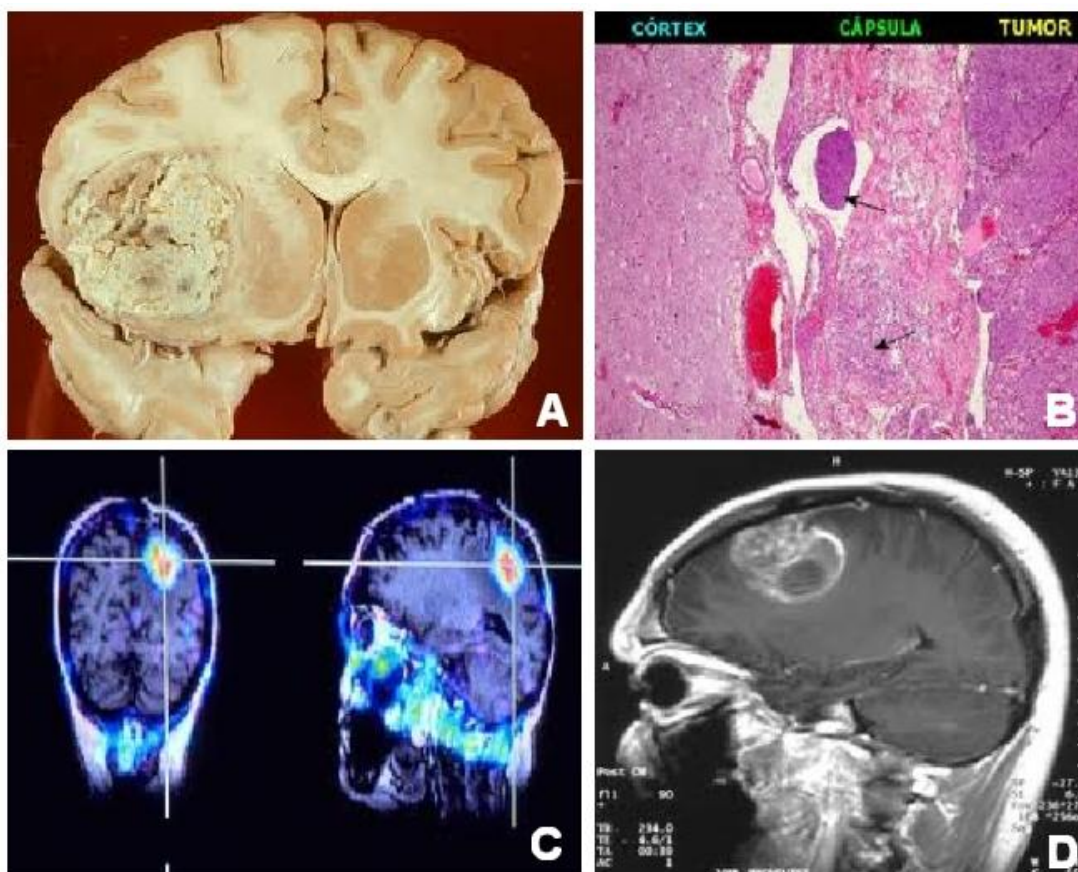


Figura 1- (A) Amostra de cérebro com tumor maligno; (B) corte histológico mostrando células de glioblastoma multiforme humano; (C e D) ressonância magnética demonstrando tumor cerebral (COELHO, 2010).

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. 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 raras. 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 multiforme 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, foram amplamente caracterizadas nos glioblastomas (RUTKA et al., 1999). Ainda, entre os elementos que caracterizam os glioblastomas, temos as mutações no gene p53 e a expressão de receptores para o fator de crescimento da epiderme (EGFR) e para o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR) (KARGIOTIS et al., 2006; JANSEN et al., 2004).

Estas neoplasias são mais encontradas em homens com idade entre 40-65 anos (SOFFIETTI et al., 2007). O prognóstico é reservado, 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).

2.4- ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA GLIOBLASTOMAS MALIGNOS

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 dos pacientes em alguns meses (TATOR et al., 1977; HILDEBRAND et al., 1997; FRIEDMAN et al., 2000; KEIME-GUIBERT et al., 2007).

A eficácia terapêutica da cirurgia para os glioblastomas é limitada, reflexo da alta recorrência e propriedade infiltrante deste tipo de tumor, o que torna uma ressecção cirúrgica total impossível sem que haja danos neurológicos ao paciente, 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 o tratamento de glioblastomas, 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 para esta neoplasia o quimioterápico temozolamida (TMZ). O TMZ tem demonstrado eficácia para o tratamento de vários tipos de neoplasias, inclusive para os glioblastomas, onde tem aumentado a sobrevida do paciente por até um ano, sendo utilizado através de combinação terapêutica com o tratamento convencional (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-methyltriazen-1-yl)imidazole-4-carboximide (MTIC), não necessitando assim do metabolismo hepático para sua ativação e sendo rapidamente absorvido (FRIEDMAN et al., 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 são sugeridas para auxiliar e melhorar os tratamentos convencionais para os glioblastomas. Sendo os principais as terapias com retinoides (VANDIER et al., 1998; CHAMOU-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).

2.5 MICROAMBIENTE TUMORAL DOS GLIOMAS

Os glioblastomas são tumores heterogêneos; tanto nas células tumorais, quanto nas células do parênquima cerebral (CHARLES et al., 2011). Embora, a localização dos gliomas seja considerada uma região imuno privilegiada, sabe-se que estes tumores apresentam uma grande quantidade de células microgliais ao seu redor (BADIE & SCHARTNER, 2000). Apesar das microglias serem as células do sistema imune no SNC, não se sabe ao certo a sua função na biologia destas neoplasias.

Análises histológicas têm demonstrado uma grande quantidade de macrófagos e micróglia na massa tumoral que são determinadas por técnicas imunohistoquímicas e por citometria de fluxo (BADIE & SCHARTNER, 2000; HUSSAIN et al., 2006; ZHAI et al., 2011). No entanto estas células secretam citocinas angiogênicas e imunossupressoras que são atraídas pelo glioma e promovem a invasão e o crescimento tumoral (GRAEBER et al., 2010).

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 e TNF- α , responsáveis pelo desenvolvimento da resposta imune inata (BADIE & SCHARTNER, 2000; HUSSAIN et al., 2006; LEHNARDT, 2010).

Durante a interação microglia/glioma, as células tumorais induzem a inibição da produção de citocinas inflamatórias TNF, bem como reduz a expressão da anti-inflamatória IL-10 pelas células microgliais (KOSTIANOVSKY et al., 2008). Essa expressão tem uma relação direta com a expressão de STAT 3, uma proteína que atua como fator de transcrição relacionado com a produção de citocinas regulatórias e a progressão tumoral. Células gliais não transformadas apresentam uma relação da expressão desses eventos, embora ocorram numa menor produção, indicando assim uma contribuição destas células na modulação da resposta imune antitumoral (PITANGA, 2012).

A interação do tumor com as células normais do SNC alteram o perfil inflamatório da resposta imunológica antitumoral. Diversos estudos demonstram que o perfil de resposta Th1 apresenta um melhor prognóstico em pacientes com câncer (GALON, 2008). Esse perfil de resposta contribui para a destruição tumoral (DIEU- NOSJEAN et al., 2008). Pacientes com resposta a citocinas inflamatórias polarizadas para o perfil Th1, apresentaram melhora no quadro clínico. Por outro lado, pacientes com alta resposta regulatória no ambiente tumoral, como por exemplo, expressão genética de marcadores Th17 obtiveram piores prognósticos (BINDE, 2011).

2.6 GLIOMA MURINO: A LINHAGEM C6 COMO UM MODELO DE ESTUDOS PARA OS GLIOBLASTOMAS MULTIFORMES HUMANOS

A utilização de modelos *in vitro* de células gliais é uma etapa essencial para a investigação da especificidade dos efeitos e mecanismos de ação de agentes químicos, bem como dos mecanismos de patogênese de doenças de diferentes origens no SNC (COOKSON et al., 1994; SANFELIU et al., 1999). Linhagens de origem glial podem ser obtidas e mantidas em cultivos celulares podendo ser utilizadas como modelos alternativos e confiáveis para o estudo de propriedades e resposta de células gliais a agentes externos (LAL et al., 1996).

Células de origem glial, principalmente os astrócitos, podem transformar-se em gliomas com diferentes graus de malignidade, tais como astrocitomas e glioblastomas (HILDEBRAND et al., 1997). Diversas linhagens de glioblastoma são utilizadas como modelo de estudo *in vitro* de células gliais para o estudo de propriedades biológicas, pois são facilmente acessíveis e manipuláveis além de oferecerem resultados reprodutíveis mais rapidamente. Algumas linhagens de glioblastoma são bastante difundidas e, dentre elas, se destaca a linhagem C6 que foram derivadas de glioblastomas induzidos quimicamente pela ação de agentes alquilantes carcinogênicos em ratos (DAI & HOLLAND, 2001)

Esta linhagem tumoral foi originada na década de 60 a partir de repetitivas administrações de metilnitrosuréia em ratos Wistar adultos (BENDA et al., 1968). Estas células apresentam uma alta taxa de divisão celular, bem como um grande polimorfismo nuclear (AUER et al., 1981), com uma supressão no locus do gene p16/CDKN2A/NK4A (FURNARI et al., 2007) e marcação para a principal proteína do citoesqueleto astrocitário, a GFAP (TSENG et al., 2006).

Diversos estudos experimentais utilizam esta linhagem para avaliar a eficácia terapêutica de novos compostos químicos para o tratamento das neoplasias cerebrais (YOSHIDA et al., 1987), terapia gênica (CHEN et al., 1993), imunoterapia (CARSON et al., 1991), na sinalização celular (KIM et al., 2008; JACOBS et al., 2011), bem como na testagem de produtos naturais (SABARINATHAN et al., 2010; 2011). Esta linhagem celular apresenta uma grande reação microglial e é altamente imunogênica (BEUTLER et al., 1999). Neste sentido, apresenta uma grande alternativa para os estudos na neuroimunologia.

2.7 PLANTAS MEDICINAIS E COMPOSTOS FLAVONOIDES

2.7.1 Explorando a flora baiana

Segundo Silva (2010), toda planta administrada ao homem ou ao animal que exerce sobre eles uma ação farmacológica é chamada de planta medicinal. Estas plantas têm sido objeto de estudo no Brasil e no mundo na tentativa de descobrir novas fontes para obtenção de fitoterápicos e fármacos (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 terapeuticamente. 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 vários exemplares utilizados pela população (DISTASI et al., 2002), sendo conhecidas como plantas medicinais, através do conhecimento verbal que é passado por gerações. Suas aplicações são vastas abrangendo desde o combate ao câncer até 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).

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). Algumas espécies deste gênero são popularmente utilizadas para várias finalidades medicinais como atividade antitumoral, anti-helmíntico, antifúngico, tratamento de diabetes, úlcera, distúrbios gástricos, analgésico e larvicida (tabela 3).

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 que tem

apresentado 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).

Tabela 1. - Espécies de *Croton* utilizadas na medicina popular (FREITAS, 2009)

Espécie	Utilização	Referências
<i>Croton cajucara Benth</i>	Antiúlceras	DE PAULA et al., 2008
<i>Croton nepetaefolius</i> <i>Croton argyrophyloides</i>	Antifúngico	FONTENELLI et al., 2008
<i>Croton Klotzianus</i>	Tratamento da diabetes	GOVINDARAJEM et al., 2008
<i>Croton tonkinensis</i>	Anti-inflamatório e antitumoral	KUO et al, 2007
<i>Croton argyrophyloides</i>	Larvicida	MORAIS et al., 2006
<i>Croton tiglium L.</i>	Analgésico	WU et al., 2007
<i>Croton cajucara</i>	Distúrbios gástricos	PAULA et al., 2006
<i>Croton zehntneri</i>	Anti-helmíntico	CAMURÇA et al., 2007
<i>Croton Lechleri</i>	Anticâncer	GONZALES et al., 2006
<i>Croton hutchinsonianus</i>	Antifúngico	ATHIKOMKULCHAI et al., 2006

A Organização Mundial de Saúde (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, utilizam-se 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.

2.7.2 A espécie *Croton betulaster*

A espécie *Croton betulaster* (figura 5) 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, partes da planta, como 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 extraídas compostos 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 2 - Exsicata de *Croton betulaster*, catalogada sob n° 031762 no Herbário Alexandre Leal Costa (IB-UFBA).

2.7.3 Características químicas e estruturais dos flavonoides

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 6. 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).

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 o 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).

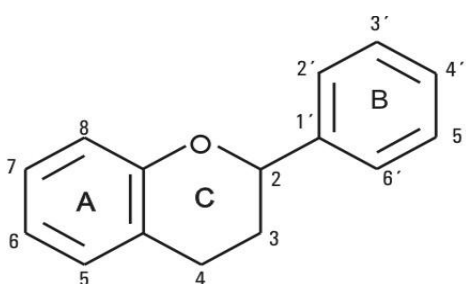


Figura 3 – Estrutura geral dos flavonoides (YUNES & CALIXTO, 2001)

2.7.4 Propriedades biológicas de flavonoides

Diversos tipos de flavonoides isolados de diferentes plantas têm revelado uma grande diversidade de atividades biológicas com funções bioquímicas e farmacológicas em células humanas (MIDDLETON et al, 2000; FRIEDMAM, 2007).

Uma das propriedades biológicas dos flavonoides mais estudadas é a sua atividade antioxidante (DOK-GO et al., 2003; GUPTA et al., 2003; FRIEDMAM, 2007; YE et al., 2007). Diversas pesquisas atribuem a estes 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, as quais publicam resultados de diversos grupos de pesquisas que discutem e revelam atividades biológicas destas biomoléculas (IELPOA et al., 2000). Os resultados das pesquisas, que exploram as mais variadas atividades biológicas dos flavonoides, tem sido promissores. Muitas delas estão em fase clínica, estimulando vários grupos de pesquisas no estudo de compostos naturais como promissores fármacos na cura de enfermidades diversas.

A relação entre consumo de frutas, legumes e verduras associadas com hábitos saudáveis podem contribuir para a prevenção de doenças, entre elas o câncer (BLOCK et al., 1992). Em uma pesquisa feita a partir de dados epidemiológicos o autor conclui que os flavonoides encontrados nos vegetais oferecem grandes benefícios à saúde humana, podendo, através do aumento da ingestão destes alimentos, contribuir na melhoria da saúde pública.

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).

Diversos tratamentos com compostos polifenólicos foram capazes de modificar a produção de óxido nítrico em cultura de células C6. Este gás 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 um dos mecanismos que influencia o aumento desse sinalizador são as células microgliais (HWANG, 2010). Vários compostos polifenólicos possuem essa capacidade de induzir a produção do NO, inclusive a apigenina (SOLIMAN & MAZZIO, 1998).

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).

2.7.5 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 têm 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 cancer de pulmão (A549) expostas ao flavonoide apigenina.

Experimento realizado por Brusselmans e colaboradores (2005) demonstrou a presença de apoptose em células de câncer de próstata expostos a flavonoides, fato este também observado em estudo feito por Singh & 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 e colaboradores (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. Estudo *in vitro* feito 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 bacaleína. 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 atividade antitumoral dos flavonoides no sistema nervoso central, também tem sido investigada. Estudos feitos por Scheck et al. (2006) revelaram que flavonoides extraídos de *Scutellaria baicalensis* induzem inibição do crescimento em células de glioblastoma multiforme humano. Ferguson et al. (2006) demonstraram que flavonoides extraídos da amora induzem parada do ciclo celular em G1 e apoptose em glioblastoma multiforme humano. Braganhol et al. (2006) relataram em sua pesquisa que o flavonoide quercetina possui ação antitumoral sobre gliomas da linhagem U138MG. 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 de glioblastoma humano 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 mostrou-se 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 fator de crescimento endotelial vascular e angiogênese em células tumorais do pulmão (LIU et al., 2005)

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; FREITAS, 2009), bem como com o flavonoide penduletina (LI et al.; 2005; FREITAS, 2009).

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 epigalcatenina 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).

A estrutura molecular dos flavonoides tem sido indicada como responsável pelas suas diversas atividades biológicas. Sua estrutura permite modificações e associações com diversos radicais e ainda potencializam a sua interação com membranas celulares. Devido a isto, os flavonoides tem 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 sistema nervoso central (NONES et al., 2010).

3.0 HIPÓTESES E OBJETIVOS

Baseado nas propriedades antitumorais dos flavonoides e pela capacidade da apigenina em inibir o crescimento e alterar a produção de citocinas angiogênicas em linhagens de células derivadas de glioma humano, o nosso trabalho teve como hipótese que o flavonoide apigenina possui propriedades antitumorais e a capacidade de alterar a viabilidade, proliferação e diferenciação de células de glioma através da regulação da sinalização celular e secreção de citocinas imunomodulatórias.

3.1 Objetivo Geral

Com o propósito de analisar a atividade biológica atribuída aos compostos polifenólicos, esta pesquisa teve como objetivo geral investigar o efeito do flavonoide apigenina, extraído da planta *Croton betulaster Mull*, no crescimento de células de glioma murino da linhagem C6 e regulação de fatores envolvidos na resposta inflamatória contra tumores.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos do flavonoide apigenina na viabilidade, proliferação e diferenciação de células de glioma da linhagem C6.
- Avaliar a capacidade do flavonoide apigenina em induzir morte celular programada (apoptose) e autofagia em células da linhagem C6.
- Investigar o efeito do flavonoide apigenina na regulação da liberação de NO e das citocinas IL-10 e TNF em células da linhagem C6.
- Analisar as vias de sinalização regulados pela apigenina envolvidas na imunomodulação das células da linhagem C6.

4.0 - CAPÍTULO 1: Artigo Científico –

EFEITOS DO FLAVONOIDE APIGENINA EXTRAÍDO DE *CROTON BETULASTER MULL* NA VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DE GLIOMA MURINO E REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE MOLÉCULAS INFLAMATÓRIAS.

Resumo

Os gliomas são as neoplasias mais agressivas do SNC. Nossos estudos anteriores demonstraram uma capacidade antitumoral e morfogênica de flavonoides em células de glioblastomas humanos. O flavonoide apigenina extraído da planta *Croton betulaster*, apresentou um importante efeito inibidor do crescimento de células de glioblastoma humano da linhagem GL-15, com modificação do perfil de citocinas angiogênicas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da apigenina na viabilidade, proliferação e diferenciação de células de glioma murino C6, assim como na regulação da liberação de NO, IL-10 e TNF, moléculas envolvidas na resposta imunológica a tumores. Foi observado através do teste de MTT e coloração com azul de tripan que o flavonoide apigenina (1-100 μ M) reduziu a viabilidade das células C6 de forma dose e tempo dependentes após 24 a 72 horas de tratamento. Essa diminuição da viabilidade celular foi associada à indução de apoptose e à autofagia. O flavonoide foi capaz de inibir a migração celular e induzir acúmulo de células na fase G0 / G1 do ciclo celular e causar alterações morfológicas associadas ao aumento da expressão das proteínas astrocitária GFAP. Após tratamento com a apigenina, verificou-se, por citometria de fluxo, uma redução de NF κ B, sem alteração significativa das proteínas STAT3 e p-STAT3, aumento da intensidade de marcação para anexina V e formação de vacúolos autofágicos positivos para o corante fluorescente laranja de acridina. Foi observado pelo teste de ELISA que o flavonoide diminuiu a secreção da citocina inflamatória TNF, bem como reduziu a citocina regulatória IL-10, além de aumentar a produção de NO. Estes resultados sugerem que o flavonoide apigenina induziu diferenciação celular e reduziu o crescimento, e migração celular, além de alterar o perfil regulatório de proteínas e citocinas imunomodulatórias em gliomas da linhagem C6. Diante disso, este flavonoide possui eficiente potencial antiproliferativo, podendo contribuir para o tratamento adjuvante dessas neoplasias cerebrais malignas.

Palavras chaves: Flavonoide, Apigenina, Diferenciação, Apoptose, Glioma

EFFECTS OF THE FLAVONOID APIGENIN, EXTRACTED FROM *CROTON BETULASTER MULL*, ON VIABILITY, DIFFERENTIATION AND REGULATION OF INFLAMMATORY PROTEINS EXPRESSION IN MURINE GLIOMA CELLS.

Abstract

Gliomas are the most aggressive cancers of the CNS. Our previous studies demonstrated antitumor and morphogenic capacity of flavonoids in human glioblastoma cells. The apigenin flavonoid extracted from the plant *Croton betulaster*, showed a significant inhibitory effect on cell growth of human glioblastoma GL-15 strain, with modification of the profile of angiogenic cytokines. The aim of this study was to evaluate the effect of apigenin on viability, proliferation and differentiation of murine C6 glioma cells as well as in regulating the release of NO, IL-10 and TNF molecules involved in the immune response to tumors. It was observed by MTT assay and trypan blue staining, that the flavonoid apigenin (1-100 μ M) reduced the viability of C6 cells in a dose and time dependent manner after 24 to 72 hours of treatment. These decrease in cell viability was associated with induction of apoptosis and autophagy. The flavonoid was able to inhibit cell migration, induced cell accumulation in the phase G0 / G1 of the cell cycle and caused morphological changes associated with increased expression of the astrocyte GFAP proteins. It was found by flow cytometry, after treatment with apigenin, a reduction of NF κ B, without significant alteration of proteins STAT3 and p-STAT3, increased staining for annexin V and formation of autophagic vacuoles positives for the fluorescent dye acridine orange. It was observed by ELISA, that the flavonoid decreased the secretion of inflammatory cytokine TNF, as well as reduced the regulatory cytokine IL-10, besides increasing the production of NO. These results suggest that the flavonoid apigenin induced cellular differentiation and reduced growth and cell migration, in addition to changing the profile of regulatory cytokines and immunomodulatory proteins in glioma C6 lineage. Thus, this flavonoid has potential antiproliferative effects and can contribute to the adjuvant treatment of these malignant brain tumors.

Keywords: Flavonoid, apigenin, differentiation, apoptosis, Glioma

4.1 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.

Atualmente, o protocolo para estes tumores é multissistêmico, associando remoção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia (WANG, 2004). Dentre os compostos químicos utilizados, merecem destaque a TMZ e os compostos da nitrosuréia (TATOR et al., 1977; GERMANO et al., 2010). Estudos recentes demonstram que fatores antiangiogênicos como VEGF, IFN- β e TGF- β merecem importância e são fundamentais na redução tumoral (MERZKAK et al., 1994; HONG et al., 2000). Novas pesquisas buscam uma melhor eficácia nos tratamentos para os gliomas, a partir de novas drogas como os retinoides (COSTA et al., 2001) e flavonoides (SILVA et al., 2008). Apesar dos avanços na oncologia clínica, a expectativa de vida para um paciente diagnosticado com o glioblastoma dificilmente ultrapassa 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). Flavonoides vêm sendo utilizados em diversas pesquisas biológicas em diversas linhagens de células tumorais (MAK et al., 2006; UJIKI et al., 2006) bem como em células derivadas de glioblastoma (DAS et al., 2010). Nossos estudos também têm demonstrado que flavonoides possuem uma atividade antitumoral em células derivadas de glioblastomas

humanos sem, no entanto, apresentar efeitos citotóxicos para células astrocíticas normais do SNC (SILVA et al., 2008; SANTOS et al., 2011). Pesquisas realizadas por Freitas e colaboradores (FREITAS 2009; FREITAS et al., 2010) destacam a atividade do flavonoide apigenina na inibição do crescimento e na regulação de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento tumoral beta (TGF-beta) em células de glioblastoma humano.

Neste contexto, este estudo procurou investigar os efeitos do flavonoide apigenina sob a viabilidade, morfologia e expressão de proteínas relacionadas a resposta imune em células da linhagem C6 derivadas de glioma murino.

4.2 Métodos

4.2.1 O flavonoide apigenina

O composto isolado foi obtido das folhas de *Croton betulaster Mull* 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, 1999). 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 4, 24, 48 e 72 h nas concentrações finais de 1 a 100 µM, assim como o seu veículo de diluição (DMSO 0,1 %) e o controle negativo.

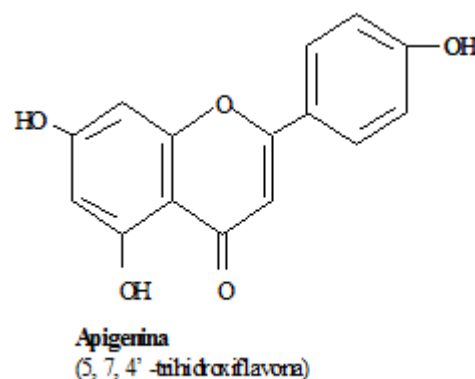


Figura 4 - Estrutura química do flavonoide apigenina das folhas de *Croton betulaster Mull* (BARBOSA, 2003).

4.2.2 Agente quimioterápico temozolamida

O medicamento Temodal® (Schering Plough) foi adquirido comercialmente. O conteúdo da cápsula foi diluído em água deionizada, agitada a 37 °C por 30 minutos e estocado a – 70 °C.

4.2.3 Cultura de glioma C6 e de células gliais

As células da linhagem C6 foram conservadas em uma solução de 90% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) à razão de $1,5-2 \times 10^6$ células/mL e estocadas em criotubos no nitrogênio líquido a -70°C. Culturas de células confluentes, cultivadas em placas de 100 mm ϕ 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, 100 UI/mL de penicilina G e 7 mM de glicose, e incubadas a 37 °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, diluída diretamente no meio de cultura suplementado, em concentrações variando de 1 a 100 μ M, por um período de 4 a 72 horas. Todos os experimentos foram realizados até a décima passagem de células.

As culturas de células gliais foram preparadas a partir de hemisférios cerebrais de ratos Wistar neonatos em idade pós-natal de 0 a 2 dias (P0-P2) obtidos junto ao Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS- UFBA, Salvador, BA, Brasil) e realizadas de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências da Saúde (protocolo nº027/2012). A meninge foi cuidadosamente removida e os hemisférios cerebrais dissecados. Durante a dissecação, as estruturas foram mantidas no próprio meio de cultura. Em seguida, as células foram dissociadas com tesoura oftálmica em um tubo falcon de 50 ml. Após decantação dos fragmentos não dissociados, o sobrenadante foi

submetido à centrifugação, em centrífuga clínica, a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso e plaqueado em garrafas de cultura contendo DMEM-F12 suplementada com 10 % de soro fetal bovino (DEMEM com nutriente F-12) (Gibco; Carlsbad, CA, EUA), acrescentado de glicose (33 mM), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM), penicilina/estreptomicina (0,5 mg/ml) e fungizona (2,5 µg/ml). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

4.2.4 Análise da citotoxicidade e viabilidade celular

4.2.4.1 Redução dos Sais de Tetrazólio (MTT)

O teste de redução dos sais de tetrazólio foi 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-difeniltetrazólio (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 nas concentrações de 1 a 100 µM por 24, 48 e 72 h e com o quimioterápico TMZ nas concentrações de 50 a 1000 µM. 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 1 mg/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 em triplicata. Os resultados foram apresentados como a porcentagem da viabilidade (média e desvio padrão) em relação ao DMSO (0,1%), e o CN considerado como 100%.

4.2.4.2 Coloração de azul de tripan

A viabilidade celular para as células de C6 foi obtida com a realização da coloração

de azul de tripan. Este teste baseia-se na coloração das células não viáveis, devido a alteração das membranas plasmática das células mortas. As células foram plaqueadas em placas de cultura de 40 mm de diâmetro (TPP) a uma concentração de 1.5×10^5 células/placa. Após o tratamento ambas as células aderentes e flutuantes foram adquiridas por tripsinização e todos os reagentes envolvidos na tripsinização foram centrifugados por cerca de 5 minutos a 1500 RPM. Em seguida, as células foram suspensas em 200 μ L e coradas com o azul de tripan a uma concentração final de 0,1% (v.v). Três experimentos independentes foram realizados após 24 a 72 h de exposição ao flavonoide nas concentrações de 50 e 100 μ M. O número de células viáveis e não viáveis (azuis) por mL foi determinado pela contagem de três amostras de 10 μ L de suspensão celular para cada experimento na câmara de Burker (Boehringer Mannheim).

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 48h de exposição à apigenina nas concentrações de 50 e 100 μ M, as células de C6 foram analisadas em microscopia com contraste de fase (Nikon TS-100) com filtro verde e em seguida, fotografada por uma câmara digital (Nikon E-4300). Foram analisadas 10 fotos para cada tratamento em três experimentos independentes.

4.2.5.2 Análise imunocitoquímica da expressão da proteína GFAP e nestina

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 o anticorpo policlonal produzido em coelho contra GFAP (Dako, Cytomation) com o anticorpo policlonal contra nestina (Santa Cruz) diluído em PBS/BSA (1%) na proporção de 1:500 durante a noite em câmara úmida a 4°C .

Decorrido o tempo de incubação no anticorpo primário, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e incubadas com o anticorpo secundário, uma IgG de camundongo contra coelho conjugado à fluoresceína (FITC) diluído em PBS na proporção de 1:400, sob agitação lenta, por 2 h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram contra corados com o agente fluorescente intercalante de DNA 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) na concentração de 5 µg/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 no anticorpo primário.

4.2.6 Análise das vias de sinalização e expressão das proteínas intracelulares

As células tumorais da linhagem C6 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços e tratadas com o flavonoide apigenina por 4 h. Ao final desta incubação, as células foram tripsinizadas, lavadas com uma solução de PBS com SFB a 2%. Posteriormente, as células em suspensão foram centrifugadas por 5 min a 400g, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com uma solução de lise a 10% (BD FACS-349202, Becton & Dickinson) por 30 minutos. As células foram lavadas com uma solução de PBS com Tween 20 a 0,5%, centrifugando-as por 5 min a 400g. Em seguida, foi feito o bloqueio para ligações inespecíficas com PBS com SFB a 2% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram centrifugadas nas mesmas condições e foram imunomarcadas com os anticorpos monoclonais contra STAT3 (1:250, Santa Cruz), contra STAT3 fosforilada (1:250, Santa Cruz), ou contra NFkB (1:250, Santa Cruz) diluídos em PBS. Os controles negativos não receberam os anticorpos primários. Após 30 minutos, à temperatura ambiente, as células foram lavadas com a solução de PBS com Tween-20 a 0,5%. Foram adicionados os anticorpos secundários uma IgG contra camundongo ou uma IgG contra cabra conjugado a Alexa Fluor 488 (1:500, Molecular Probes) por 30 minutos, à temperatura ambiente e na ausência de luz. As células foram lavadas nas mesmas condições, ressuspendidas em PBS com SFB a 2% e avaliadas através do aparelho FACS calibur (Becton & Dickinson) no canal FL1 (530nm), utilizando o *software* Cell Quest (Macintosh).

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

4.2.7 Ensaio de morte celular

Assim como no ensaio de viabilidade celular, as células foram tratadas com apigenina na concentração de 100 μM e analisadas após 72 h usando Kit Annexin V (Sigma). Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido e as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37 °C. Após a incubação, as células foram recuperadas e lavadas com DMEM-F12 com SFB a 10%, centrifugadas por 5 minutos a 400g. Após 30 minutos de incubação 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 as células 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 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 de apoptose.

4.2.8 Ensaio de autofagia

Para realizar o ensaio de morte celular, as células foram tratadas com apigenina na concentração de 100 μM e analisadas após 72 h usando corante fluorescente laranja de

acridina (Sigma, Induslab) que caracteriza vacúolos autofágicos. Após o tempo de tratamento, foi adicionado o corante fluorescente laranja de acridina (1 µg/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 lavadas com DMEM-F12 com SFB a 10% e recuperadas centrifugando por 5 minutos a 400g. Foram adicionados no *pellet* 250 µL de PBS com BSA a 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.

4.2.9 Ensaio de migração

Para avaliar o potencial do flavonoide apigenina em inibir a migração das células C6 foi realizado um ensaio em monocamada celular. As células tumorais foram plaqueadas em placas de 24 poços (TPP) a uma concentração de 50×10^3 células/ poço. Após a formação de uma monocamada celular confluenta foi promovida uma lesão uniforme na placa de cultura com o auxílio de uma ponteira 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. Após 24, 48 e 72 h as células foram observadas por microscópio de contraste de fase e fotografadas.

4.2.9 Análise do Ciclo celular

Para conferir o efeito inibidor da proliferação após 48 h de tratamento com o 100µM de apigenina as células C6 foram tripsinizadas e ressuspensas em meio com soro. Após centrifugação de 5 minutos a 400g, estas células foram incubadas por 15 minutos com uma solução de ciclo celular [tampão citrato pH 6,0 (Sigma), PI (50 mg/ml), Triton 0,3% e RNase (100 mg/ml, Invitrogen)] e 10.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo (BD FACS Calibur) no canal FL2. Este experimento foi realizado 3 vezes de forma independente.

4.2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para determinar a diferença estatística entre os grupos foi realizada uma análise de variância seguida pelo teste One Way ANOVA com pós-teste de Student-Newmann-Keuls (Graph Pad Prisma 5.0 - California, EUA). A viabilidade celular foi calculada em percentagem em relação ao controle negativo que foi considerado como 100%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

4.3. Resultados

4.3.1 Efeitos do flavonoide apigenina na viabilidade tumoral

Visando determinar a viabilidade celular de C6 ao flavonoide apigenina foi realizado o teste do MTT. Quando comparado ao controle (DMSO 0,1%) foi observado que o flavonoide apresenta uma toxicidade tempo e dose dependente sobre as células, sendo que nas concentrações testadas (1-100 μM) a toxicidade foi observada a partir da concentração de 30 μM nos tempos de 24 e 48 h (Fig. 1 A e B). Em contrapartida, no tempo de 72 h (Fig 1C), o flavonoide apresentou toxicidade já na concentração inicial de 1 μM . A IC 50 foi calculada, sendo verificados valores de 32,8 μM e 22,8 μM nos tempos de 48 e 72 h, respectivamente (Fig.1 D e E).

No teste de azul de tripan foi observado que a apigenina nas concentrações de 50 e 100 μM induziu uma diminuição significativa, dose e tempo dependente na quantidade de células viáveis. Neste ensaio ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05\%$) no número de células viáveis da linhagem C6 a partir da concentração de 100 μM após o período de 24 h. Após 72 h de tratamento com apigenina na concentração de 100 μM foi observada uma redução de 80% na viabilidade celular (Fig. 2).

Visando verificar a sensibilidade da linhagem de glioma C6 a quimioterápicos e o efeito citotóxico específico do flavonoide para células tumorais foi realizado o ensaio de MTT em culturas de C6 expostas à temozolamida (TMZ) e em culturas primárias de astrócitos expostas a flavonoides por 72 h. Observamos toxicidade nas células de C6 tratadas com o quimioterápico TMZ a partir da concentração de 100 μM com redução de $31,6 \pm 3,6\%$ na viabilidade celular. Uma redução superior a 50% somente foi verificada após tratamento com 1 mM da TMZ. Por outro lado, a apigenina não apresentou toxicidade nas culturas de astrócitos expostas as concentrações testadas (1-100 μM) (Fig 3).

4.3.2 Efeito do flavonoide apigenina sobre a morfologia e expressão de marcadores estruturais de diferenciação celular das células

A propriedade de induzir mudança morfológica e diferenciação do flavonoide apigenina nas células tumorais foi investigada por microscopia de contraste e fase e através de imunocitoquímica contra as proteínas do citoesqueleto GFAP, marcador de

astrócitos, e nestina, marcador de célula precursora neural. As análises revelaram que nas culturas em condições controle as células C6 formam uma monocamada de células apresentando um fenótipo bipolar, além de uma confluência total na placa. No entanto, alterações importantes no número e no fenótipo de células aderidas foram verificadas nas culturas tratadas com apigenina. 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 4).

As células C6 apresentaram positividade para a proteína nestina, distribuída em todo corpo celular em condições controle, e redução dessa marcação após tratamento com apigenina (Fig 5 A, B). De maneira contrária, a análise da expressão de GFAP mostrou que nas culturas de células de C6, em condições controle, a expressão da proteína é variável e mais localizada na região perinuclear (Fig 5 D). Por outro lado, 48 h após tratamento com apigenina, foi possível evidenciar uma mudança no fenótipo das células aderentes, em função do aumento da expressão de GFAP, especialmente na concentração de 100 μ M (Fig 5 F). Em paralelo, também foi observado uma diminuição da celularidade, bem como retração citoplasmática. Essas características apontam o flavonoide apigenina como um importante modulador morfológico na diferenciação e sobrevivência celular.

4.3.3 Ensaios de migração celular

A caracterização da propriedade anti-invasiva do flavonoide apigenina em células de C6 foi realizada por testes de migração celular através de uma lesão simples sob a monocamada de células. A migração celular foi diminuída no tempo de 24 h e aparentemente eliminada após 48 e 72 h de modulação com o flavonoide apigenina. Além disso, após 24 h de tratamento com apigenina, a lesão mecânica feita na monocamada de células C6 não foi visualizada e a diminuição da celularidade foi claramente evidenciada (Fig 6).

4.3.4 Análise da expressão de proteínas de sinalização intracelular

A análise da expressão de proteínas de sinalização (NF κ B, STAT 3 e p-STAT 3) verificada por citometria de fluxo demonstrou que estas proteínas relacionam-se à

progressão tumoral e a resposta imune. Verificou-se que quando comparado com o controle (DMSO 0,1%) as culturas de células de C6 tratadas com apigenina (100 μ M) apresentaram uma redução na proporção de células expressando NFkB. No entanto, não foram observadas alterações significativas dos níveis de STAT3 e de sua forma ativa p-STAT3 (Fig. 7).

4.3.5 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. Após 72 h de tratamento com 100 μ M do flavonoide 29,56 \pm 2,05 % das células foram positivas à anexina, um evento raramente presente nas culturas em condições controle (DMSO 0,1%) com somente 2.58 \pm 0,69 das células positivas a anexina (Fig. 8).

4.3.6 Análise de vias de morte

A análise da formação de vacúolos autofágicos, indicador de morte celular, foi verificada através da coloração com laranja de acridina e análise por citometria de fluxo. Após 72 h de tratamento com 100 μ M do flavonoide apigenina, 6% das células foram positivas ao corante laranja de acridina, comparado a menos de 1% das células nas culturas em condições controle (DMSO 0,5%) (Fig 9).

4.3.7 Análise de ciclo celular

Em virtude do efeito inibitório da apigenina sobre o crescimento celular a distribuição das células de C6 após o tratamento com apigenina 100 μ M foi observada por citometria de fluxo. A proporção de células na fase G0/G1 aumentou com a exposição ao flavonoide com uma concomitante diminuição da fase G2/M. Dessa forma, a apigenina foi capaz de induzir alterações na distribuição das células nas fases do ciclo celular (Fig 10).

4.3.8 Regulação de citocinas inflamatórias e fatores tróficos

A análise da ação do flavonoide apigenina sobre a capacidade imunomodulatória das células de C6 foi investigada através da dosagem, no meio de cultura das células 48 h

após tratamento, da citocina pró-inflamatória TNF e da citocina anti-inflamatória IL-10 através de ELISA, e dos níveis de nitrito, forma estável do NO, através da reação de Greis (Fig. 11). Os ELISAs demonstraram que tanto nas culturas expostas ao veículo de diluição dos flavonoides (DMSO 0,1%) quanto nas culturas sem qualquer tratamento os níveis de IL-10 (396 pg/ml) são cerca de duas vezes superior àqueles de TNF (216 pg/ml) (Fig. 11 A e B). No entanto, após exposição à dose subtóxica do flavonoide (50 μ M) os níveis de IL-10 diminuíram para 132 pg/ml e os níveis TNF foram pouco reduzidos para 193 pg/ml. Por outro lado, ambas citocinas IL-10 e TNF tiveram níveis reduzidos após tratamento com a dose de 100 μ M de apigenina, atingindo níveis próximos de 63 pg/ml e 78 pg/ml, respectivamente. Não foi possível calcular a diferença estatística entre os grupos, em virtude da realização de um único experimento, indicando assim um resultado preliminar dessas citocinas.

A mensuração de nitrito revelou que 48 h após a exposição ao flavonoide apigenina (50 e 100 μ M) as células tiveram uma aumento na produção de NO (Fig. 11 C).

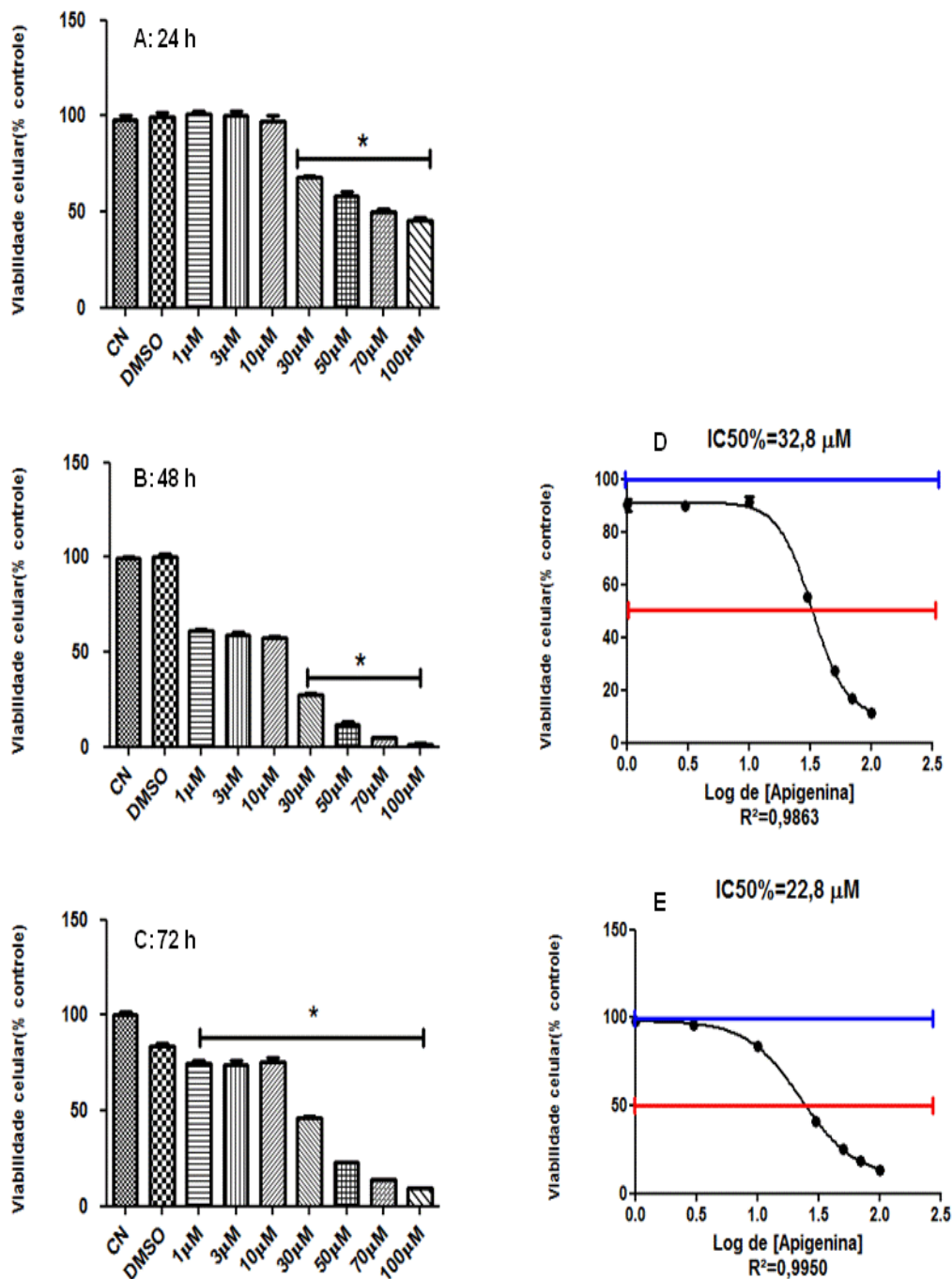


Figura 1- Efeito da apigenina (1-100 μ M) sobre a viabilidade de células C6 pelo Teste do MTT após 24 h (A), 48 h (B), e 72 h (C) do tratamento, e respectivos cálculos de IC 50 (D-E). Resultados expressos em média \pm desvio padrão em relação ao DMSO 0,1%. (*) Diferença estatística com $p < 0,05$ em relação ao DMSO 0,1%. CN- Controle Negativo.

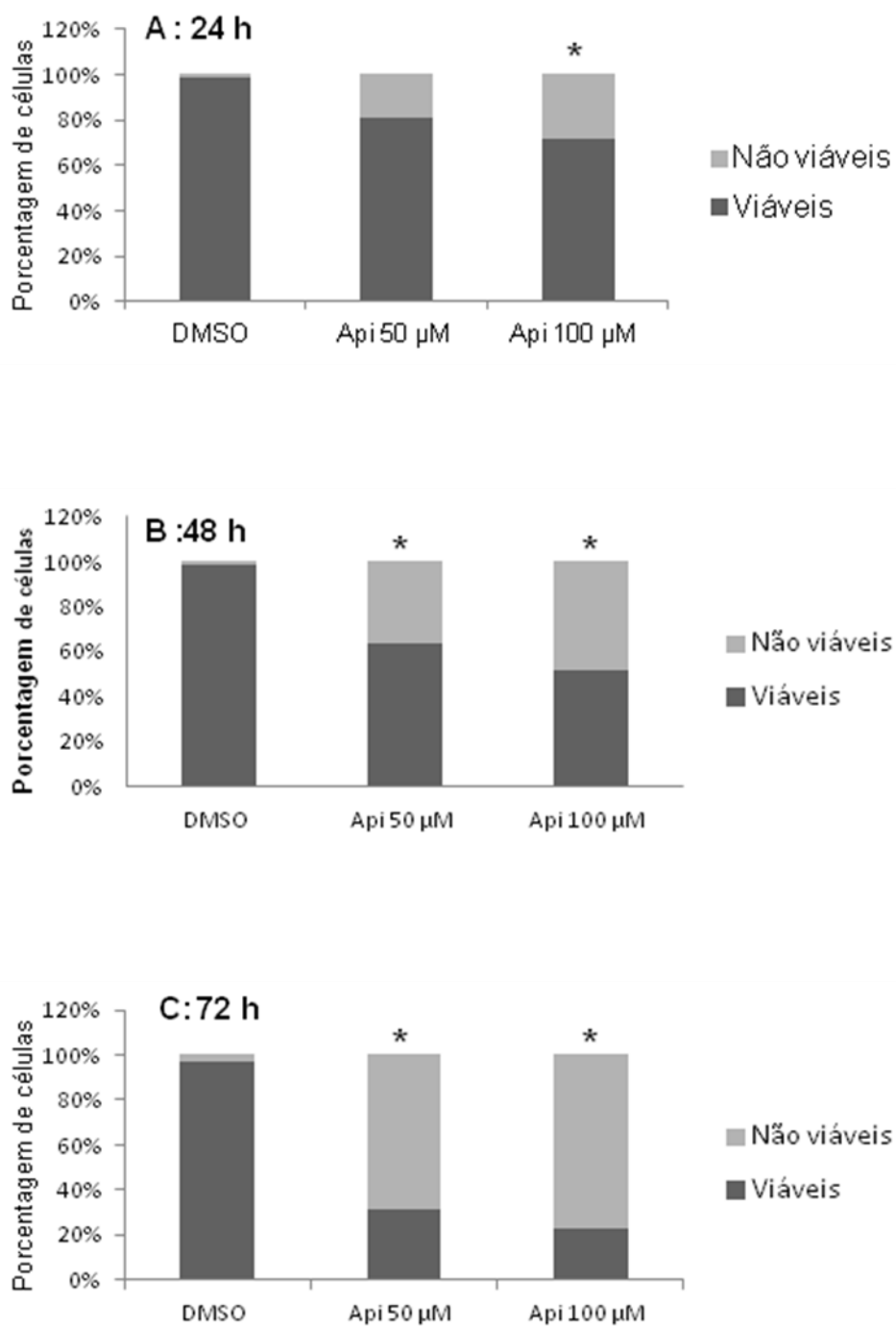


Figura 2: Efeito do flavonoide apigenina na viabilidade de células de C6 pela coloração do azul de tripan. As células foram tratadas com DMSO 0,1% ou com a apigenina (50 e 100 µM) e analisadas após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). Resultados expressos como a média do número de células viáveis e não viáveis em relação ao controle (DMSO 0,1%). (*) Diferença estatística com $p < 0.05$.

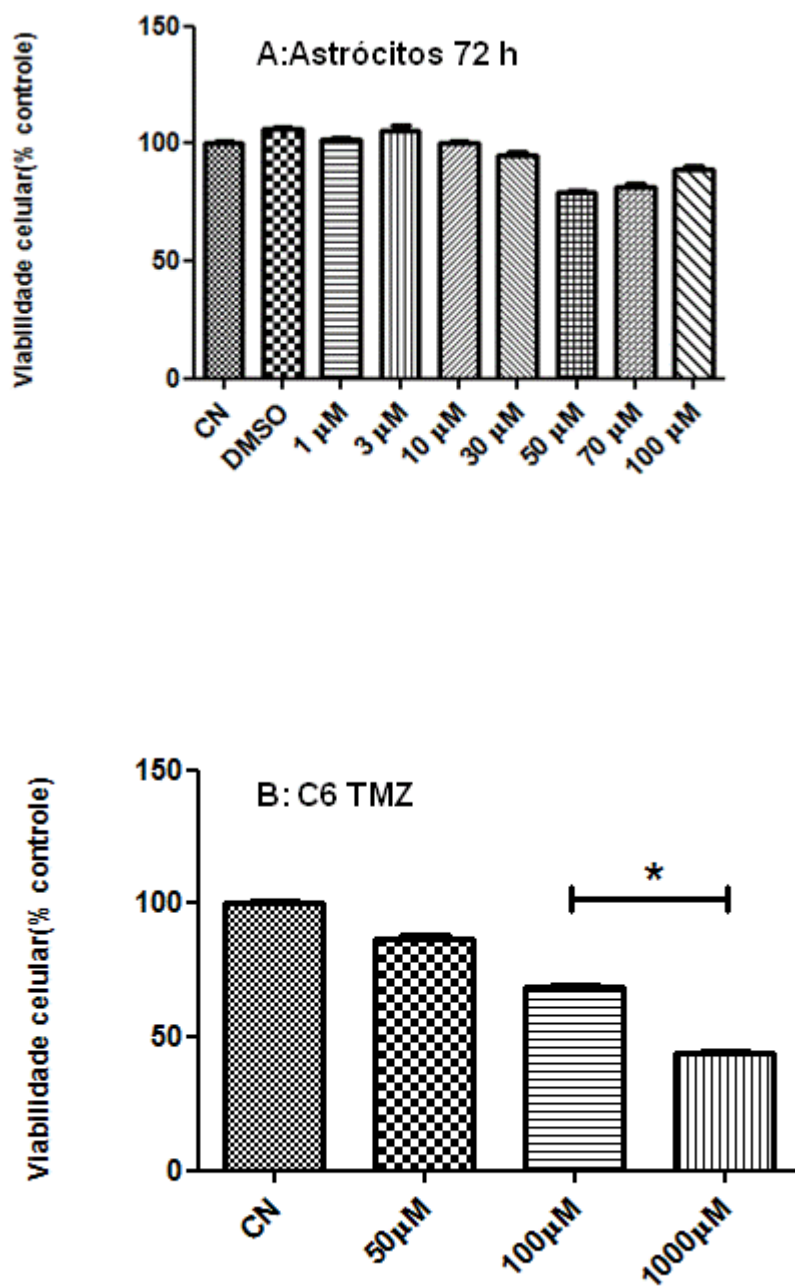


Figura 3- Efeito do flavonoide apigenina (1-100 μ M) sobre a viabilidade celular pelo teste do MTT em cultura primária de astrócitos corticais de ratos após 72 h de tratamento (A). Teste do MTT em cultura de células C6 após 72 h de tratamento com temozolamida (TMZ, 50-1000 μ M) (B). Resultados expressos em média \pm desvio padrão em relação ao DMSO 0,1%. $p < 0.05$. Controle Negativo (CN).

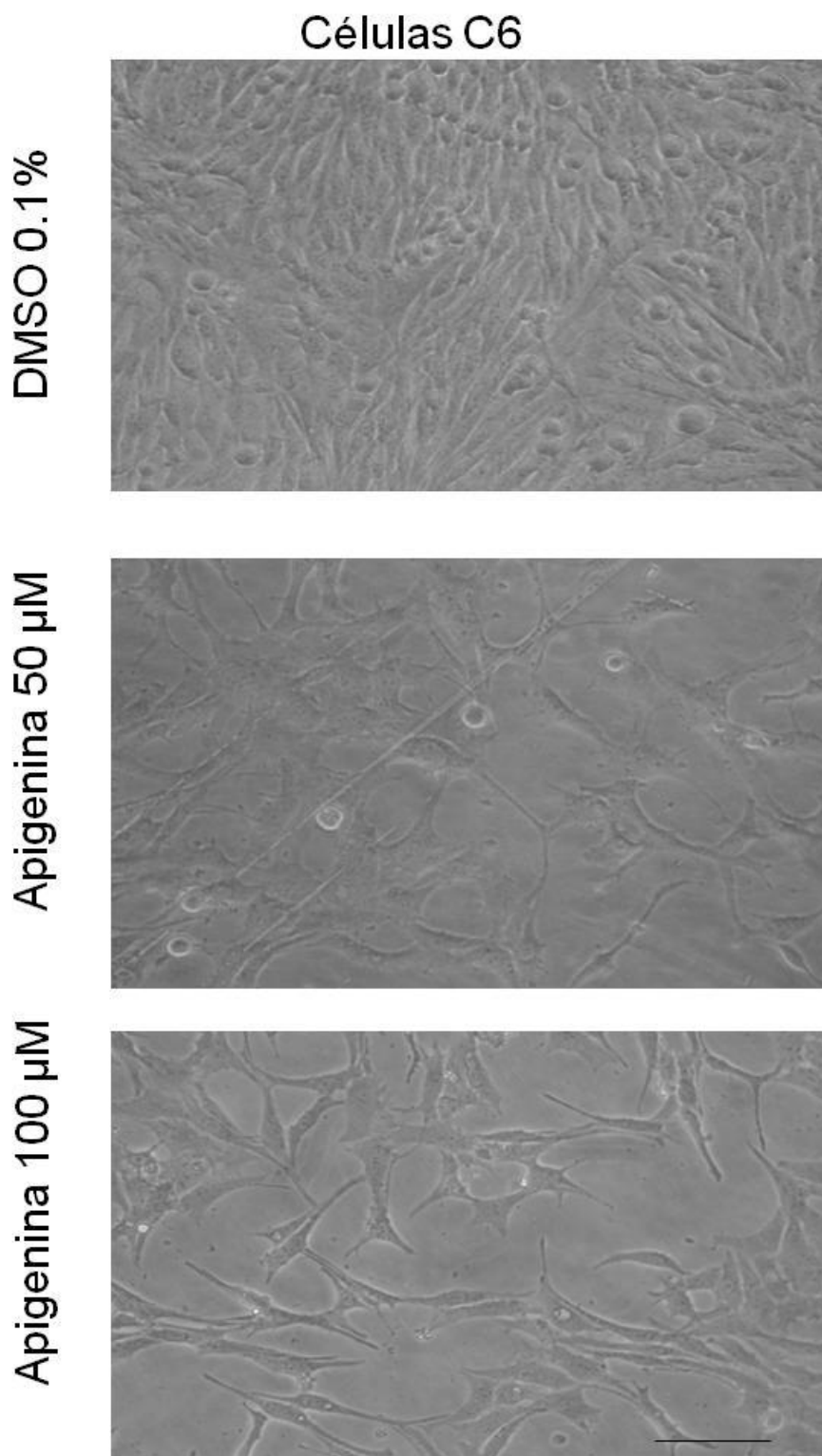


Figura 4- Análise por microscopia em contraste de fase da morfologia das células C6 em condições controle (DMSO 0,1%) (A) ou 48 h após tratamento com 50 μ M (B) ou com 100 μ M apigenina (C). Objetiva 20X, barra = 100 μ m.

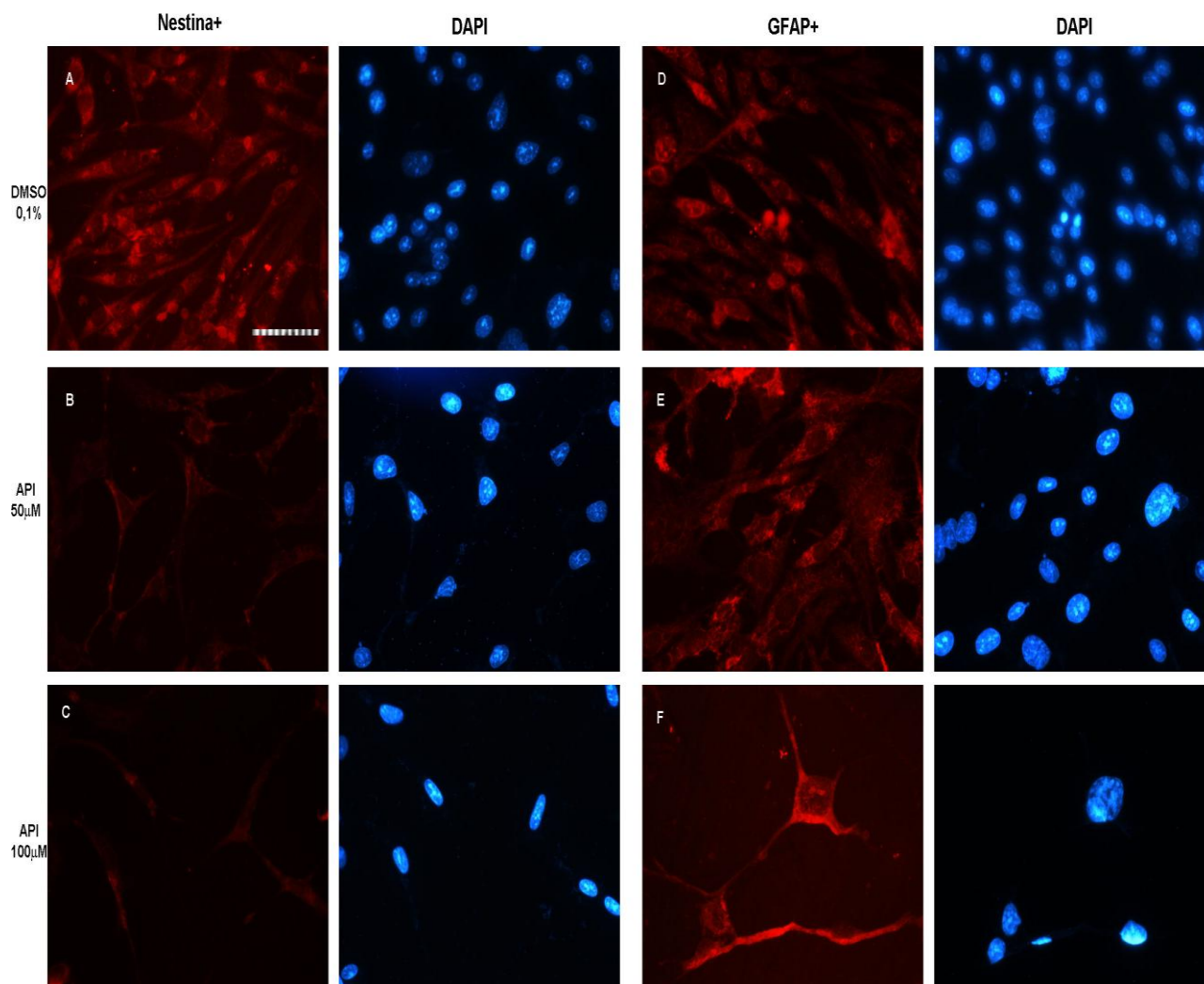


Figura 5- Análise da expressão das proteínas do citoesqueleto nestina e GFAP por imunocitoquímica em células C6 em condições controle (DMSO 0,1%) (A e D) ou 48 h após tratamento com 500 µM (B e E) ou com 100 µM apigenina (C e F); a cromatina celular foi corada com o DAPI. Objetiva 40X, barra = 100 µm

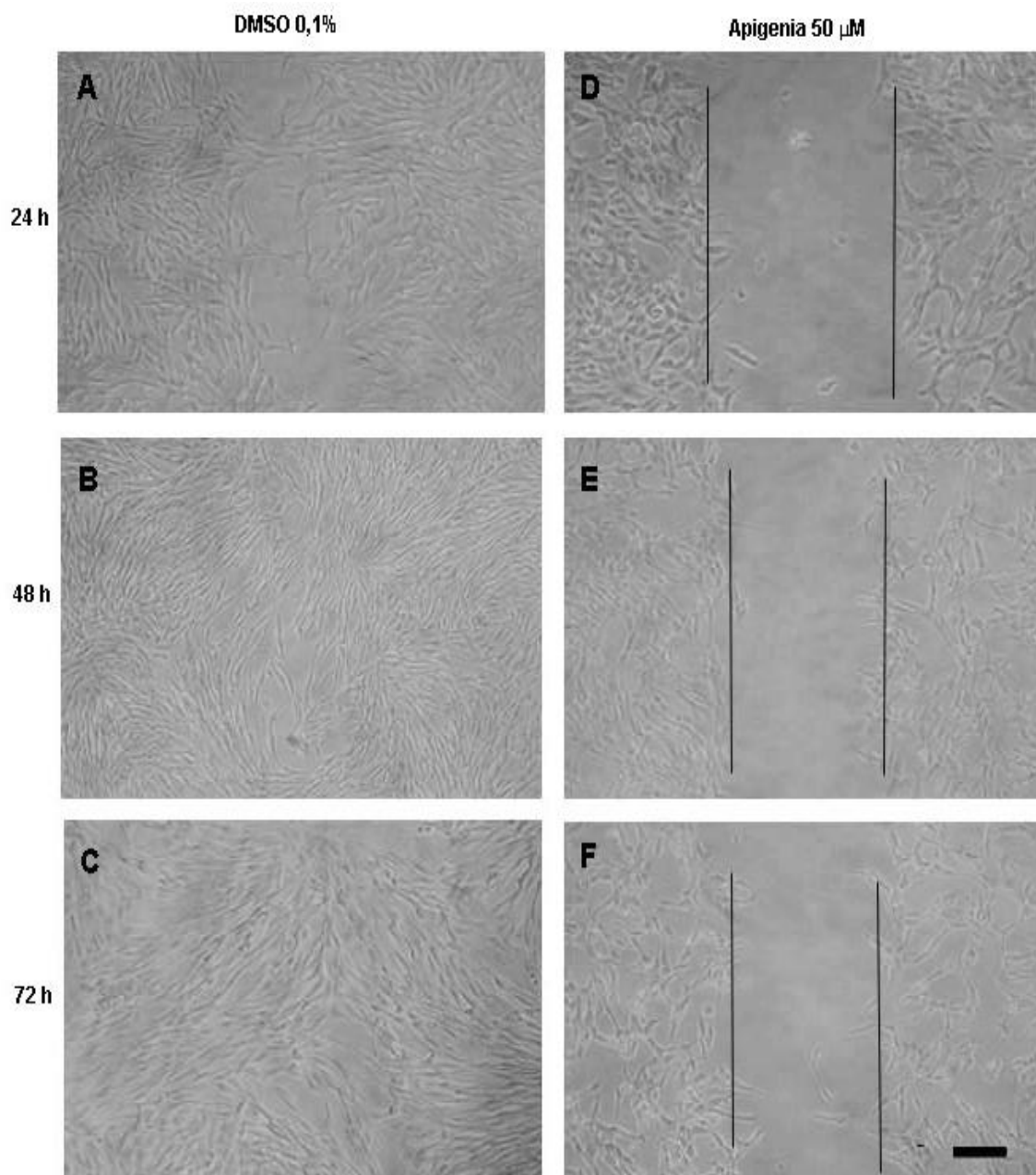


Figura 6- Efeito da apigenina (50 μM) sobre a migração de células de C6 após 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F) de tratamento. Grupo controle (DMSO 0,1%) (A, B, C).

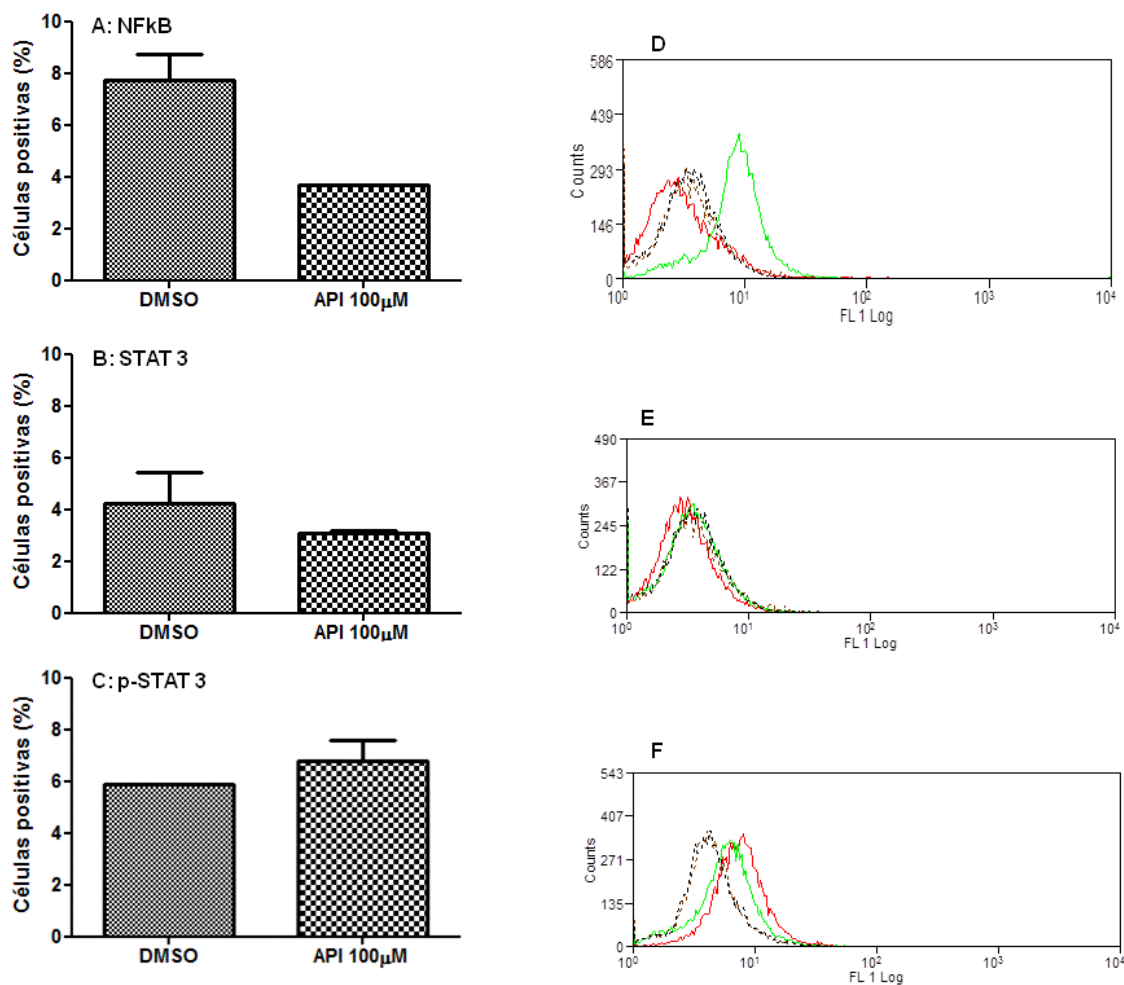


Figura 7- Análise por citometria de fluxo da expressão de NFkB (A), STAT 3 (B) e p-STAT 3 (C) em células C6 em condições controle (DMSO 0,1%) e tratadas com apigenina (100 µM) 4 h após tratamento. Resultados expressos como mediana \pm desvio padrão. Imagens representativas de respectivos histogramas de fluorescência, onde a linha preta indica o controle negativo do teste (CN), a linha verde o DMSO, e a vermelha a apigenina (D, E, F).

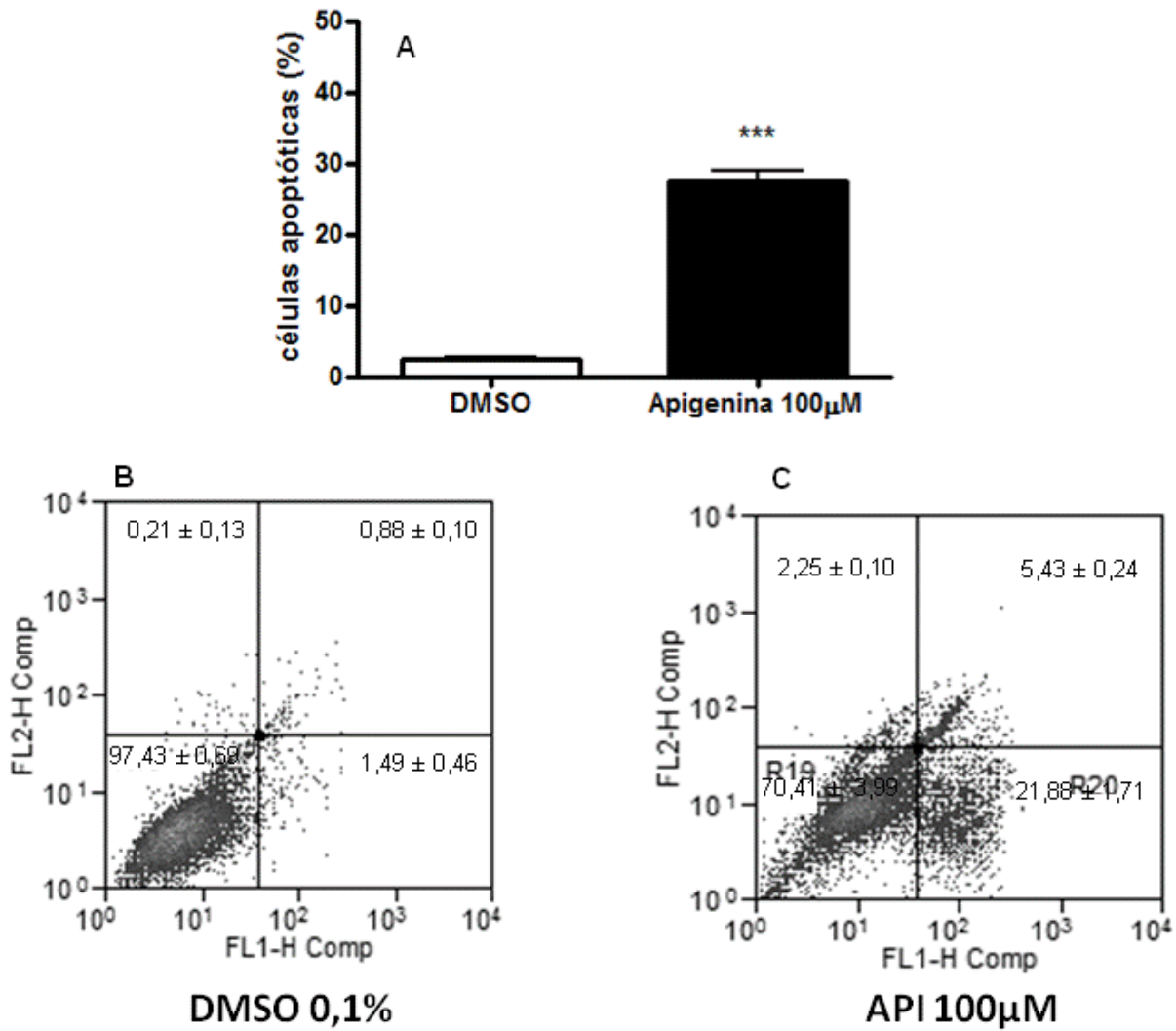


Figura 8: Teste Anexina V em células da linhagem C6 após 72 h de tratamento com apigenina (100 µM) ou DMSO 0,1% (controle). Quantidade de células apoptóticas (A). Histogramas com a distribuição das células representativos dos experimentos, onde o primeiro quadrante inferior esquerdo significa as células vivas, o segundo quadrante inferior direito as células apoptóticas, o quadrante superior direito indica apoptose tardia e o quadrante superior esquerdo as células em necrose (B e C). Resultados expressos em média ± desvio padrão em relação ao DMSO 0,1%. $p < 0.05$.

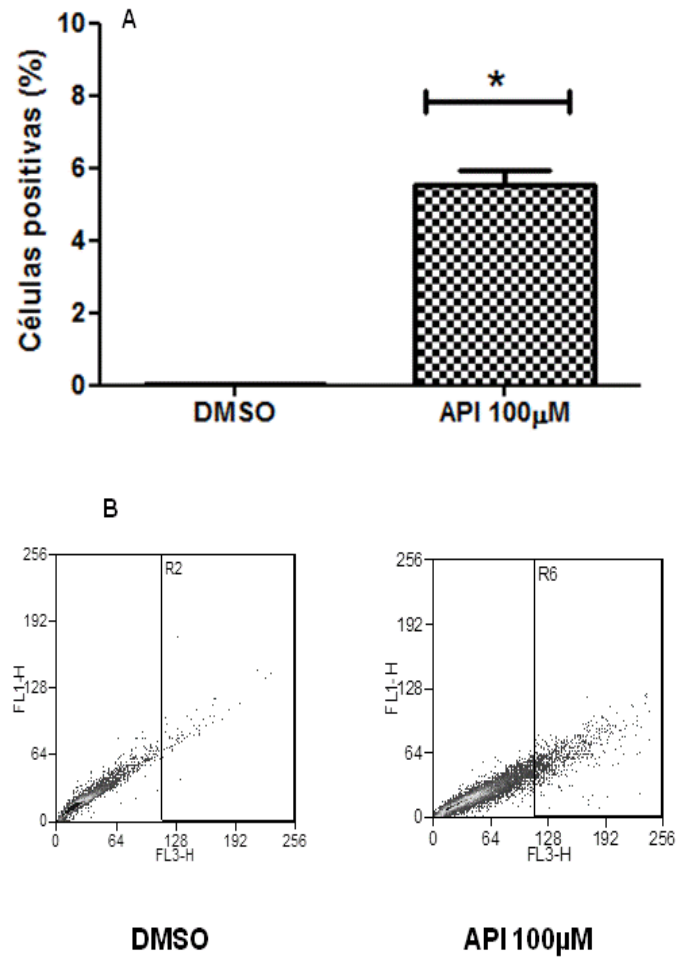


Figura 9- Análise por citometria em fluxo da indução de autofagia pela apigenina (100 μ M) em células C6 após coloração com laranja de acridina em 72 h após tratamento (A). Resultados expressos como média \pm desvio padrão de intensidade de fluorescência em percentual em relação ao controle (DMSO 0,1%). Histograma com a distribuição das células representativas dos experimentos, onde o primeiro quadrante esquerdo significa as células vivas, o segundo quadrante direito as células com vacúolos autofágicos (B). Resultados expressos em média \pm desvio padrão em relação ao DMSO 0,1%. $p < 0.05$.

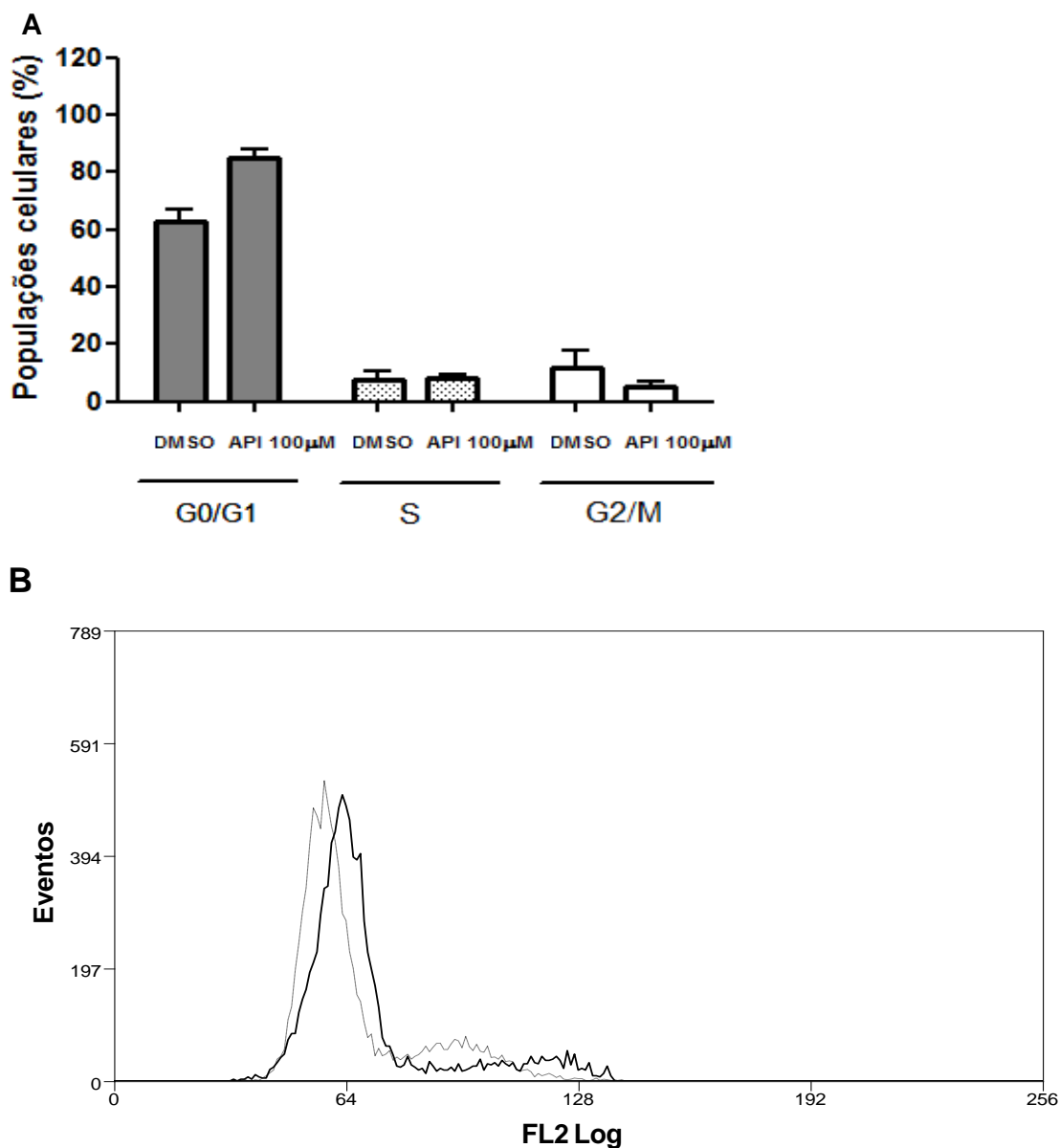


Figura 10- Avaliação por citometria em fluxo da distribuição das células C6 nas fases do ciclo celular 48 h após tratamento com apigenina (100 µM) e marcação com iodeto de propídeo (A). Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Imagem representativa de histograma de fluorescência, indicando a distribuição das células em fase G0, S e G2, onde o controle é representado pelas linhas tracejadas e o tratamento com a linha completa (B).

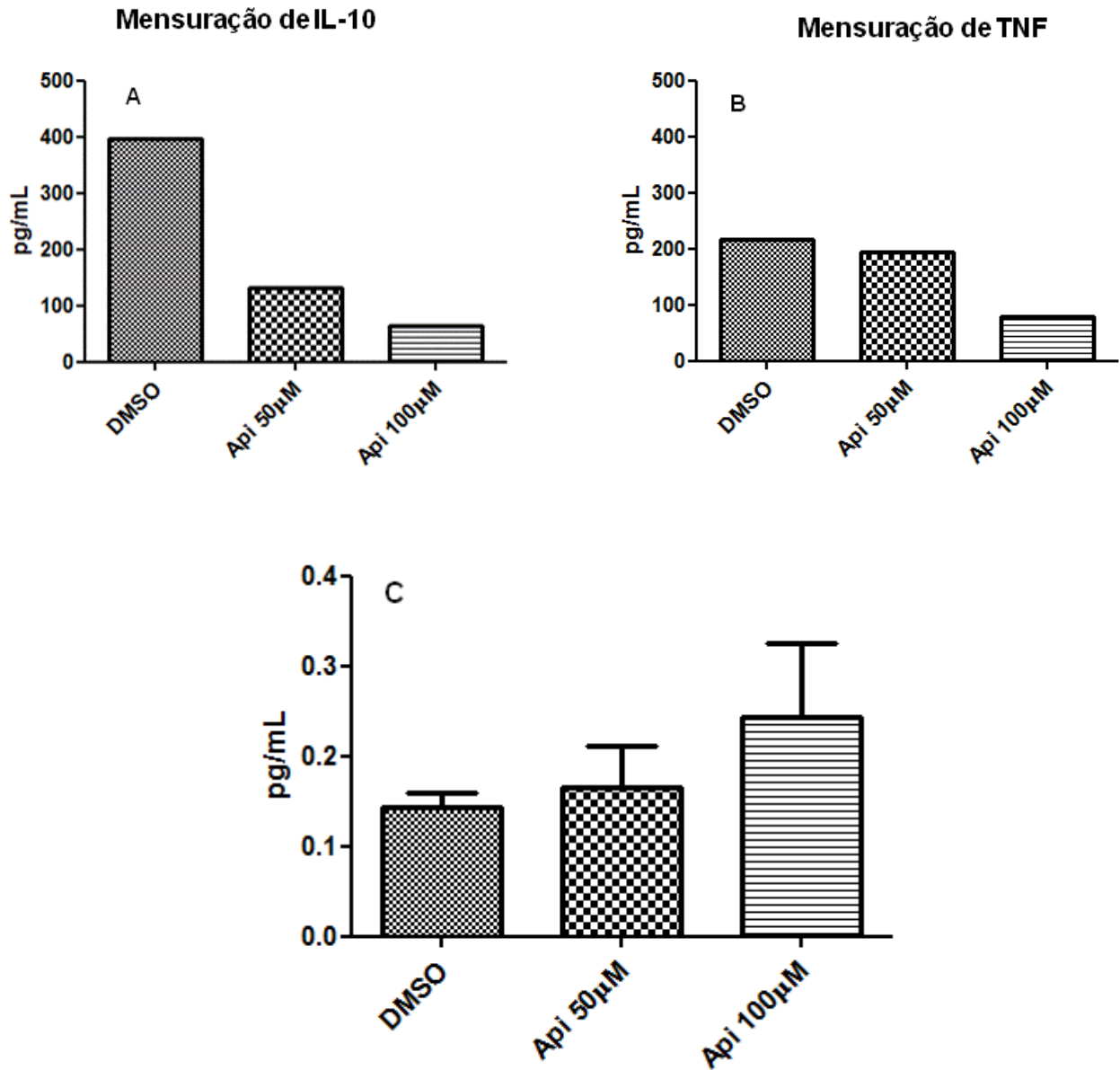


Figura 11- Liberação de fatores tróficos pelas células em condição controle (DMSO 0.1%) e após tratamento com apigenina 50 e 100 μM em culturas de células de C6 por 48h. Dosagem da citocina IL-10 pelo método ELISA sanduiche (A). Dosagem da citocina TNF pelo método ELISA sanduiche (B). Dosagem de nitrito (NaNO_2) baseada na reação de Griess (C). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

4.4. DISCUSSÃO

Diversos estudos *in vitro* com linhagens celulares tumorais são utilizados para investigar a atividade biológica de biocompostos naturais para serem utilizados no tratamento de diversas patologias (YUNES & CALIXTO, 2001). Em nosso estudo, para investigar a atividade antitumoral do flavonoide apigenina extraído das folhas de *Croton betulaster Mull* (BARBOSA, 2003), utilizamos como modelo experimental células C6, linhagem derivada de um glioma murino, caracterizada e estabelecida por Ben et al. (1968) e amplamente adotada para ensaios de desenvolvimento de drogas antitumorais.

Inicialmente, foi determinado pelo teste do MTT se nas concentrações de 1 -100 μM a apigenina inibia a proliferação das células C6 a partir de 24 h de tratamento. A densidade celular apresentou redução significativa dose e tempo dependentes a partir da concentração de 1 μM de apigenina após 72 h de tratamento. Diversos estudos na literatura demonstraram a capacidade antitumoral de flavonoides em concentrações dose dependentes (KIMA et al. 2001; SANTOS et al. 2011). Essa redução da viabilidade celular também foi confirmada pelo teste do azul de tripan, mostrando instabilidade na membrana citoplasmática dessas células na presença da apigenina. Nossos resultados demonstraram que este composto altera a sobrevivência das células C6 e a IC 50 da apigenina foi na grandeza de 32,8 e 22,8 μM durante 48 e 72 h de tratamento, respectivamente. Os compostos quimioterápicos utilizados atualmente como a temozolamida apresentaram uma menor toxicidade para as células tumorais quando comparado a esse flavonoide (WANG et al, 2012).

Nossos estudos revelaram igualmente que o flavonoide apigenina induziu morte celular programada nas células C6, (JELLINGER, 2006; GREENE et al., 2007). Estes resultados demonstram que este flavonoide é capaz de reduzir a proliferação celular das células de C6 através da indução de apoptose, efeito 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 dentre muitos compostos possui

flavonoides, inibiu de forma dose dependente a viabilidade celular em linhagem de glioblastoma humano, além de reduzir o crescimento e induzir a apoptose, apontando este extrato como promissor adjuvante no tratamento de gliomas malignos. Ferguson et al. (2006) relataram que flavonoides presentes na *Vaccinia macrocarpa* (amora) inibiram a proliferação celular, parada do ciclo celular e apoptose em glioblastoma humano da linhagem U87. Branganhol et al. (2006) observaram que o flavonoide quercetina reduziu a proliferação celular na linhagem de glioblastoma humano da linhagem U138MG, através da inibição da viabilidade celular, indução de apoptose e parada do ciclo celular na fase G2. O flavonoide kaempferol foi identificado como indutor de apoptose em células de glioma (SHARMA et al., 2007, SIEGELIN et al., 2008) e em meduloblastoma (LABBE et al., 2009). Outros estudos demonstraram a redução da viabilidade celular do glioblastoma causada pelo flavonoide isoquercitrina (AMADO et al., 2009). Nossos achados corroboram com estes estudos, pois verificamos que o flavonoide apigenina causou um acúmulo das células na fase G0/G1. Associado a este evento foi observado um aumento na proporção de células GFAP positivas com altos níveis de expressão dessa proteína nos filamentos citoplasmáticos, caracterizando o potencial desse flavonoide em induzir uma diferenciação das células tumorais em células com morfologia astrocitária normal.

O efeito inibitório de flavonoides foi igualmente verificado em outros tipos de células tumorais. Roy et al. (2007) demonstraram *in vitro* que o flavonoide baicaleína inibiu a proliferação de células tumorais de colon (HT-29) e câncer de próstata (DU-145). YE et al. (2007) evidenciaram que os flavonoides extraídos de *Leistocolyx operculatus* induziram inibição da atividade metabólica e causaram apoptose em linhagem de câncer de pulmão (SMMC-7721), pâncreas (8898), leucemia crônica (K562), câncer cervical uterino (HeLa) e carcinoma de pulmão (95-D). Riffell et al. 2009 observaram redução da atividade mitótica das células tumorais tratadas com geraldol. O flavonoide kaempferol foi identificado como indutor de apoptose em células de glioma (SHARMA et al., 2007, SIEGELIN et al., 2008). Neste sentido, os nossos resultados apontam o flavonoide apigenina como possível composto a ser utilizado no tratamento dos gliomas.

A formação de vacúolos autofágicos é um mecanismo essencial para a biologia celular. Neste processo, mudanças bioquímicas e morfológicas ocorrem nas células que objetivam a indução da apoptose. Observamos que as células após modulação com o flavonoide apigenina tiveram um aumento da atividade autofágica visualizada pela

marcação com laranja de acridina por citometria de fluxo. Assim a autofagia pode contribuir na indução da apoptose (THOMÉ et al., 2011) e morte das células tumorais. Neste contexto uma droga com esses efeitos apresenta potencial para tratamento antitumoral.

Diversas pesquisas têm sido publicadas atribuindo várias atividades biológicas aos flavonoides extraídos da planta *Cronton betulaster*. Estudo feito por Haidara et al. (2006), sugeriram que o flavonoide casticina pode ser importante na terapia contra câncer, pois este flavonoide inibiu *in vitro* a proliferação de linhagem celular de carcinoma epidermal. Kobayakawa (2004) atribuiu á casticina a parada do ciclo celular na fase G2-M, em linhagem celular de câncer de pulmão e carcinoma de colón, confirmando assim sua importante atividade antitumoral. Além disso, o flavonoide penduletina apresentou atividade antitumoral nas células de câncer de mama (LI et al., 2005).

Estudos publicados 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 que a apigenina inibiu a proliferação de células prostáticas cancerígenas, além de parar o ciclo em G1/S. 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).

Considerando a possibilidade das células tumorais resistirem à ação citotóxica da apigenina, verificamos a possibilidade de indução de diferenciação em células remanescentes nas culturas ainda aderentes após tratamento. A análise por contraste de fase e marcação imunocitoquímica de proteínas do citoesqueleto, marcadoras de estágios de diferenciação revelaram que a apigenina induziu modificações morfológicas. As células C6 aderentes apresentaram contração do corpo celular, assim como, emissão de prolongamentos. Esse efeito foi mais evidente na maior concentração adotada do flavonoide (100 µM). e apareceu associado ao aumento da expressão de GFAP, proteína marcadora de fenótipo astrócitário e à diminuição da expressão de nestina, proteína

marcadora de precursores neurais, alterações estas que sugerem um potencial morfogênico e diferenciador ao flavonoide apigenina. Estudo realizado por Freitas et al. 2009 demonstraram que flavonoides da *Croton betulaster*, inclusive a apigenina, possui um papel diferenciador nas células de glioblastoma da linhagem GL-15. O potencial morfogênico de flavonoides extraídos da *C. betulaster* já foi observado em culturas primárias de neurônios corticais de ratos (SASAKI, 2006; NONES et al., 2010). Células GL-15 também diferenciaram sob ação do flavonoide rutina, extraído de *Dimorphandra mollis*, outra planta do semiárido brasileiro (SANTOS et al., 2010). Dessa forma, os nossos resultados corroboram com os da literatura científica, indicando que os flavonoides apresentam propriedades morfogênicas e indutoras de morte celular programada e em células tumorais.

Neste estudo investigamos o perfil modulador de flavonoides na expressão de proteínas de sinalização envolvidas na resposta inflamatória. Após a modulação com o flavonoide apigenina houve uma redução da proteína NFkB, sem no entanto apresentar alterações significativas nos níveis de STAT3 e de sua forma ativa p-STAT3. Park & Min (2011) demonstraram que o flavonoide quercetina é capaz de diminuir a secreção de NFkB por células de glioma da linhagem U-87. Nesse presente estudo, associada a esta sinalização, houve uma diminuição na secreção de IL-10 desde o tratamento com 50 μ M de apigenina e de TNF com 100 μ M. Outros estudos correlacionaram a IL-10 com STAT3, na qual a ativação de STAT3 regulou positivamente a secreção de IL-10 (YU et al., 2007, WU et al., 2010). Em culturas de células C6 quando moduladas com o flavonoide wogonina tiveram redução na expressão da citocina TNF (KIMA et al., 2001), resultado semelhante aquele do flavonoide apigenina utilizado nesta pesquisa. Somado a este dado, Tanabe et al. (2010) observaram que o aumento da p-STAT3 pode ser acompanhada com a diminuição de TNF. Por outro lado, após a modulação com o flavonoide apigenina houve uma redução da proteína NFkB, proteína que atua como fator de transcrição relacionado à apoptose, também evidenciado neste estudo. Este resultado corrobora com o estudo de Park & Min (2011) que demonstraram que o flavonoide quercetina é capaz de diminuir a expressão de NFkB por células de glioma da linhagem U-87.

As citocinas estão envolvidas na resposta imunológica e na interação entre as células do SNC normais e transformadas como no caso das células de glioma. Neste estudo, foi demonstrado que em condições controle o nível da citocina anti-inflamatória IL-

10, secretada pelas células de glioma C6, é duas vezes maior do que aquele 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 μ M ocorreu uma inversão dos níveis destas citocinas secretas no meio de cultura, indicando uma mudança para o perfil Th1. A IL-10 está envolvida na progressão do tumor, neste sentido, estes compostos 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 apigenina alterou o perfil de secreção de citocinas inflamatórias, esse flavonoide também pode ser considerado como um agente imunomodulador.

Em nossos estudos verificamos que as células de C6 após modulação com o flavonoide apigenina apresentou aumentos da expressão do NO e de células apoptóticas. De maneira semelhante, Soliman & Mazziro 1998 demonstraram que diversas dietas com compostos polifenólicos foram capazes de atenuar a produção de NO em células de glioma C6. Um dos mecanismos essenciais na busca de compostos que possam ser utilizados na terapia antitumoral é a sua capacidade em induzir apoptose nas células tumorais. Neste sentido, um dos mecanismos utilizados pelos flavonoides é o aumento das espécies reativas de oxigênio (KUHAR et al., 2006).

Observamos durante a realização dos procedimentos experimentais que o flavonoide apigenina apresentou atividades biológicas e morfogênicas sobre as células tumorais. Sendo que nas células de C6 foram observadas inibição da proliferação celular e indução de apoptose, propriedades essenciais para a utilização de um fármaco na terapia de gliomas. Este flavonoide possui em sua estrutura quantidades variadas de grupamentos hidroxila e metil. Diversas pesquisas apontam estas características como fatores importantes para as propriedades antitumorais desses compostos.

4.5 Referências do artigo

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. 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.**, 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** n. 161 p.370–371. 1968

BETTINGER, I.; THANOS, S.; PAULUS, W.;..Microglia promote glioma migration. **Acta Neuropathol** n.103 p.351–355 2002

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

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

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., 102f

FREITAS, S.; COSTA, S.; 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 **Phytother. Res.** 2010

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.

HADARA, K.; ZAMIR, L.; SHI, QUI-WEN.; BATIST, G The 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

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

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 antimitotic activity mediated by casticin, a flavonoid isolated from *Vitex Fructus* (*Vitex rotundifolia* Linne fil.) **Cancer Lett.** n.10 v.208 p.59-64. . 2004.

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

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

PARK, M.H & MIN, D.S Quercetin-induced downregulation of phospholipase D1 inhibits proliferation and invasion in U87 glioma cells **Biochemical and Biophysical Research Communications** n.412 p.710–715 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).

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.; 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.; 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

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

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, D.; HOU, L.; WU, Li.; YU, X. Synthesis and Anti-tumor Activities of Novel Oxazinyll 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

WU, X.A.; ZHAO, Y.M.; YU, N.J. A novel analgesic pyrazine derivative from the leaves of *Croton tiglium* L. **J Asian Nat Prod Res** n.93 p.437-41 2007.

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.

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

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

5.0 CONCLUSÃO GERAL

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades é uma prática constante na população brasileira.

O estudo feito com a *Croton betulaster* permitiu analisar a atividade antitumoral do flavonoide apigenina sobre as células de glioma C6. Através desta pesquisa concluímos que este composto possui atividades biológicas essenciais para o controle da proliferação e ativação imunológicas sobre as células tumorais estudadas.

A análise dos resultados experimentais demonstra que a atividade biológica do flavonoide sobre as células é modulada também a partir do tempo de exposição e das concentrações adotadas. O flavonoide apigenina mostrou ser capaz em induzir apoptose e inibir a proliferação celular, diminuir a migração celular, além de induzir mudanças morfológicas sugestivas de células em processo de diferenciação.

Apesar de alguns estudos conferirem a apigenina atividade antitumoral e antiangiogênica, em nossos experimentos verificamos a não toxicidade para as células astrocíticas normais e uma eficácia antitumoral maior do flavonoide ao ser comparado ao quimioterápico mais utilizado, a temozolamida. Estes resultados sugerem que a apigenina possui grande potencial e pode contribuir para o tratamento dos gliomas malignos.

A avaliação de citocinas e proteínas moduladoras da resposta imune é um importante passo para o entendimento da biologia tumoral. Este composto natural mostrou alterar a produção de citocinas nos modelos de células apresentadas neste estudo. 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 e STAT-3.

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 alterou a secreção de citocinas do perfil inflamatório, indicando o potencial terapêutico deste composto.

O desenvolvimento deste estudo nos permite confirmar a hipótese de que o flavonoide apigenina, com base nos resultados aqui obtidos é um promissor fármaco para ser utilizado em associação aos quimioterápicos atuais no combate aos gliomas. Futuramente outras pesquisas, principalmente em modelos *in vivo* poderão ser realizadas para desvendar os caminhos utilizados por estas moléculas no tratamento das neoplasias cerebrais. Sendo este dado enriquecedor para desvendar o mecanismo de ação destas biomoléculas.

Concluimos, enfim, que o flavonoide apigenina, extraído da *Croton betulaster* é um flavonoide que possui princípios ativos que podem ser explorados em futuras atividades terapêuticas contra gliomas malignos.

6.0 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.
- ALVES, C.Q. Flavonoides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostigma gardnerianum* Tull (Leguminosae). Programa de pós graduação em química. Universidade Federal da Bahia. Dissertação (Mestrado). (2007).
- ATHIKOMKULCHAI, S.; PRAWAT, H.; THASANA, N.; RUANGRUNGSI, N.; RUCHIRAWAT. SCOX-1, COX-2 inhibitors and antifungal agents from *Croton hutchinsonianus*. **Chem Pharm Bull**, n.54, v.2, p.262-264, 2006.
- AUER, R.N., DEL MAESTRO, R.F., ANDERSON, R. A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. **Can J Neurol Sci**, n.8, p.325–331, 1981.
- 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
- BARBOSA, P.R.; MARTINS, D.; FASCIO, M.; ROQUE, N.F. Benzoyl-Methylpolyols From *Croton* Species (Euphorbiaceae). **Arkivoc** 95-102 2004

BECKER, K. Innate and adaptive immune responses in CNS disease. **Clin Neurosci Res**, 2006

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

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.

BEUTLER, A.S.; BANCK, M.S.; WEDEKIND, D.; HEDRICH, H.J. Tumor gene therapy made easy : allogeneic major histocompatibility complex in the C6 rat glioma model. **Human Gene Therapy** n.10. p.95-101 1999

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

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.; BEVILAQUA, C.M.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.; MACEDO, I.T.; OLIVEIRA, L.M.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Vet Parasitol** n.30 v.148 p.288-294. 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 v.14 p.966-2971.2006

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

CARSON, W.E., JAKOWATZ, J.G., YAMAMOTO, R., FITZGERALD, T., GUPTA, S., VAYUVEGULA, B., LUCCI, J.A., BECKMAN, M.T., DULKANCHAINUN, S., GRANGER, G.A., JEFFES, E.W. Rat mitogen-stimulated lymphokine-activated T killer cells: Production and effect on C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo* in the brain of Wistar rats. **J Immunotherapy** n.10 p.131-140, 1991

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.

CHEN, S.H., SHINE, H.D., GOODMAN, J.C., GROSSMAN, R.G., WOO, S.L.C. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci** n. 91 p. 3054–3057, 1993

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.

COELHO, P. L.C. Padronização de cirurgia estereotáxica com xenotransplante de gliomas em ratos. [Monografia de conclusão de curso] Universidade Federal da Bahia 76p 2010

COOKSON, M.R.; PENTREATH, V.W. Alteration in the glial fibrillary acid protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxic in vitro**, V.8 (3):351-9, 1994.

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 Robbins**. 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. (2000). 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

DE PAULA, A.C.; GRACIOSO, J.S.; TOMA, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; CARNEIRO, E.M.; SOUZA, B.A .R.. The antiulcer effect of *Croton cajucara Benth* in normoproteic and malnourished rats. **Phytomedicine**. n.15 v.10 p.815-25. 2008

DIEU-NOSJEAN MC, ANTOINE M, DANIEL C, HEUDES D, WISLEZ M, POULOT V, RABBE N, LAURANS L, TARTEUR E, de CL. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. **J Clin Oncol**, n.26 p.4410-4417. 2008.

DI STASI, L.C. ; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR,A.; TIEN,O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS,M.S.Medicinal plants popularly used in the brasilian tropical atlantic florest. **Fitoterapia** v.73 p.69-91.2002

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

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

FOLKINS, C.; MAN, S.; XU, P.; SHAKED, Y.; HICKLIN, D.J.; KERBEL, R.S. (2007). Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors.**Cancer Res** v.67 .n.8 p.3560-3564.

FONTENELLE, R.O.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.; BRILHANTE, R.S.; CORDEIRO, R.A.; NASCIMENTO, N.R.; KERNTOPF, M.R.; SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F. (2008). Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **J Appl Microbiol** v.104 n. 5 p.1383-1390. 2008

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

FRANCO, I.J.; FONTANA,V.L **Ervas & plantas: a medicina dos simples**. 8 edição. Erexim, RS. Edelbra. 208. 2003.

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, 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.

FURNARI,F.B.; FENTON,T.; BACHOO, R.M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J.M.; STEGH, A. HAHN, W.C.; LIGON, K.L.; LOUIS, D.N.; BRENNAN, C.; CHIN, L.; DEPINHO, R.A.; CAVENEE, W.K.; Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev** n. 21 p.2683–2710 2007

GALON J, COSTES A, SANCHEZ-CABO F, KIRILOVSKY A, MLECNIK B, LAGORCE-PAGES C,TOSOLINI M, CAMUS M, BERGER A, WIND P. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, n.313 p.1960-196. 2006.

GIULIETTI, A.M.; QUEIROZ,L.P. **Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica**. Instituto do milênio do semi-arido. 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

GIULIAN, D.; LI, J.; LEARABITTNER, M.; SILVA, M.; AQUEVEQUE, P.; KUFER, J.; JAKUPOVIC, J.; MURILLO, R..Alkaloids And Other Constituents From Croton Chilensis. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química** n.42 p.223-228. 1997

GONZALES, G.F.; VALERIO, L.G. JR. (2006). Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. **Anticancer Agents Med Chem**. v.6 n.5 p.429-44. 2006

GOVINDARAJAN, R.; VIJAYAKUMAR, M.; RAO, C.H.V.; PUSHPANGADAN, P.; ASARE-ANANE, H.; PERSAUD, S.; JONES, P.; HOUGHTON, P.J.(2008). Antidiabetic activity of *Croton klotzianus* in rats and direct stimulation of insulin secretion in-vitro. **J Pharm Pharmacol**. v.60 n.3 p.371-376. 2008

- GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J Microglia: biology and pathology **Acta Neuropathol** n. 119. P. 89-105 2010
- GREENE, L. A.; LIU, D. X.; TROY, C. M.; BISWAS, S. C..Cell cycle molecules define a pathway required for neuron death in development and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 392–401, 2007
- 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
- HADARA, 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.
- 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 determinante 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.
- 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
- HOSTETTMAN, K.; MARSTON, A.J.; WOLFENDER, L.; MAILLARD, M. (1995). Screening for Flavonoids and Related Compounds in Sequent Isolation of Bioactive Compounds. **Akademiai, Kiahó: 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
- JACOBS, V. L.; VALDES ,P. A.; HICKEY , W. F.; LEO, J. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model **ASN NEURO.** v.3 2011
- JANEWAY, JR.C.A.; TRAVERS,P.; WALPORT,M.; SHLOMCHIK,M.J. (2007). **Imunobiologia. O sistema immune na saúde e na doença.** Artmed (6).
- 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^a 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-alpha and IFN-gamma. **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
- 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** n.356 v.15 p.1527-1535. 2007

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

KIM, Y.J.; HWANG, S.Y.; HWANG, J.S.; LEE, J.W.; OH, E.S.; HAN, I.O. C6 Glioma Cell Insoluble Matrix Components Enhance Interferon- γ -stimulated Inducible Nitric-oxide Synthase/Nitric Oxide Production in BV2 Microglial Cells **Journal of Biological Chemistry** n.5 p. 252-2533 2008

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, 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

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

KUO, P.C.; SHEN, Y.C.; YANG, M.L.; WANG, S.H.; THANG, T.D.; DUNG, N.X.; CHIANG, P.C.; LEE, K.H.; LEE, E.J.; WU, T.S. (2007). Crotonkinins A and B and related diterpenoids from *Croton tonkinensis* as anti-inflammatory and antitumor agents. **J Nat Prod** v.70 n.12 p.1906-1909. 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.

LAL, P.G.; GHIRNIKAR, R.S.; ENG, L.F. Astrocyte-astrocytoma cell line interaction in culture. **J. Neuroscience. Res**, v.44, p.216-22, 1996

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 Gnapalii* 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., 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

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

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.

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

MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.; BERTINI, L.M.; OLIVEIRA, C.; RODRIGUES, J.R.; CARDOSO, J.H. . Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against *Aedes aegypti* L. **J Am Mosq Control Assoc.** v.22 p.161-164 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

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

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

PARK,M.H & MIN, D.S Quercetin-induced downregulation of phospholipase D1 inhibits proliferation and invasion in U87 glioma cells **Biochemical and Biophysical Research Communications** n.412 p.710–715 2011

PAULA, A.C.; TOMA, W.; GRACIOSO, J.S.; HIRUMA-LIMA, C.A. CARNEIRO, E.M.; SOUZA, B. A.R.The gastroprotective effect of the essential oil of *Croton cajucara* is different in normal rats than in malnourished rats. **Br J Nutr** n.96 p.310-315.2006

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

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

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.

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

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

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

SABARINATHAN, D., MAHALAKSHMI, P., VANISREE, A. J. Naringenin promotes apoptosis in cerebrally **Mol Cell Biochem** n. 345 p. 215–222 2010

SABARINATHAN, D., MAHALAKSHMI, P., VANISREE, A. J. Naringenin, a flavanone inhibits the proliferation of cerebrally implanted C6 glioma cells in rats. **Chemico-Biological Interactions** n.189 p. 26–36. 2011

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

SANFELIU, C.; CRISOFOL, R.; TORÁN, N.; RODRIGUES-FARRÉ, E.; KIM, S.U. Use of human central nervous system cell cultures in neurotoxicity testing. **Toxico in vitro**, v.13 p.753-9,1999.

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.27p.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.

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 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.; 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

SILVA,M. C. ;CARVALHO,J. C. T. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. **Plantas Medicinai**s: In: J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. Antiinflamatórios.Ribeirão Preto, SP, Tecmed, 480 2004.

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

SINGH, R.P.E AGARWAL, R. Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. **Endocr Relat Cancer** n.13 v.3 p.751-778. 2006.

SOFFIETTI, R.; RUDA, R.; TREVISAN, E..New chemotherapy options for the treatment of malignant Gliomas. **Anticancer Drugs Review** n.18v.6p.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
- TANABE, K.; MATSUSHIMA-NISHIWAKI, R.; YAMAGUCHI, S.; IIDA, H.; DOHI, S.; KOZAWA, O. Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. **Journal of Neuroinflammation** n.7. 2010.
- 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
- TATOR, C.H.; DAY, A.; NG, R.; LIBERMAN, L. Chemotherapy of an Experimental Glioma with Nitrosoureas. **Cancer Research**. v.37, p. 476-481, 1977.
- TSENG, W.C.; LU, K.S.; LEE, W.C.; CHIEN, C.L Redistribution of GFAP and α B-crystallin after thermal stress in C6 glioma cell line. **Journal of Biomedical Science** n.13 p.:681–694 2006
- 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
- 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
- VARGO,M.A.; VOSS, O.H.; POUSTKA, F.; CARDOUNEL, A.A.A.J.; GROTEWOLD, E.; DOSEFF, A.L. (2006).Apigenin-induced-apoptosis is mediated by the activation of PKC delta and caspases in leukemia cell. **Biochem Phammacol** 14 72 (6): 681-692.

- VILHARDT, F. Microglia: phagocyte and glia cell. *Cells in focus .The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* n.37p.17–21. 2005
- XIE, J.; CHEN, Q.Y.; ZHOU, J.Y. Study on mechanism of tea polyphenols in inducing human lung cancer cell apoptosis in vitro. *Zhongguo Zhong;* n.25 v.3 p.244-247. 2005.
- XIAO, D.; TAN, W.; LI, M.; DING, J.. Antiangiogenic potential of 10-hydroxycamptothecin. *Life Sci.* n.69p.1619-1628. 2001
- WANG, D.; HOU, L.; WU, Li.; YU, X. Synthesis and Anti-tumor Activities of Novel Oxaziny 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
- 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.
- WU, X.A.; ZHAO, Y.M.; YU, N.J. A novel analgesic pyrazine derivative from the leaves of *Croton tiglium* L. *J Asian Nat Prod Res* n.9 p.437-341. 2007
- 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
- YOSHIDA, T.; SHIMIZU, K.; USHIO, Y.; HAYAKAWA, T.; MOGAMI, H.; SAKAMOTO, Y. The mechanism and overcoming of resistance in ACNU resistant sublines of C6 and 9L rat glioma. *J Neurooncol* v.5 p. 195–203 1987
- YU, H.;KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D.; Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT 3 in the tumor microenvironment. *Nat. Rev. Immunology* n.7 p41-51 2007
- 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.
- 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