



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**MONA DAS NEVES OLIVEIRA**

**PROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE COMPOSTOS  
SINTÉTICOS “ALCALÓIDES-LIKE” PARA O TRATAMENTO DE  
GLIOMAS MALIGNOS.**

Feira de Santana, BA

2013

**MONA DAS NEVES OLIVEIRA**

**PROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE COMPOSTOS  
SINTÉTICOS “*ALKALÓIDES-LIKE*” PARA O TRATAMENTO DE  
GLIOMAS MALIGNOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sílvia Lima Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Sílvio Desterro Cunha

Feira de Santana, BA

2013

Dedico a este trabalho a todos que acreditam e tem  
à esperança da cura dessa doença.

## **AGRADECIMENTOS**

Numa grande jornada de vida e superando sempre os meus limites eu gostaria de agradecer primeiramente a DEUS, por me fazer viva e acreditar que o impossível pode ser possível.

Em seguida aos meus pais amados Aurora Oliveira e João Gomes que tanto deixaram e deixam suas marcas de ensinamento e continuidade no meu ser e me ensinaram a superar e amar infinitamente a vida, que cuidaram de mim e se dedicou incondicionalmente e sempre foram os ombros que deleitei para chorar, rir e silenciar. Mãe companheira, lutadora e amável sempre te amarei e Pai carinhoso, agradável e inexoravelmente inteligente sempre te amarei. Em seguida gostaria de agradecer ao meu irmão João Pedro por ter me ensinado a dividir os meus pais e por ser um irmão carinhoso e tranquilo.

A família que a gente constrói, meu marido João Paulo que adotou minha filha como dele e a cuida com muito zelo e carinho. A minha lindíssima filha, fonte de inspiração, de continuidade e que me ensina um novo mundo a cada dia, muito obrigado Lana Oliveira por existir, você é fruto de um lindo amor. A seu pai Douglas que a hoje cuida de nós em espírito. Um homem lindo por fora e por dentro, que tinha os olhos cheios de carinho como olhos de meu pai.

As minhas amigas amadas Carolina Peixinho, Gisele Correia que tanto contribuíram com meu bem estar social, que desde infância estudamos juntas e crescemos juntas e torcemos uma pela outra e que apesar de brigarmos, o sentimento de amor é superior. Aos amigos do Laboratório Paulo Lucas companheiro de experimentos, de faculdade, de convívio e de coração. Pois vamos estar sempre juntos em pensamento e alma e saiba que eu amo muito você. Há Huiara Junqueira que juntas começamos aos tropeços na ciência e a entender o que pesquisa e ter você como amiga me orientando foi muito

gratificante. Alessandra Bispo minha amiga de faculdade que corajosamente foi monitora comigo de Bioquímica e resistimos juntas na área de pesquisa, saiba que te admiro muito. Agradecer a Erica Viana por sempre dar valiosas orientações. Diego Madureira e Rute Lima por carinhosamente e pacientemente ensinar estatística com a facilidade de se beber uma água. A Giselle Lima que recentemente entrou no laboratório, mas em pouco tempo teve uma grande parcela de participação nesse trabalho, contribuindo para minha formação como pesquisadora. Agradecer a todos os amigos que me ajudaram nessa jornada profissional e são integrantes do laboratório, Victor, Bruno, Keu, Ana Rita, Sandra, Balbino, Socorro, Tais Adelita, Ravena, Joana, Cleo, Simone, Thyago Cardim, Mayara, Livia, Noelio, Tina, Ezequiel, Alex, Gregory, Luã, Lisandra, Vanessa, Ana Paula, Isis e Pietro.

Aos colegas da pos-graduação Paloma Ribeiro, Priscila e Adriana Fidellis e nossas maravilhosas aulas em Feira de Santana. Sobre Feira de Santana também gostaria de agradecer aos meus parentes dessa terra maravilhosa e em especial minha avó Maria Hercília, uma mulher linda que contagia todos aonde passa com alegria e vontade viver te amo muito vovó. E a minha tia avó Alice e tia Lucinalva que sempre me ajudaram, cuidando de Lana para que eu conseguisse me formar e hoje tornar-me Mestre em Biotecnologia.

E por fim, gostaria de agradecer aos chefes ilustres do laboratório de Neuroquímica, Prof. Fatima Dias Costa e Prof. Ramon, por me orientarem e cuidarem de mim como orientadores. E á minha amada orientadora, uma mulher forte, de muita garra, uma inspiração de trabalho e de luta, dedicada ao extremo a sua profissão de pesquisadora, ela é um verdadeiro furação, de emoções, força e conhecimento. Prof. Silvia Lima Costa muito obrigado por ter me aceitado com Lana no colo, ter me dado esse voto de confiança e ter me acolhido e cuidado como verdadeira Mãe, durante esses 7 anos de

pesquisa. Te admiro muito.!! Ao meu tão ilustre Co-orientador Prof. Silvio Desterro Cunha e nossos tão agradáveis café da tarde, porque café e química tem tudo a ver!!!! Quero agradecer pelos seus valorosos ensinamentos e que tão paciente me orientou na maravilhosa ciência da química orgânica.

Aos órgãos de fomento FAPESB, CAPES e CNPq e ao ICS-UFBA pela estrutura, o LABIMUNO por apoio em equipamentos.

## Prospecção Farmacológica de Compostos Sintéticos “*alkaloids-like*” para o Tratamento de Gliomas Malignos.

### RESUMO

Glioblastomas (GBMs) são os tumores primários mais comuns e agressivos do SNC. A sobrevida dos pacientes com esse diagnóstico continua muito baixa, tendo prognóstico ruim mesmo após terapia cirúrgica seguida de radio e quimioterapia. No presente trabalho, foi realizada a prospecção de 24 moléculas de síntese, *alkaloids-like*, para determinação de seus efeitos sobre a viabilidade de células quimioresistentes de glioblastoma humano (GL-15 e U251) e murina (C6). Entre os compostos testados á (100µM), RLB87 foi o mais citotóxico para células transformadas, inibindo a viabilidade em 75,0%, 97,2%, 76,6% da GL-15, U251 e C6, respectivamente e o mesmo não apresentou toxicidade para células gliais normais. Observou-se, que o RLB87 promoveu apoptose 24 e 72 h após o tratamento de forma tempo-dependente. O RLB87 igualmente inibiu a proliferação celular com acúmulo na fase G0/G1 do ciclo celular após 24 h. A migração das células de glioma foi também inibida após tratamento com RLB87. Adicionalmente 4 análogos do RLB87 foram também avaliados, elucidando aspectos importantes na estrutura química, requeridos para sua atividade, que possuem correlação positiva com regioisomeria das fenilas, presença da função éster e lipofilicidade. O RLB87 é apresentado como promissor agente antineoplásico assim como um protótipo para novos agentes terapêuticos para o tratamento de gliomas malignos e recidivados.

**PALAVRA-CHAVES:** Gliomas malignos, *Alkaloids-like*, citotoxicidade, apoptose.

## Screening of synthetic *alkaloids-like* for malignant glioma treatment

### Abstract

Glioblastomas (GBMs) are the most common and aggressive primary tumors of the CNS. The survival of patients with this diagnosis remains very low, with poor prognosis even after surgical therapy associated with radiotherapy and chemotherapy. The present work carried out a screening for 24 synthetic “alkaloid-like” to determine their effects on cell viability of quimioresistentes human (GI-15 and U251) glioblastoma cells and murine (C6) glioma cells. Among the alkaloids tested (100 $\mu$ M) RLB87 was the most cytotoxic for transformed cells, inhibiting the viability in 75.0% 97.2% 76.6% of GL-15, U251 and C6 cells, respectively, after 72 h exposure, and it did not show toxicity to normal glial cells. It was also observed that RLB87 promoted apoptosis, 24 and 72 h after treatment, in a time-dependent manner. Moreover RLB87 also inhibited cell migration and proliferation with cells arrest at G0/G1 phase, since 24 h after treatment. Additionally, the cytotoxicity of four RLB87 analogues was tested in view to elucidate important aspects in chemical structure, required for its activity. We observed positive correlation between cytotoxic effect and isomeric of phenyl functions, with ester function and also lipophilicity. These finding suggest the “alkaloid-like” RLB87 as a promising anticancer agent as well as a prototype for new agents for treatment of malignant and recurrent gliomas.

Key word: glioblastoma, alkaloids-like, cytotoxicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc- Adenina monofosfato cíclica

BCNU- *1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea*

CPN- Células progenitoras Neurais

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético

GBM – Glioblastoma multiforme

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial

HIV/AIDS - Vírus da Imunodeficiência Humano

HGF – Fator crescimento hepático

IC50- Concentração inibitória de 50 %

INCA – Instituto nacional do Câncer

INPI – Instituto nacional de Propriedade Industrial

IP – Iodeto de propídeo

MNU – *Methylnitrosourea*

MSS – Meio Sem Soro

MCS – Meio Com Soro

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NEQ – Novas Entidades Químicas

OMS – Organização mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

PKC – *Protein Kinase C*

PMA – Ester de forbol

PTEN – *Phosphatase and tensin homolog Protein*

P53 – Proteína de 53 KDa

P16 - Proteína de 16 KDa

P14 - Proteína de 14 KDa

P21-. Proteína de 21 KDa

Rb- Proteína retinoblastoma

RNA – *Ribonucléico Acid*

RNAse – *Ribonucléico Acid enzyme*

SFB – Soro Fetal Bovino

SEER – *Surviellance Epidemiology End Result*

SNC – Sistema Nervoso Central

TMZ – Temozolomida

TGF- $\beta$  – *Transforming Growth Factor beta*

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

ZSV – Zona Sub-Ventricula

WHO - Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Origem do tumor: hipótese das células tronco .....	<b>20</b>
<b>Figura 2</b> - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012	<b>22</b>
<b>Figura. 3</b> - Sobrevida media de pacientes com GBM mostrando que a melhora no tratamento pós-operatório aumentou a taxa de sobrevivência em alguns meses	<b>22</b>
<b>Figura.4</b> - Terapia padrão para o Glioblastoma (GBM).	<b>25</b>
<b>Figura 5</b> - Alkaloid naturais antineoplasicos e seu mecanismos de ação	<b>29</b>
<b>Figura 6</b> - Estrura base sistema conjugado N-C=C-C=O de enaminonas	<b>31</b>
<b>Figura 7</b> - Depositos de Patentes na EPO Referentes a Glioma ao longo do tempo	<b>33</b>
<b>Figura 8</b> -Depositos de Patentes no INPI Referentes a Medicamento para o câncer ao longo do tempo	<b>34</b>
<b>Figura 9</b> - Gráfico do perfil de medicamentos estudados em fase III	<b>35</b>
<b>Figura 10</b> - Triagem do efeito citotóxico dos alcalóides sintéticos na linhagem de glioblastoma humano (GL-15) através do teste do MTT. Células foram analisadas após 72 horas de exposição ao veiculo (0.1% DMSO) e <i>alkaloids-like</i> a 100 µM	<b>51</b>
<b>Figura 11</b> - Triagem do efeito citotóxico dos alcalóides sintéticos na linhagem de glioblastoma humano (U251) através do teste do MTT. Células foram analisadas após 72 horas de exposição ao veiculo (0.1% DMSO) e <i>alkaloids-like</i> a 100 µM.	<b>51</b>
<b>Figura 12</b> - Triagem do efeito citotóxico dos alcalóides sintéticos na linhagem de glioma murino (C6) através do teste do MTT. Células foram analisadas após 72 horas de exposição ao veiculo (0.1% DMSO) e <i>alkaloids-like</i> a 100 µM	<b>52</b>
<b>Figura 13</b> Triagem do efeito citotóxico dos alcalóides sintéticos na cultura primaria de Glia através do teste do MTT. Células foram analisadas após 72 horas de exposição ao veiculo (0.1% DMSO) e <i>alkaloids-like</i> a 100 µM	<b>52</b>
<b>Figura14</b> Estruturas dos <i>alkaloids like</i> utilizados nas prospecções das linhagens tumorais e cultura de células normais da glia.	<b>53</b>
<b>Figura 15 (A)</b> Análise da viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15 e U251), glioma murino (C6) e astrócitos normais de rato após tratamento com RLB87 em concentrações crescentes após 72 h de exposição	<b>55</b>
<b>Figura 15 (B)</b> Curva dose resposta do RLB87 nas linhagens tumorais (GL-15, U251 e C6) e Cultura primaria de Glia após 72 h de exposição	<b>56</b>
<b>Figura 16</b> Análise da viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15 e U251) e glioma murino (C6) após tratamento com TMZ em concentrações crescentes após 72 h de exposição	<b>57</b>
<b>Figura 17</b> - Fotomicrografia da linhagem GL-15 ao longo do tempo	<b>59</b>

<b>Figura 18</b> - Fotomicrografia da linhagem U251 ao longo do tempo	<b>60</b>
<b>Figura 19</b> - Fotomicrografia da linhagem C6 ao longo do tempo	<b>61</b>
<b>Figura 20</b> - Fotomicrografia da cultura primaria de astrocito/micróglia de ratos wistar ao longo do tempo	<b>62</b>
<b>Figura 21</b> - Fotomicrografia das linhagens tumorais, em (A) U251, (B) C6 e (C) GL-15.	<b>63</b>
<b>Figura 22</b> -Análise por citometria de fluxo da morte celular provocada pelo <i>alkaloid-like</i> RLB87 após 72 horas de exposição nas linhagens tumorais (GL-15, U251 e C6) e cultura primaria de Glia	<b>65</b>
<b>Figura 23</b> Análise por citometria de fluxo da morte celular provocada pelo <i>alkaloid-like</i> RLB87 após 12 e 24 horas de exposição na linhagem tumoral	<b>66</b>
<b>Figura 24</b> Análise da fragmentação da cromatina nuclear na linhagem C6 após 72 horas de tratamento com RLB87	<b>68</b>
<b>Figura 25</b> Estudo da distribuição das células nas fases do ciclo celular após 24 h tratamento, com diferentes concentrações do <i>alkaloid-like</i> RLB87	<b>70</b>
<b>Figura 26.</b> Análise do efeito do SFB na viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15 e U251) e murinho (C6) após tratamento com RLB87 em concentrações (50-100µM) após 72 h de exposição	<b>72</b>
<b>Figura 27</b> - Fotomicrografia da cultura após 72 h de exposição ao Alkaloid RLB87 nas duas condições MSS- Meio Sem Soro; MCS- Meio Com Soro das linhagens U251 e C6	<b>73</b>
<b>Figura 28</b> - Análise da atividade antimigratoria do alkaloid-like RLB87 a 100µM ao longo de 48 horas de tratamento	<b>75</b>
<b>Figura 29</b> –Estrutura dos análogos do RLB87	<b>77</b>
<b>Figura 30</b> -Análise da viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15), pós-tratamento com análogos do <i>alkaloid-like</i> RLB87 em concentrações crescentes e dois tempos de exposição (24 e 72 h)	<b>77</b>
<b>Figura 31</b> – Análise do efeito dose-resposta após 72 h de exposição aos análogos do RLB87 e TMZ.	<b>78</b>
<b>Figura 32</b> -Análise da correlação da citotoxicidade a 100µM por 72 horas de tratamento com o LogP teórico dos alkaloids-likes nas linhagens tumorais humanas (GL-15 e U251) e murina (C6) e em células da glia.	<b>80</b>
<b>Figura 33</b> - Análise da correlação do 1/LogP com a CI50% após 72 horas de tratamento com RLB87 e os análogos 3, 4, 6 e 7 na linhagem tumoral humanas (GL-15).	<b>82</b>
<b>Figura 34</b> -Análise de estrutura, relação e atividade.	<b>82</b>

## SUMARIO

	<b>RESUMO</b>	<b>5</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
	Lista de Abreviaturas	<b>7</b>
	Lista de Figuras	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>16</b>
	2.1 Glioblastoma: Origem, localização e características	<b>16</b>
	2.2 Epidemiologia	<b>19</b>
	2.3 Estratégias terapêuticas	<b>21</b>
	2.4 Desenvolvimento de Fármacos.	<b>24</b>
	2.4.1 Alkaloids naturais e análogos.	<b>24</b>
	2.4.2 Fármacos sintéticos	<b>27</b>
	2.4.3 Síntese química de <i>alkaloids-like</i> derivados de enaminonas.	<b>29</b>
	2.4.4 Patentes relacionadas a gliomas e desenvolvimento de fármacos.	<b>30</b>
	2.5 Cultura de Células como modelo de estudo farmacológico	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
	3.1 Objetivos específicos.	
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	Metodologia detalhada	<b>39</b>
	4.1.1. <i>Alkaloids-like</i>	<b>39</b>
	4.1.2. Cultura de células tumorais	<b>40</b>
	4.1.3. Cultura primaria de Glia	<b>40</b>
	4.1.4. Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT	<b>41</b>
	4.1.5 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT em Privação de SFB	<b>42</b>
	4.1.6. Microscopia de contraste de fase	<b>43</b>
	4.1.7. Avaliação do tipo de morte celular	<b>43</b>
	4.1.8. Visualização de condensação e/ou fragmentação nuclear	<b>44</b>
	4.1.9.. Análise do Ciclo celular	<b>44</b>
	4.1.10. Ensaio de invasão	<b>45</b>
	4.1.11. Coloração de Rosenfeld.	<b>46</b>

	4.1.12. Cálculo do valor teórico de LogP	46
	4.1.13. Análise estatística dos dados.	46
5	<b>RESULTADOS</b>	48
6	<b>DISCUSSÃO</b>	82
7	<b>CONCLUSÃO</b>	88
8	<b>PERSPECTIVAS</b>	89
	<b>REFERÊNCIAS</b>	90
	<b>ANEXOS</b>	102

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do câncer resulta de mutações em um ou mais, dos vastos arranjos de genes, que regulam o crescimento celular e a morte celular programada. O que distingue as mutações oncogênicas das outras, é que por sua natureza elas permitem que uma célula mutante se desenvolva em uma doença que ameaça a vida (THOMPSON, 2008). Dentre os tipos de canceres existentes, encontramos os tumores gliais, seu tecido de origem é o Sistema Nervoso Central (SNC) e sua classificação é dada pelos tipos celulares, grau de malignidade e localização e o mesmo tem sido comparável a outros canceres incuráveis (TRAN e ROSENTHAL, 2010; LOUIS et. al., 2007)

Tumores primários cerebrais correspondem a 1,4% de todos os cânceres e são responsáveis por 2,4% das mortes por câncer nos Estados Unidos. Anualmente, surgem aproximadamente 20 mil novos casos de gliomas (7,4 casos a cada 100 mil habitantes), dos quais mais de 15 mil são malignos, com uma taxa de mortalidade anual anormalmente elevada de 12.500 casos. Entre os gliomas astrocíticos de alto grau, o tipo mais comum e de maior agressividade é o Glioblastoma Multiforme (GBM). Os GBMs correspondem a mais de 50% de todos os gliomas e aproximadamente 80% dos gliomas malignos, acometendo cerca de 22.000 adultos em 2010 nos Estados Unidos (American Cancer Society, 2010). No Brasil, o número de casos é crescente, passando de 2,24/100 mil habitantes em 1970 para 11,52 /100.000 habitantes em 2010 ([www.cbtrus.org](http://www.cbtrus.org)). Outro dado importante se refere à participação das mortes por glioma dentre as mortes por câncer em geral, o óbito por câncer de cérebro correspondeu a 4,4% do total de mortes no ano de 2003 por câncer no Brasil (MONTEIRO, 2003).

Tem se estudado diversos compostos para o tratamento de gliomas. Entre estes compostos estão quimioterápicos eficientes em outros tipos de tumores sólidos, como a cisplatina, a carmustina e a lomustina, bem como moduladores do sistema imune e do metabolismo celular, como o interferon e a dexametasona (KIM, et al., 2004; NATSUME, et al., 2005; KAUP, et al., 2001). Porém, nenhum destes compostos se mostrou eficiente em aumentar a sobrevida e melhorar o prognóstico dos pacientes e, atualmente, nenhum deles é utilizado como terapia primária em GBMs. Além disso, diferentemente de outros tipos tumorais, o prognóstico de pacientes com GBM pouco se alterou nos últimos anos. (TRAN e ROSENTHAL, 2010) O quimioterápico de escolha para o tratamento dos GBMs, a TMZ e a Carmustina (ou BCNU), clinicamente aprovados aumentam a sobrevida média em apenas 2,4 meses (STUPP et. al., 2009). Assim, os GBMs são comumente incluídos por oncologistas entre os tipos tumorais de mais difícil tratamento, permanecendo um desafio para a oncoterapia (TRAN e ROSENTHAL, 2010).

Todos esses dados corroboram para uma reflexão da urgente necessidade em desenvolver tratamentos mais efetivos para esse letal tipo de câncer cerebral. Desenvolvimento de novas moléculas e estudo do seu potencial farmacológico é um passo inicial na descoberta de novas terapias. A síntese de moléculas inspiradas em grupos farmacofóricos de produtos naturais é uma forma racional de síntese de fármacos e inicial numa triagem farmacológica. Os alcaloides são compostos naturais que possuem classes de importância na terapêutica do câncer. A síntese de *alkaloids-like* a partir de enaminonas é rota promissora, devido estarem relacionados com uma variedade de reações em que estes compostos podem ser empregados, principalmente na síntese de heterocíclicos dos mais variados tipos (FERRAZ e GONÇALO, 2004). E quando observamos a estrutura dos fármacos empregados na terapêutica, constata-se

que 62% deles são heterocíclicos, dentre os quais 95% apresentam-se nitrogenados (MENEGATTI et.al, 2001) e essas características estruturais também são encontradas nos alcaloides, podendo assim as enaminonas constituir-se como um precursor para síntese de *alkaloids-like*.

Neste contexto, este estudo investigou *in vitro* o possível potencial antitumoral, de 28 *alkaloids-like*, moléculas sintéticas derivadas de enaminonas, sobre células da linhagem de glioblastomas multiforme humano (GL-15 e U251) e glioma murinho (C6), sendo igualmente avaliada a citotoxicidade sobre células gliais normais do SNC de ratos Wistar, para caracterização de possível seletividade. Investigamos seus efeitos em termos de inibição do crescimento, tipo de morte celular, regulação do ciclo celular, migração e relação, estrutura química e atividade, na busca de novas drogas terapêuticas que atuem mais eficazmente contra gliomas malignos.



## 2. Revisão de Literatura

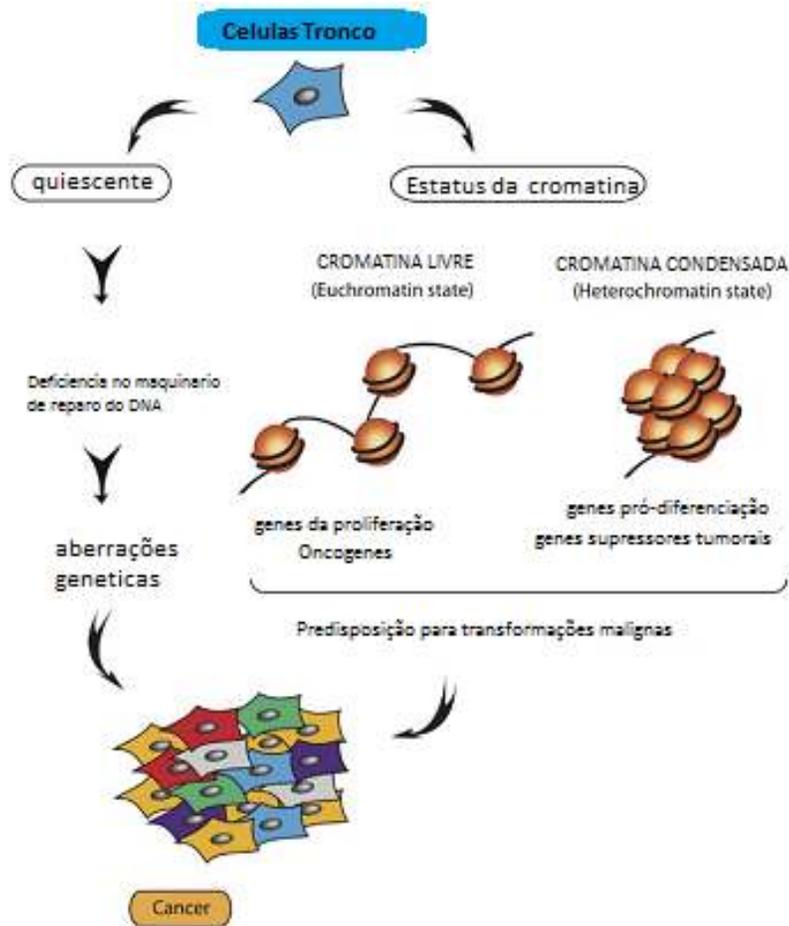
### 2.1 Glioblastoma: *Origem, localização e características.*

Tradicionalmente, acreditava-se que o cérebro humano adulto não continha precursores celulares e que tumores cerebrais derivavam de células parenquimatosas adultas (SANAI *et al.*, 2005). O córtex cerebral dos mamíferos é originado a partir da proliferação de uma única camada de células neuroepiteliais. Estas células progenitoras neurais (CPN) alinhadas no ventrículo formam a zona ventricular. As CPN proliferam na zona ventricular e sequencialmente dão origens aos três maiores tipos celulares do encéfalo: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (SAUVAGEOT & STILES, 2002).

Para explicar o surgimento de tumores cerebrais, as hipóteses residiam na sua origem a partir de células gliais maduras desdiferenciadas, células-tronco neurais ou de progenitores gliais (DUCRAY, 2008). Atualmente acredita-se que células-tronco detectadas no cérebro humano adulto pode ser a origem dos tumores cerebrais. Denominadas de células-tronco do câncer, elas já foram identificadas na leucemia e a sua evidencia em tumores sólidos ainda era incerta, mas a alta malignidade associada ao rápido crescimento do GBM suporta a hipótese da existência das células-tronco do câncer (SINGH *et al.*, 2004). Um grande número de Publicações recentes tem trazido novas informações na potencial origem dos tumores cerebrais. Jacques et.al 2010 mostrou que a deleção nos genes Rb, p53 e ou PTEN em astrócitos da região da Zona Sub-Ventricula (ZSV) resultam em diferentes fenótipos tumorais mas a deleção desse genes em astrócitos corticais maduros não resultam em formação de tumor. Mais especificamente modelos genéticos com expressão de alvos em tipos celulares específicos da (ZSV) talvez leve a novas compreensões da formação do tumor cerebral num futuro próximo (SIEBZEHRUBL, 2011).

As células-tronco, assim como as células-tronco neurais estão participando do desenvolvimento dos órgãos durante a embriogênese, são essenciais para a homeostasia de tecido adulto e tem a capacidade única de regeneração, tornando-os não só uma componente central no estudo da biologia do desenvolvimento e medicina regenerativa, mas também na biologia do câncer, isso se conclui pelo fato de que são reguladas por mecanismos similares que estão ativados em numerosos tumores cerebrais (QUINONES-HINOJOSA E CHAICHANA, 2007; REYA et al, 2001, ZHENG et al, 2008) e à sua longa vida lhes permite acumular mudanças epigenéticas e mutações, tornando-as uma ideal candidata a fomentar a evolução da malignidade tumoral (Figura 1.) (SIEBZEHRUBL, et.al. 2011).

Essas populações de células tronco tumorais são comumente encontradas no mais maligno dos gliomas, o GBM, o mesmo ocorre mais frequentemente na substancia branca subcortical dos hemisférios cerebrais do que em outras regiões. Sendo a maioria intraparenquimatosa e raramente se estende superficialmente em contato com as meninges. São invasivos e apesar do crescimento infiltrativo geralmente não invadem o espaço subaracnóide e raramente realizam metástase para o fluido cérebro-espinhal (LOUIS *et al.*, 2007). Sinais e sintomas correspondem a hipertensão intracraniana com enxaquecas e náuseas. Um terço dos pacientes apresentam convulsões epiléticas. A necrose central da massa tumoral é marcante, ocupando cerca de 80% da mesma (OHGAKI, 2005). Esses aspectos são consequências do rápido crescimento sem oxigenação adequada pela vasculatura pré-existente.



**Figura 1. Origem do tumor: hipótese das células tronco.** Esquema ilustrativo da origem das células tumorais por ação a mutações genéticas e estado de condensação da cromatina em células tronco, predispondo a formação de células cancerígenas .(Fonte: In SIEBZEHRUBL, et.al. 2011modificado)

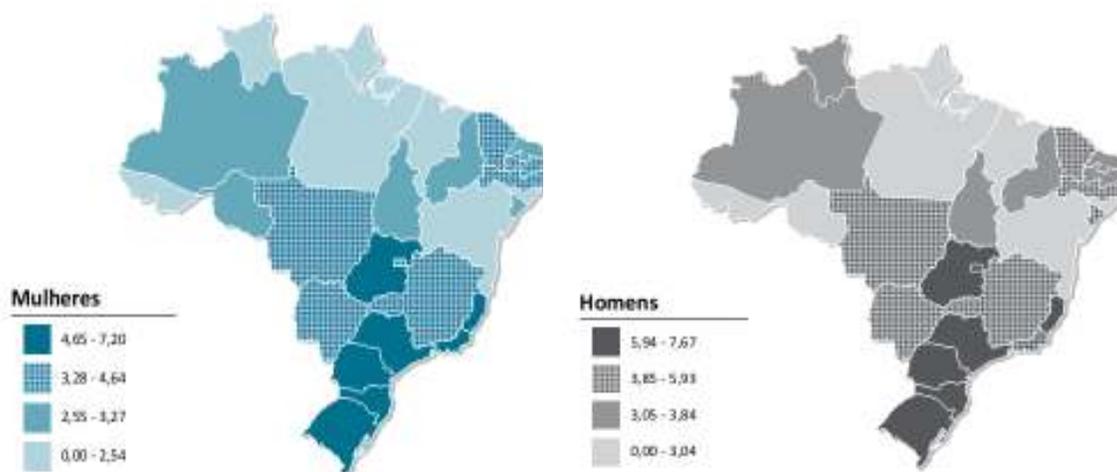
Alterações genéticas associadas com a regulação desordenada da proliferação celular, apoptose (morte programada da célula), senescência, migração e comunicação célula-célula compreendem distintas cascatas moleculares com alterações frequentes nos casos de GBM. Neste âmbito, o fator de transcrição p53 tem um papel muito importante. Considerado o guardião do genoma, protege a célula de transformações malignas pela indução da parada do ciclo celular, senescência ou apoptose como resposta ao estresse intrínseco ou extrínseco, dano ao DNA, inflamação e hipóxia.

Alterações na cascata de p53 aumentam a instabilidade genética e pode conduzir a transformações malignas (MALKIN, 2001). Supressão da resposta imunológica antitumoral, neovascularização, resistência a estímulos apoptóticos, proliferação celular excessiva e capacidade de invasão de tecidos são algumas das características abordadas nas pesquisas no tema por contribuírem para o fenótipo maligno dos gliomas (DE OLIVEIRA et al., 2009).

## ***2.2 Epidemiologia***

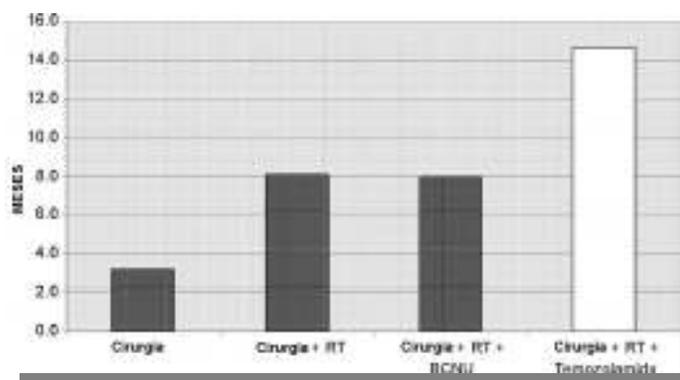
De acordo com WHO, a cada ano 7 milhões de pessoas morrem de câncer (7,6 milhões somente em 2005) e 11 milhões de novos casos são diagnosticado no mundo. A morte por câncer é projetado em crescente continuo com estimativa de 9 milhões de casos em 2015 e 11,4 milhões em 2030 esses números revelam que o câncer atinge mais que HIV/AIDS, malária e tuberculose juntos: 12.5% de todas as mortes a cada ano

Foram estimados nos Estados Unidos o diagnostico de 22.000 adultos com tumor primário do cérebro e cordão espinal em 2010 pela American Cancer Society. Sendo relatado que aproximadamente 13.140 pessoas já morreram desse tumor. No Brasil a incidência total de tumores cerebrais benignos e malignos é 18,71 por 100.000 habitantes/ano; 11.52 por 100.000 habitantes/ano respectivamente (CBTRUS, 2010). A estimativa de casos para é 420 por 100.000 habitantes com 2,8% de taxa bruta para homens e 320 casos por 100.000 habitantes com 2,5% de taxa bruta para mulheres (INCA, 2012). Na figura 2 podemos ver uma representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012 (INCA,2012).



**Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres, estimadas para o ano de 2012** Fonte: extraído do [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)

Pesquisadores revisaram atualmente 38.453 casos de tumor cerebrais malignos e publicaram no Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) os registros de 1973 até 2001. Infelizmente, não foi observado estatisticamente, um aumento na taxa de sobrevivência de paciente com GBM depois de 1980 (DEORAH et al., 2006) e tem permanecido atualmente com uma taxa de sobrevivência 2, 3, 4 e 5 anos de 27.3%, 16.7%, 12.9% e 9.8% respectivamente, (STUPP et. al. 2005, MIRIMANOFF et. al. 2007 e STUPP et. al. 2009) o que o torna comparável com outros tumores malignos incuráveis (Figura 3)



**Figura. 3. Sobrevida média de pacientes com GBM mostrando que a melhora no tratamento pós-operatório aumentou a taxa de sobrevivência em alguns meses.** RT = radioterapia BCNU = 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. Fonte: de TRAN & ROSENTHAL, 2010, Modificado.

### **2.3 Estratégias terapêuticas.**

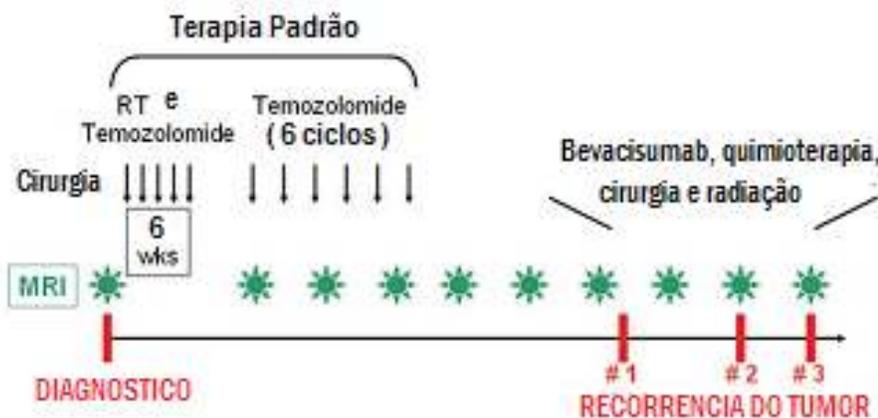
Os medicamentos antineoplásicos são agrupados em várias categorias entre elas, agentes alquilantes, antimetabólitos, alcalóides vegetais, antibióticos antitumorais, enzimas, hormônios e modificadores da resposta biológica. Frequentemente, dois ou mais medicamentos são usados em combinação. A base racional da quimioterapia combinada é utilizar medicamentos que atuam em diferentes partes dos processos metabólicos da célula, aumentando dessa forma a probabilidade de destruição de uma maior quantidade de células cancerosas. (REARDON e WEN, 2006).

A terapia para os diversos tipos de Gliomas, frequentemente requerem ressecção cirúrgica agressiva, radioterapia externa e doses máximas de agente alquilantes, como temozolomida (TMZ), nitros ureia e bis-cloronitrosureia (também conhecido como carmustina) (GERMANO *et al.*, 2010). Atualmente o tratamento é multimodal, havendo resistência terapêutica devido a dificuldade da droga em acessar o SNC, pela seletividade da barreira hemato-encefalica e pela alta pressão intersticial do tumor. Uns dos fatores que norteiam o uso da terapia multimodal se baseiam na instabilidade do genoma tumoral, o qual produz pontos de mutação, perda de heterozigose, deleção cromossômicas e rearranjos, amplificação gênica, silenciamento gênico e heterogeneidade genotípica e fenotípica da população celular resistindo assim a uma única modalidade terapêutica.

O tratamento padrão na maioria dos países segue com a retirada do tumor, sempre que for possível, com posterior diagnóstico estabelecido por critérios histopatológicos, avaliando celularidade aumentada, atividade mitótica, núcleos atípicos

e proliferação microvascular ou necrose (LOUIS et al., 2007). Após a cirurgia, os pacientes recebem 6 semanas cursivas de radioterapia (60 Gy), concomitante com a quimioterapia (TMZ). Este tratamento é seguido por pelo menos 6 ciclos mensais de TMZ apenas (ver Figura. 4). Comparado com a radioterapia somente a adição de temozolomida aumenta a média da sobrevida para 14,6 meses *versus* 12,1 meses e a fração dos pacientes que estarão vivos após 2 anos fica em cerca de 26,5% *versus* 10,4% (STUPP et al., 2005).

Estes tratamentos geralmente têm apenas uma atividade modesta e mais de 70% dos pacientes sucumbem às complicações intracraniana da difusão do tumor dentro de 2 anos (STUPP et al., 2009). Bevacizumab, anticorpo monoclonal que neutraliza o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), recebeu recentemente aprovação regulatória como agente único para o tratamento de GBM recorrente e é agora amplamente utilizados neste ambiente (CLOUGHESY et al, 2010; KREISL et al, 2009; WEN e KESARI, 2008). Contudo respostas clínicas para o Bevacizumab são também apenas transientes. A imunoterapia celular ou vacina para o tumor tem pouco efeito nos pacientes com GBM. Um dos mecanismos dessa falha é a produção do fator de crescimento transformante beta [*transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ )] pelo glioblastoma, causando profunda imunossupressão (LOUIS et al., 2007).



**Figura.4. Terapia padrão para o Glioblastoma (GBM).** MRI: Imagem de Ressonância Magnética, RT: Radioterapia, wks,: semanas. Fonte: KUSABA, et. al.,2013 modificado.

Outro aspecto importante é o que diz respeito aos gastos anuais em pacientes com GBM. Em 2001, último ano de levantamento dos dados nos Estados Unidos, o gasto anual havia sido de 104 bilhões de dólares. Atualmente, mesmo sem um dado estatístico concreto, estima-se que este gasto seja ainda maior em função do maior número de casos e de não ter havido nenhum avanço terapêutico significativo. (TURINI, 2001). Considerando-se um paciente com  $1,7m^2$  o custo da quimioterapia com BCNU -  $200\text{ mg}/m^2$  a cada 8 semanas, por 6 ciclos são R\$ 3.296,52\* (dois frascos de 100 mg x 6 ciclos), quando contabilizamos a quimioterapia com Temozolomida –  $200\text{ mg}/m^2$  por 5 dias, a cada 28 dias, por 6 ciclos fica no valor de: R\$ 81.062,40\* (quatro frascos de 100 mg x 5 dias x 6 ciclos) (KELLES, 2011).

Diante desse panorama a busca de novos fármacos e estratégias terapêuticas são almejadas e além de novos fármacos (COSTA et al., 2001; ARRIETA et al., 2002; PATOLE et al., 2005), também são estudados métodos alternativos de administração, transporte e distribuição de drogas dentro do cérebro (DE BOER & GAILLARD, 2007).

## 2.4 Desenvolvimento de fármacos

O desenvolvimento de um novo fármaco oncológico é consideravelmente rentável tendo em vista a alta incidência da doença e a necessidade de um conjunto de terapias para a melhoria do quadro dos pacientes. Novos agentes terapêuticos têm sido sugeridos e dentre as classes de moléculas os Alkaloids possuem um histórico clínico de atividade antineoplásica, dos quais podemos citar os alkaloids da vinca, camptotecan, taxanos e os análogos sintéticos de cada classe (FATTORUSSO & TAGLIALATELA-SCAFATI, 2008).

### 2.4.1 *Alkaloids naturais e análogos.*

Alkaloids da Vinca são fármacos anti-mitóticos que destabilizam os microtúbulos e induzem a morte celular. Estes se ligam a componentes importantes do citoesqueleto, tal como  $\beta$ -tubulina em seus heterodímeros subunidades  $\alpha$  /  $\beta$ -tubulina (JORDAN et al., 1991). O valor clínico desta classe de compostos foi claramente identificado e a partir de 1965, desde então tem sido utilizados como agentes anticancerígenos por mais de 40 anos, representando um grupo de composto de base para o desenvolvimento de novas drogas (JOHNSON, 1963).

A camptotecina foi isolado pela primeira vez a partir da árvore chinesa *Camptotheca acuminata ornamental Decne*, também conhecida como a árvore da alegria" e "árvore do amor." Foi isolada em diferentes partes da planta, tais como o raízes, galhos e folhas. É um membro do grupo alcalóide quinolinicos e é composto por uma estrutura em anel pentacíclico (Fig. 5), que inclui uma porção de quinolina pirrol e um centro assimétrico dentro do anel  $\alpha$ -hidroxi lactona. O mecanismo de ação é promovendo a inibição na Topoisomerase I, agindo assim como uma droga específica

de fase S, porque a síntese de DNA em curso é uma condição necessária para induzir a seqüência de eventos que levam à citotoxicidade. Isto tem importantes implicações para a utilização clínica deste agente, pois para obter uma ótima eficácia terapêutica, as drogas citotóxicas específicas de fase S, geralmente requerem uma exposição prolongada á concentrações superiores de um limiar mínimo para atingir o tumor (GUPTA et. al., 1995, HSIANG et. al. 1985).

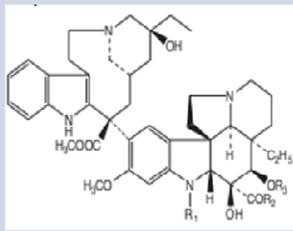
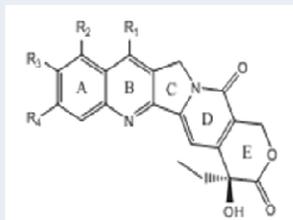
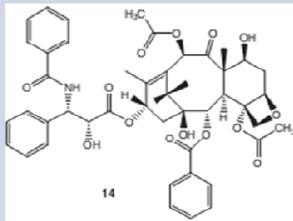
Os Taxanos são uma classe de alcalóides, estruturalmente complexos, que ocorrem no género *Taxus*, vulgarmente conhecido como o *teixo*. Esta família de diterpenóides tem sido desde há muito conhecida pela sua toxicidade, bem como por outras atividades biológicas. O primeiro estudo químico dos metabólitos do teixo datam desda da metade do século XIX, quando uma mistura de taxanos foi obtida pelo alemão farmacêutico Lucas H em 1856 (Lucas H. 1856 apud FATTORUSSO&TAGLIALATELA-SCAFATI, 2008). Em 1971, Wani e Wall descobriram o paclitaxel agente anticancerígeno altamente potente (Figura 5) (WANI et. al,1971; SUFFNESS, 1995). Este feito notável não só deslocou a atenção da comunidade científica para paclitaxel em si, mas também atraiu grandes estudos em várias espécies de teixo que conduziram ao isolamento de vários membros da família do taxano.

Entre os fármacos antineoplásicos que interferem na dinamica dos microtúbulos, o paclitaxel possui como mecanismo de ação (MANFREDI e HORWITZ, 1984 THOMPSON et. al., 1981), a promoção da polimerização dos microtubulos e com isso desloca o equilíbrio entre a tubulina solúvel e microtúbulos polimerizado, reduzindo assim a concentração crítica da tubulina necessária para a montagem. O resultado é a estabilização de microtúbulos, mesmo na presença de condições que normalmente promoveriam a desestabilização do mesmo.

Muitos fármacos são sintetizados com base em compostos naturais tais como análogos dos alcaloides da vinca, e seus derivados semi-sintético vindesina e vinorelbina. Uma das vantagens observadas nestes análogos é quanto a sua atividade antitumoral que pode ser semelhante ou superior àquela de compostos naturais, como é o caso da Vinorelbina, apresentando efeitos colaterais de neurotoxicidade e mielossupressão mais brandos (GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ et. al., 2010; OCEAN e VAHDAT, 2004; QUASTHOFF e HARTUNG, 2002 ).

Os derivados sintéticos do campotecan, o irinotecan e topotecan, análogos aprovados para uso clínico, também são exemplo de desenvolvimento e aprimoramento sintético de compostos naturais. Foram obtidos por modificação nos anéis A e B (Figura 5), envolvendo adições ao anel quinolina ou a substituição completa do anel, com um sistema de anel alternativo, no entanto, o sistema de anel de quinolina é relatado em ser o grupo químico responsável pela potente atividade antitumoral (LACKEY, et. al. 1995). Essas modificações da estrutura natural tornaram possível a utilização destes compostos de forma terapêutica, diminuindo os efeitos colaterais induzidos pelo campotecan, uma vez que não poderia ser utilizado como uma droga de escolha devido à sua alta toxicidade. Vários grupos de pesquisas têm sintetizado derivados desses alcaloides objetivando uma menor toxicidade e muitos se encontram em fase II de triagem clínica (KUPPENS et. al., 2004; PRATESI, et. al., 2005; SCHILSKY et. al., 2000; DAUD et. al., 2005).

Outro análogo importante é o derivado sintético do Paclitaxel, o docetaxel, ambos tem o mesmo mecanismo de ação sendo que o análogo sintético tem uma afinidade quase duas vezes maior de ligação ao alvo,  $\beta$ -tubulina. Docetaxel, inicialmente foi desenvolvido para o tratamento do câncer da mama, mas também apresenta atividade contra câncer de pulmão (BELANI et. al., 2004 )

Alcaloide	Estrutura Química	Mecanismo de ação	Autores
<b>Vinca</b>		<i>Despolimerização dos microtubulos; Parada na fase G2/M. Parada na fase G1 (doses nanomolares); Apoptose como mecanismo de morte</i>	POURROY et al., 2004; JORDAN et al., 1992.; FAN et al., 2001.; GRONINGER et al., 2002
<b>Camptotecan</b>		<i>Inibição da enzima topoisomerase. Estabilização do complexo transitório DNA e topoisomerase; Parada na fase S do ciclo celular Morte celular</i>	STAKER et. al., 2002 e HSIANG et. al. 1985.; GUPTA et. al., 1995.; TSAO et. al., 1993
<b>Taxanos</b>		<i>Manutenção da polarização do Microtubulo, Parada na fase G2/M. Sitio de ação diferente da Vinca Desorganizado arranjo do Microtubulos.</i>	MANFREDI e HORWITZ, 1984.; THOMPSON et. al., 1981; ROYTITA et. al., 1987

**Figura 5 Alcaloide naturais antineoplásicos e seu mecanismos de ação** Fonte: Estruturas químicas extraída do livro FATTORUSSO&TAGLIALATELA-SCAFATI, (2008).

#### 2.4.2 Fármacos sintéticos

Os fármacos de origem sintética representam significativa parcela do mercado farmacêutico, estimado, em 2000, em 390 bilhões de dólares (MENEGATTI et.al, 2001). Entre 1981 e 2006, dos 847 fármacos de baixo peso molecular (micromoléculas) lançados no mercado, 43 eram produtos naturais, 232 produzidos por hemi-síntese a partir de produtos naturais e 572 obtidos por síntese total. Entretanto, 262 entre estas últimas substâncias possuíam um grupo farmacofórico inspirado em produtos naturais ou poderiam ser considerados análogos de produtos naturais (SCHMIDT et. al., 2008 e RISHTON, 2008). Embora os produtos naturais tenham tradicionalmente desempenhado um papel importante na descoberta de medicamentos, a maioria das empresas

farmacêuticas querem reduzir suas operações com produtos naturais (MARK S. e BUTLER, 2004), no entanto, estas substâncias ainda vêm sendo bastante usadas como fonte de inspiração devido a sua diversidade química (COSTA, 2009)

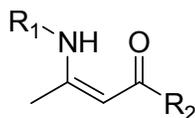
Considerando-se que um programa de descoberta de novos fármacos é um processo muito longo, complexo e de alto custo, considerando-se ainda que o processo envolva duas etapas distintas a fase de descoberta e a de desenvolvimento e comercialização, não há dúvidas que a competência científica nacional está qualificada para atuar na primeira fase desse processo, com sucesso. E mais, o Brasil sendo um país detentor de uma biodiversidade fantástica, abrigando o maior repositório de angiospermas do planeta, tem em princípio, a condição básica para se começar a estruturar um programa nacional de bioprospecção em busca de novas entidades químicas (NEQ) e a partir desta promover modificações racionais para obtenção de análogos potentes (MONTANARI E BOLZANI, 2001). O laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da UFBA o nosso grupo tem explorado esse tópico, através de bioprospecção de produtos naturais do estado da Bahia e publicando artigos, teses e dissertações referentes a flavonoide, alcaloides e terpenos da flora regional como possíveis agentes farmacológicos (SILVA 2002a; SILVA., 2006b; SOUZA, 2009; FREITAS, 2010 e SANTOS, 2011)

Esses agentes naturais são então aprimorados através da síntese química e observamos assim, que através desse melhoramento, os compostos sintéticos conseguem ter uma maior atividade desejada em menores doses que os compostos naturais, além de não serem muitas vezes rapidamente metabolizados. Esse aprimoramento de moléculas inicialmente naturais e posteriores os análogos é uma clássica evolução na produção e inovação tecnológica de fármacos (MONTANARI E BOLZANI, 2001).

E quando observamos a estrutura dos fármacos empregados na terapêutica, constata-se que 62% deles são heterocíclicos, ou seja, possuem átomos de elementos distintos do carbono (heteroátomos) envolvidos em ciclos (heterocíclicos) dentre os quais 95% apresentam-se nitrogenados (MENEGATTI et.al, 2001). E além de fármacos, os compostos heterociclos também são encontrados em agroquímicos biologicamente ativos, bem como inúmeros aditivos e modificadores usados na indústria de cosméticos, armazenagem e plásticos (MELO et. al., 2006)

#### 2.4.3 Síntese de *alkaloid-like* derivados de enaminonas.

O termo geral “enaminona” refere-se a qualquer composto que apresente o sistema conjugado N-C=C-C=O (Figura 6). Enaminonas são compostos  $\beta$ -enamino carbonílicos, derivados de  $\beta$ -dicetonas,  $\beta$ -ceto ésteres e outros compostos  $\beta$ -dicarbonílicos. Os representantes mais comuns desta classe são  $\beta$ -enamino cetonas e  $\beta$ -enamino ésteres, também chamados de amidas vinílogas e carbamatos ou uretanas vinílogas, respectivamente; denominações como “ $\beta$ -aminoenona”, “acilvinilamina” e “acilenamina” também são encontradas na literatura (FERRAZ e PEREIRA, 2004) A procura de métodos cada vez mais eficientes de preparação e uso de enaminonas está relacionada com a variedade de reações em que estes compostos podem ser empregados, principalmente na síntese de heterociclos dos mais variados tipos com aplicação farmacológica (FERRAZ e GONÇALO, 2007).



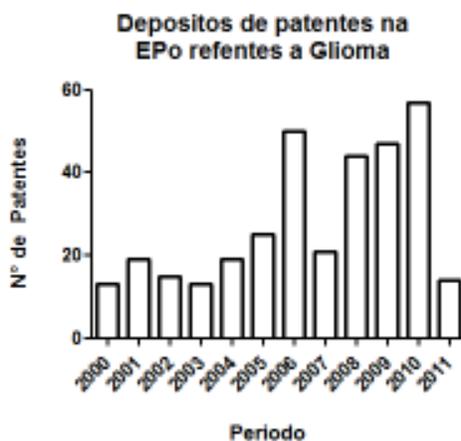
**Figura 6- Estrura base sistema conjugado N-C=C-C=O de enaminonas**

Nesse trabalho varias classes de “*alkaloids-like*” derivados de enaminonas foram avaliados quanto a aspectos farmacológicos e potencial para futura aplicação terapêutica. Esses compostos e rotas sintéticas foram elaborados e melhorados como resultados de pesquisas do Instituto de química da UFBA-Laboratório de Química Orgânica, por projetos do Prof. Silvio do Desterro Cunha e colaboradores (Cunha et. al. 2007).

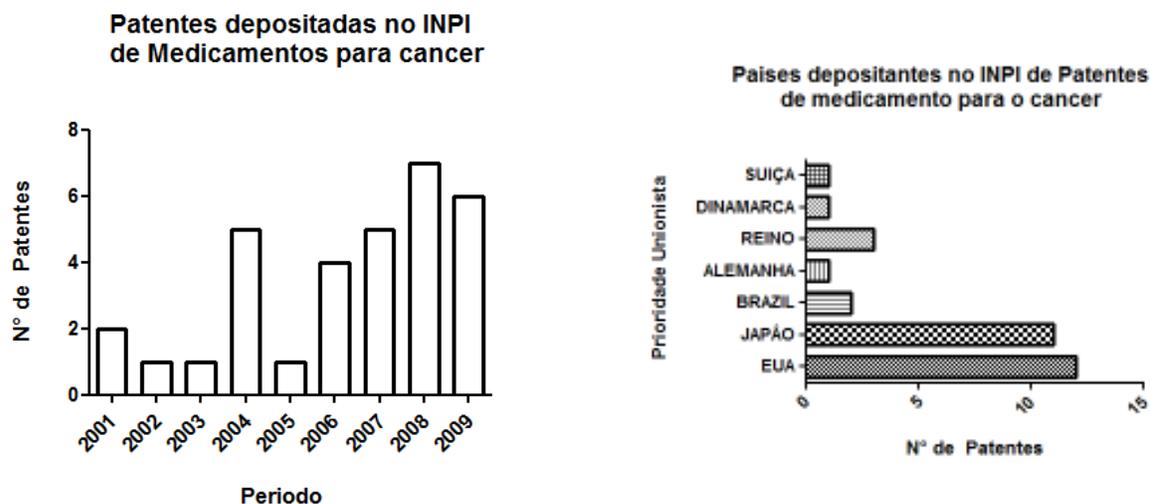
#### ***2.4.4-Patentes relacionadas a gliomas e desenvolvimento de fármacos.***

Diante desse panorama de descobertas e criação de novas moléculas, temos os escritórios de patentes como centros de depósitos para regulamentação e proteção de invenções de uma forma geral. Para entender como o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos tem se projetado foi feito um levantamento das Patentes depositadas tanto no escritório Europeu de patentes EPO-European Patent office como no Instituto Nacional de Propriedade Industrial –INPI, através de uma pesquisa rápida por palavras chaves como “Gliomas”, “Drug Glioma” e “medicine gliomas”, no recorte de 2000 a 2011, para verificação ao longo do tempo dos depósitos de patentes que tivessem uma relação com invenções referentes a “Gliomas” e “Drug Glioma”. Esses depósitos aumentaram numa escala decimal, 20 depósitos realizados a mais em 2006, 2008, 2009 e 2010 em comparação com os anos anteriores a nível internacional (Figura 7.). Já o levantamento realizado na base de dados Brasileiro (INPI) teve o quantitativo muito baixo. Essa questão do quantitativo referente ao avanço para o tratamento e de produção de novas tecnologias para a esta patologia especificamente o Gliomas é tão pequena, que a mesma se encontra na ordem da grandeza de dois depósitos realizados apenas e que ambos não são nacionais.

No entanto, quando foi averiguada a parcela de participação nacional em pesquisa para o câncer de uma forma geral, foi possível construir um gráfico ao longo do tempo de depósitos realizados no INPI e no qual vemos o Brasil com uma contribuição de somente duas patentes produzidas pelas IES-Instituição de Ensino Superior, a UFRJ e a USP-Instituto Butantã, nos anos 2008 e 2009 (Figura 8).



**Figura 7- Depósitos de Patentes na EPO Referentes a Glioma ao longo do tempo.** Fonte: Dados coletados do EPO. Data da coleta- 10/10/2011

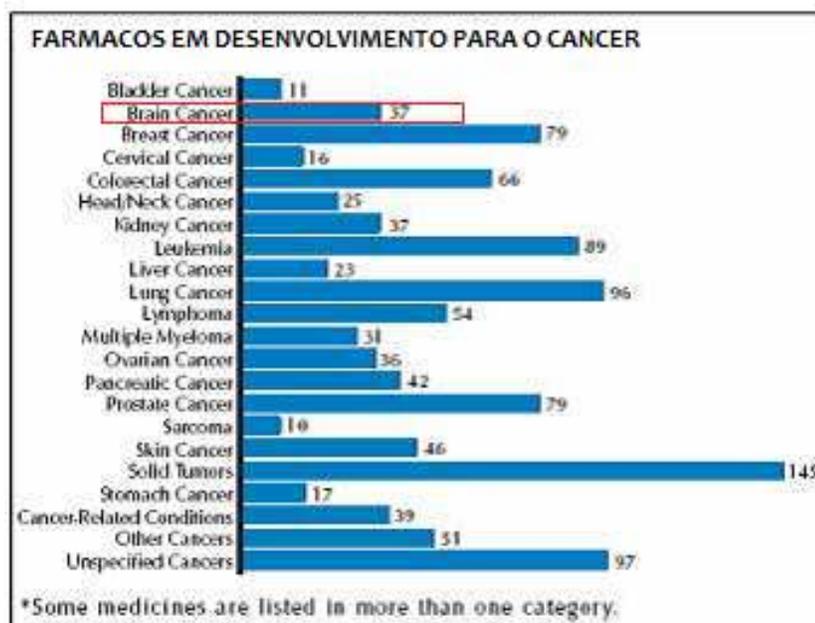


**Figura 8 -Depósitos de Patentes no INPI Referentes a Medicamento para o câncer e considerando unidade unionista.** Países depositantes no INPI de patentes de medicamentos para o câncer durante o período de 2001 a 2009. Fonte: Dados coletados do INPI. Data da coleta 10/10/2011

Esses indicadores demonstram a produção tecnológica e inovação do país gerado tanto por indústria como instituição de ensino superior. Em âmbito de pesquisas e produções de fármacos o Brasil não tem se destacado, isso ocorre tanto por fatores históricos, a consolidação industrial farmacêutica foi altamente internacionalizada e integrada a indústria farmacêutica mundial, fatores econômicos, com baixos investimentos em descoberta de novas drogas, e fatores estruturais de mercado concentrando grandes laboratórios, especialmente os multinacionais no País de origem. Complementando a evolução desse segmento, o recente e significativo crescimento do mercado de genéricos, se fizeram presentes na evolução da estrutura produtiva em nosso País (SELAN, 2007). Além desses problemas, há cerca de três décadas, criar uma nova droga custava em média US\$ 54 milhões. Hoje, segundo o Tufts Center for the Study of Drug Development, dos Estados Unidos, são necessários cerca US\$ 900 milhões e 15 anos de pesquisas para o desenvolvimento de um medicamento inovador.

Os indicadores de investimento em P&D-pesquisa e Desenvolvimento pelas empresas internacionais mostram um forte investimento, principalmente em produtos que estão nas fases de desenvolvimento clínico – Fase I e Fase II. Ao final de 2006, 2.075 moléculas foram desenvolvidas, cerca de 7% a mais do que o nível de 2005 e mais de 35% comparativamente ao final de 2003. Quanto ao desenvolvimento de Fase III de drogas em estágio de teste ou de pré-aprovação, os principais produtos foram os oncológicos, o segundo voltados para infecções virais e HIV e outros para dores e artrites, representando um total de 162 produtos. Desse total, apenas 27% são encontrados biologicamente na natureza (BERTOLAI 2006), sendo a síntese dos novos compostos, análogos ou não, o carro chefe da produção e inovação de fármacos.

Pesquisadores farmacêuticos em 2006 trabalharam em 646 medicamentos para o câncer nas diversas fases. Os medicamentos em desenvolvimento incluem apenas 37 medicamentos para tumores cerebrais, enquanto que tem 96 para o câncer de pulmão (primeira causa de morte por câncer entre os homens); 79 para câncer de mama (primeira causa de morte por câncer entre as mulheres), 66 para o câncer colorretal e 79 para o câncer de próstata (Figura 9).



**Figura 9- Gráfico do perfil de medicamentos estudados em fase III** Fonte: WHO modificado, 2006.

Quando comparamos esse levantamento e a produção de fármacos no mundo (dados de 2006) esses conjuntos revelam que Brasil ainda está muito aquém em produção de fármacos, sendo assim um setor em desenvolvimento e com excelentes oportunidades de atividades de pesquisa e integração empresa e ensino, possibilitando quem sabe um aumento de produções e inovações tecnológicas de forma rentável e importante para a economia do país.

No Brasil, já existem vários grupos nacionais envolvidos com a busca de princípios bioativos de plantas, essa pesquisa é fundamentalmente acadêmica. Por exemplo, nosso grupo de pesquisa trabalha com bioprospecção de compostos naturais do estado Bahia sediando o Núcleo de bioprospecção de drogas derivadas de plantas do Estado da Bahia para tratamento de doenças neurodegenerativas Com apoio da FAPESB (PNE0004/2011) e vem desenvolvendo trabalhos integrados em setores acadêmicos, na descoberta de fármacos e estruturas químicas. Acreditamos que a Academia poderá contribuir de forma decisiva para o descobrimento de NEQs e talvez, esse seja o seu papel exatamente porque essa etapa da pesquisa demanda muito tempo e pode envolver a qualificação de recursos humanos.

### **2.5. Culturas de Células como modelo de estudo farmacológico.**

A fim de testar se um composto é eficaz e para avaliar a sua atividade, quatro diferentes tipos de testes experimentais podem ser usados: ensaios bioquímicos; ensaios baseados em células; testes em animais, testes em humanos. Os resultados do ensaio de base celular dão informações adicionais, como biodisponibilidade, para decidir quais compostos deve ir a um inicial aumento de escala de síntese e seguir para testes em animais. Se um ensaio de base celular indica que um composto é ativo, isto é uma indicação de ligação com receptores de superfície celular, ou de que o medicamento está a atingindo um alvo dentro de uma célula (David, 2009). As Células de origem tumoral podem ser cultivadas como linhagens celulares e podem constituir modelos confiáveis para o estudo de triagem inicial a drogas candidatas a agentes terapêuticos (LAL et al., 1996 e PEDEBOSCQ et al, 2007).

Em 1991, Bocchini e colaboradores estabeleceram a linhagem GL15 a partir de glioblastoma multiforme humano e confirmaram, através de marcação imunocitoquímica,

a expressão, de forma constitutiva, das proteínas do citoesqueleto, vimentina e GFAP. COSTA et. al. (2001) confirmaram os estudos de Bocchini et. al. (1993), assim como Perzelcová et. al., 2000 demonstraram a co-expressão de GFAP, vimentina e citoqueratinas em GL-15 no qual a dupla marcação vimentina/GFAP revelou que a população das células GL-15 GFAP (+) representam cerca de 30% das células Vimentina (+) e o padrão antigénico global sugere que a GL-15 não pertencem à linhagem de células progenitoras O-2A e provavelmente surgiram de uma expansão clonal de precursor astrocitário. Já foi mostrado que as células GL15 são capazes de se diferenciarem morfológicamente em uma forma mais estrelada com aumento da expressão de GFAP, seja por uma privação de soro, um importante suplemento utilizado no meio de cultura, seja pela ação do éster de forbol (PMA), um ativador da proteína cinase C (PKC) e por retinóides (COSTA et. al., 2001). Além de apresentar mutação por deleção no códon do gene p53 (COSTA et. al., 2000)

OLIVEIRA et.al 2012 mostrou que essa linhagem é resistente a doses superiores a 2mM de TMZ apresentando apenas sensibilidade a doses a partir de 1mM ao etoposídeo, doxorubicina e vincristina. E possui marcação de populações CD133+ (dados não publicados). Dessa forma, em função das características estruturais, bioquímicas e farmacológicas, a linhagem GL15 constitui um bom modelo para o estudo da ação de compostos purificados ou complexos farmacologicamente ativos, tanto em relação à citotoxicidade quanto a determinação de seu potencial terapêutico e como modelo de cânceres resistentes e recidivo.

A linhagem U251 foi estabelecida por PONTEN, em 1975 e HOUCHENS et al., em 1983 é descrita por apresentar semelhança histológica e imunohistoquímica com várias GBMs humanas. Foi caracterizada geneticamente e apresenta um número de

alterações genéticas chaves em genes supressores de tumorais e vias oncogênicas. Imagem de ressonância magnética (MRI) do modelo humano U251, encontramos centros necróticos, pobre demarcação, bordas de tumor infiltrativo e núcleo reniformes (RADAELLI et al., 2009). Esse modelo contém populações celulares CD133+ as quais são abeis em formação de neuroesferas com potencial de alto propagação (QIANG et al., 2009).

A linhagem C6 foi desenvolvida no final dos anos 1960, por administração repetitiva de MNU (methylnitrosourea) em adultos Wistar-Furth machos (BENDA et al., 1968). Embora originalmente desenvolvida em ratos Wistar, C6 pode ser implantados em ratos Sprague-Dawley e Long-Evans sem rejeição (NAGANO et al., 1993, WHITTLE et al., 1998). C6 compartilha várias características histopatológicas específicas de marcadores tumorais com a GBM humano. Essa linhagem demonstra regiões de invasão focal no tecido do cérebro quando implantado em ratos Wistar, semelhante à infiltração padrão difuso observado em GBM humano (CHICOINE e SILBERGELD, 1995). No nível celular, C6 apresenta áreas de exposição de necrose, polimorfismo nuclear e taxas de mitose elevadas (AUER et al., 1981). Em termos de marcadores histopatológicos, C6 expressa a proteína S100B, mas não expressa GFAP, e níveis variáveis de vimentina (PFEIFFER et al., 1970, CHOU et al., 2003).

Geneticamente a C6 apresenta comparações com a GBM humana, como por exemplo, o gene supressor de tumor comum, p16, este é conhecido por ter uma elevada taxa de mutação em GBM e de mutações no locus p16/CDKN2A/NK4A. Essas mutações também são frequentes em C6 (FURNARI et al., 2007). O gene supressor de tumor p53 é um dos genes mais frequentemente mutados na GBM humana, e a

linhagem celular C6 difere de seres humanos, pois sua expressão é concomitante com a p53 do tipo selvagem juntamente com a expressão de PTEN mínima (ASAI et al., 1994).

Além dessas linhagens outras diversas também foram estabelecidas de glioblastoma humano U87MG pode ser obtida pela American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, V) sendo disponíveis no mercado e ou animal como GL-261 estabelecido por SELIGMAN e SHEAR em 1939, além de outros, são adotados para estudos da biologia celular tumoral, em prospecção de fármacos, em testes histopatológicos e caracterização de múltiplas resistências. Destacando assim as linhagens como modelos bastantes utilizados e confiáveis para a prospecção de drogas ativas, descobertas de alvos moleculares, elucidação de mecanismos de ação tanto de moléculas naturais como de síntese assim como para estudo da fisiopatologia celular.

### 3 OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivo geral realizar uma prospecção *in vitro* de ação antitumoral de moléculas de síntese *alkaloids-like*, derivados enaminonas, em células de glioblastoma humano e murino, e esclarecer mecanismos de ação de moléculas ativas, visando determinar potencial terapêutico para tumores cerebrais malignos.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinação dos efeitos de 28 *alkaloids-like* sobre a viabilidade celular de **células de glioblastoma altamente proliferativas** de origem humana (GL-15, U251), e murina (C6) e determinar relação estrutura e atividade em função da solubidade.
2. Determinação dos efeitos de 28 *alkaloids-like* sobre a viabilidade de **células gliais normais do SNC** de ratos Wistar neonatos e caracterizar atividade seletiva.
3. Estudar os mecanismos de ação de droga mais ativa contra células de glioma relacionados a atividade antiproliferativa e citotóxica.
4. Avaliar a relação estrutura atividade correlacionando á citotoxicidade com a solubilidade dos compostos, através do calculo do LogP teórico.

## 4 METODOLOGIA

Modelo utilizado no estudo consistiu na avaliação dos efeitos do tratamento de células em cultura com as 28 drogas. Para isso, foram utilizadas três linhagens de células de glioma, uma murina (C6) e duas humana (GL-15 e U251), além de cultura primária de glia de ratos wistar como controle de células normais. A ideia de utilizar C6 e células normais do sistema nervoso central vem da tentativa de avaliar se os efeitos encontrados possuem alguma seletividade e as células de origem humana foram incluídas a fim de se averiguar se tais efeitos seriam restritos à espécie

Foram avaliados: citotoxicidade pelo teste do MTT em diferentes condições, Morfologia celular por microscopia (contraste de fase), Interferência no ciclo celular pelo teste de incorporação do iodeto de propídio (IP) e indução de apoptose por marcação com anexina V e coloração do núcleo com agente intercalante e migração pelo ensaio de lesão na monocamada de células.

### 4.1. Metodologia detalhada

#### 4.1.1 Os *alkaloids-like*

Todas as moléculas foram sintetizadas e doadas pelo Prof. Silvio Desterro Cunha do Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química/UFBA. Os compostos foram dissolvidos no dimetilsulfoxido (DMSO) formando soluções estoque a 100mM, que foram mantidas a -4°C. As diluições finais de cada reagente foram obtidas no momento do tratamento, diluindo-se as soluções concentradas diretamente no meio de cultura.

#### **4.1.2. Cultura de células tumorais.**

As linhagens são conservadas em uma solução de 90% SFB e 10% DMSO à razão de  $1,5-2,0 \times 10^6$  células/ml e estocadas em criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Elas foram cultivadas em condições estéreis em placas de cultura de poliestireno (Corning), em um meio composto de DMEM, suplementado com 10% de SFB, em presença de 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicina, 2 mM de glutamina e 0,011 g/L de piruvato e 7 mM de glicose segundo protocolo estabelecido (COSTA et al., 2001). Quando confluentes, as células foram descoladas das placas de cultura por uma solução contendo 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS. Para o tratamento as células foram cultivadas por um período de 24 h á 72 h. Volume equivalente de DMSO veículo de diluição dos *alkaloids-like*, foi adotado nas células em condições controle e tratadas nas concentrações finais de (1-1000, 1-500, 1-300, 1-150 e 1-100)  $\mu\text{M}$ .

#### **4.1.3. Cultura primária de Glia.**

Culturas primárias de células gliais foram preparadas de acordo com método de COOKSON & PENTREATH (1994) modificado. Foram utilizados ratos Wistar neonatos (0-1 dia), obtidos do Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA (ICS-UFBA). O procedimento foi realizado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal. Após serem anestesiados com éter, os animais foram decapitados e seus hemisférios cerebrais expostos e removidos assepticamente. As meninges e os vasos sanguíneos foram retirados do córtex cirurgicamente e, em seguida, forçados a passar por uma membrana de Nitex estéril de 75  $\mu\text{m}$ . As células dissociadas foram suspensas em meio Dulbecco modificado meio DMEM HAM F12 (Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicina, 2

mM L-glutamina, 0,011 g/L piruvato, 3,6g/L de HEPES, 12 mL/L de glicose 50% e 10% soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY)..As células gliais foram semeadas em placas de cultura de poliestireno (Cultilab, SP, Brasil) de 100 mm f a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, cultivadas em câmara úmida com 5% CO<sup>2</sup> a 37 °C. A cada 48 h o meio de cultura foi trocado. Após 15 dias, quando se esperava que a glia tivesse atingido maturidade, as células foram tripsinizadas e replaqueadas, de acordo com teste a ser adotado, para placas de poliestireno de 96 poços e de 35 mm de diâmetro, a uma densidade inicial de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> os animais utilizados ,ratos Wistar neonatos e fetos, obtidos do biotério do Instituto de Ciências de Saúde da UFBA (ICS-UFBA) foram devidamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do ICS-UFBA

#### **4.1.4 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT**

A viabilidade celular foi mensurada através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). O teste baseia-se na capacidade que têm as células viáveis de metabolizar, através das desidrogenases mitocondriais, o MTT, de coloração amarela, em um produto (formazan) de coloração purpúrea (MOSMANN, 1983). A técnica foi realizada em placas de 96 poços. As células foram lançadas com densidade de  $1,8 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> nas placas e depois 24 horas (para testes em placa sub-confluentes) submetidas aos tratamentos de interesse, por tempo determinado. Depois disso o meio de cultura foi trocado e o MTT, dissolvido em tampão fosfato (PBS), adicionado em cada poço (1 mg/ml). Após duas horas de incubação, as células foram lisadas pela adição de 100 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v) e após 18h as placas foram submetidas à

espectrofotometria e a absorbância medida em um comprimento de onda de 595 nm, usando um leitor de microplacas (THERMO PLATE®, modelo TP-reader – tipo B) para quantificação da viabilidade. Um poço contendo meio de cultura e MTT, porém sem células, foi usado como branco, e o valor da absorbância deste foi descontado de todos os outros. Todos os experimentos constaram de um grupo controle em que as células foram tratadas apenas com os veículos das substâncias testadas. Altos valores de absorbância, indicando presença de formazan, foram relacionados positivamente a elevada viabilidade. Os dados foram expressos relativamente como percentuais do grupo controle sem tratamento, cuja média ou mediana (a depender da distribuição dos dados), corresponde a 100% de viabilidade, e foram submetidos às análises estatísticas adequadas, incluindo cálculo de IC 50 por regressão não linear, quando foi o caso. Todos os testes foram realizados com o n° de 8 poços para cada tratamento em triplicata.

#### **4.1.5 Avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT em privação de SFB**

Foi realizado nas condições descritas acima à avaliação da citotoxicidade celular nas linhagens tumorais sobre privação de Soro Fetal Bovino (SFB), tratadas com RLB87 nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ M, por 72 h de tratamento. Com o intuito de se verificar a interferência do SFB na atividade citotóxica do mesmo e assim correlacionar com possíveis efeitos observados no conjunto de dados.

#### **4.1.6 Microscopia de contraste de fase**

Todas as culturas foram acompanhadas com microscopia de contraste de fase, que também foi usada para avaliação de celularidade (densidade celular na cultura) e

morfologia celular. Imagens foram adquiridas através de câmera digital de alta resolução (SONY® Cyber-short 16 Megapix) acoplada ao microscópio invertido. Uma régua micrométrica foi fotografada em mesmo aumento para confecção da barra de escala das fotomicrografias.

#### **4.1.7 Avaliação do tipo de morte celular**

Após os tratamentos, as células cultivadas em placas de Petri (35 mm de diâmetro) foram tripsinizadas e centrifugadas (1500rpm por 3 minutos) juntamente com o sobrenadante. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS e incubadas, durante 15 minutos, com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Annexin-V FITC-Kit, SIGMA, E. U. A). A anexina V é uma proteína com propriedades de ligação à fosfatidilserina. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina-V. Entretanto, recomenda-se a utilização de IP, que marca as células necrosadas, ou em estágio tardio de apoptose, permitindo a diferenciação dos dois processos. As células não-apoptóticas não são marcadas nem por anexina-V, nem por IP. A análise quantitativa foi padronizada para 10.000 células usando o programa, com auxílio do software Cell quest 3.1f para FACSort (Becton Dickinson San Jose, E. U. A.) efetuada através de citometria de fluxo. Foram usados para as análises os detectores FL-1 para aquisições dos dados correspondentes à marcação com anexina V e o FL-2 para IP. As células foram expostas ao *alkaloid-like* RLB 87 nos tempos de 12, 24 e 72 h.

#### **4.1.8 Visualização de condensação e/ou fragmentação nuclear**

Condensação e fragmentação dos núcleos foram evidenciadas através de observação em microscopia de fluorescência (microscópio Olympus® modelo AX70) com filtro ultravioleta (340 nm) após coloração com o agente intercalante Hoechst 33258. As culturas foram submetidas ao tratamento com o *alkaloid-like* RLB87 e depois fixadas com metanol a -20°C por 30 minutos, lavadas com PBS por três vezes à temperatura ambiente, incubadas, ao abrigo da luz, com solução de Hoechst 33258 a 2,5 µg/mL em PBS por cinco minutos, e novamente lavadas três vezes com PBS antes de serem levadas para análise no microscópio. Imagens foram capturadas através de sistema de câmera digital acoplada ao microscópio (CoolSNAP-Pro *cf color câmera*–Cybernetics®) e software específico (Image-Pro Discovery 4.5.1.29-Cybernetics®). O tempo de exposição foi mantido constante para todas as imagens e foram considerados condensados os núcleos que apresentavam mais de uma tonalidade de azul após regulagem de contraste para 90% e saturação.

#### **4.1.9 Análise do ciclo celular**

O percentual de células em cada fase do ciclo celular foi estimado a partir da leitura, por citometria de fluxo, da intensidade de fluorescência das células, permeabilizadas, após incubação com Iodeto de Propídio (IP). Para isso, as células, após os tratamentos de interesse, foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500rpm por 5 min e ressuspensas em etanol a -20°C, no qual permaneceram por uma hora para permeabilização; depois foram tratadas com RNase (20µg/mL em tampão citrato 40mM) por 15 minutos para degradação do RNA, em seguida incubadas com solução de IP

(50µg/ml em tampão citrato 4mM) e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expostos na forma de histograma com a intensidade de fluorescência (que é proporcional ao conteúdo de DNA, que, por sua vez, varia com a fase do ciclo) na abscissa. Foram testadas exposições por diferentes períodos de tempo e diferentes concentrações do *alkaloid-like* RLB87.

#### **4.1.10 Ensaio de Invasão**

Para o teste de migração as células tumorais foram cultivadas, em alta densidade em placas de 24 poços. As culturas entrarem em confluência em 24 h após lançamento, quando o SFB foi retirado para impedir a proliferação e depois foi feito uma lesão linear na região central da monocamada de células, com o auxílio de ponteira plástica estéril (para 200 µL). Os poços foram então divididos em grupos controles (tratados com DMSO a 0,1%) e grupo tratado (RLB 87 na concentração de 100µM). A morfologia e a migração das células para a zona de lesão foi acompanhada por microscopia em contraste de fase durante as primeiras 48 h. A ocupação da região lesionada pelas células foi monitorada por microscopia de contraste de fase até o surgimento dos primeiros sinais de citotoxicidade, quando o experimento foi interrompido. Imagens foram adquiridas conforme explicado no item 4.2.6 e submetidas à análise qualitativa.

#### **4.1.11 Coloração de Rosenfeld.**

Para a coloração de Rosenfeld as células tumorais da linhagem C6 foram tratadas com os *alkaloid-like* RLB 87, fixadas com metanol e lavadas com PBS 3x por 3 mim,

gotejando 20 gotas de Rosenfeld deixando agir por 2 min e depois adicionou-se 20 gotas de água destiladas por 5 min, lavando-se com água destilada posteriormente.

#### 4.1.12. Cálculo do valor teórico de logP

Os valores teóricos de coeficiente de partição n-octanol/água (logP) foram calculados com auxílio da ferramenta on-line *logP Calculator*, disponível no site da *Virtual Computational Chemistry Laboratory*, através do endereço eletrônico <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html>. As estruturas químicas foram desenhadas em 2D utilizando a ferramenta disponível no próprio site no ícone “*molecule editor*”. E o cálculo foi realizado com base nos valores XLOGP2 e XLOGP3.

#### 4.1.13. Análise estatística dos dados

Todos os dados gerados receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como média e erro médio padrão, ou mediana e percentil. A escolha da medida de tendência central e das medidas de dispersão foi feita de acordo com a distribuição dos dados em um histograma de frequência. Como o número amostral não foi superior a 20 em nenhum dos testes, a distribuição foi considerada normal se satisfizesse as seguintes condições: passar em qualquer dos testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk ou teste de D’Agostino e Pearson); e considerada não normal se satisfizesse as seguintes condições: Não passar em qualquer dos testes de normalidade acima citado. Para conjuntos de dados representados por média (portanto, com distribuição normal), testes estatísticos paramétricos foram usados nas comparações entre grupos tratados e controles, enquanto testes não paramétricos foram usados para

aqueles representados por mediana (com distribuição não-normal). O teste usado para cada análise está especificado na apresentação dos resultados; os mais utilizados foram os paramétricos t de Student não pareado para análise binária, One-Way ANOVA (seguido do teste de Bonferroni) para múltipla comparação com apenas um parâmetro variável e Two-Way ANOVA (seguido do teste de Dunnet) para múltipla comparação com dois parâmetros variáveis, e os não paramétricos de Mann-Whitney para análise binária ou de Kruskal-Wallis (seguido do teste de Dunns) para múltipla comparação.

O software GraphPad Prism, versão 5.00 e 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) foi utilizado nas análises. Regressões não lineares, como a utilizada para cálculo de IC50, foram feitas utilizando-se modelos de equação logarítmica da biblioteca do programa e só foram consideradas para efeito de cálculos quando o coeficiente de regressão ( $R^2$ ) foi superior a 0,9. Os valores de **p** adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles inferiores a **0,05**.

## 5. RESULTADOS

Iniciamos nossa proposta investigativa realizando a prospecção de diversas classes químicas de moléculas sintéticas *alkaloid-like*, na concentração de 100  $\mu$ M, avaliando seus efeitos sobre a viabilidade celular, através do teste do MTT, nas linhagens tumorais humanas (GL-15, U251) e murina (C6), assim como em cultura primária de astrocito/microglia oriunda de ratos neonatos wistar. Observamos, após 72 h do tratamento, que todas as culturas tumorais apresentaram alta sensibilidade a molécula nominada RLB87 (valor  $p < 0.0001$ ) em relação ao controle, com porcentagem de inibição da viabilidade de 97,25% na linhagem U251, 75,09% na linhagem GL-15 e 76,68% na linhagem C6 (Anexo 1- Media e desvio padrão). Além deste *alkaloid-like* tiveram também atividade citotóxica em todas as linhagens o MQ90 e RMF40 e a U251 foi a linhagem mais sensível aos tratamentos tendo efeito citotóxico além dos já citados, também ao RLB29. A cultura primária de células gliais, nosso controle de efeito seletivo, nessa prospecção apresentou apenas sensibilidade ao MQ90, MQ85 e MQ23 sendo refratária aos outros tratamentos. Diante desses achados a MQ90 foi descartada das Análises posteriores por apresentar-se tóxica a cultura de glia. Por outro lado, seguimos avaliando a atividade antitumoral da molécula RLB87 já que a mesma apresentou maior atividade citotóxica para todas as linhagens celular de glioma testadas e não apresentou atividade citotóxica para células gliais normais. O RMF 40 tem analogia estrutural com o RLB87, portanto foi estudado posteriormente com outro grupo de moléculas análogas. Na figura 14 podemos verificar as estruturas químicas das diversas classes estudadas, pirrolizidínicos, índois, pirrolazepínicos e quinolínicos, nessa prospecção.

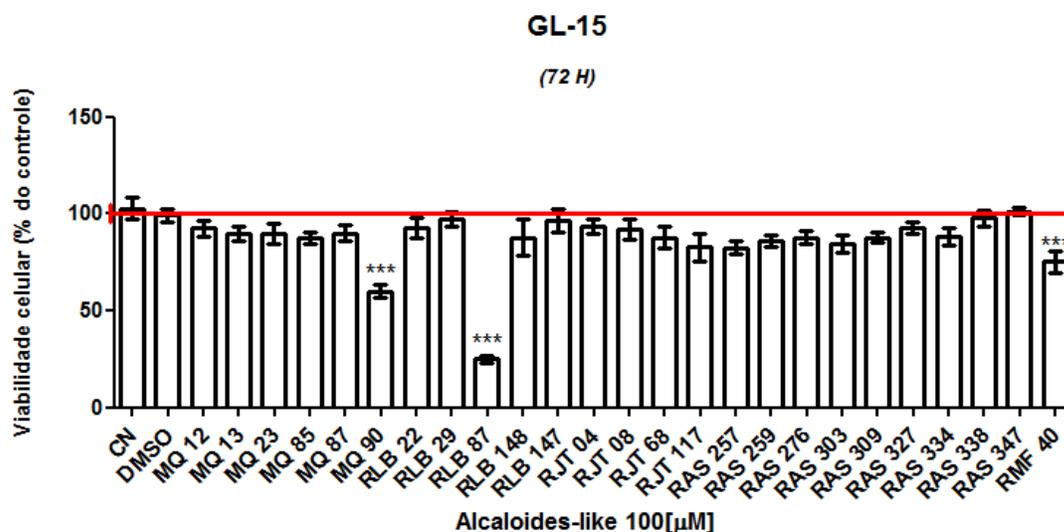


Figura 10 Triagem do efeito citotóxico dos alcalóides sintéticos na linhagem de glioblastoma humano (GL-15) através do teste do MTT. Células foram analisadas após 72 horas de exposição ao veículo (0.1% DMSO) e *alkaloids-like* a 100 µM. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste One-Way ANOVA, seguido do teste de Student-Neuman-Keuls para múltiplas comparações. \*\*\*= P < 0,001 para comparação com respectivo controle.

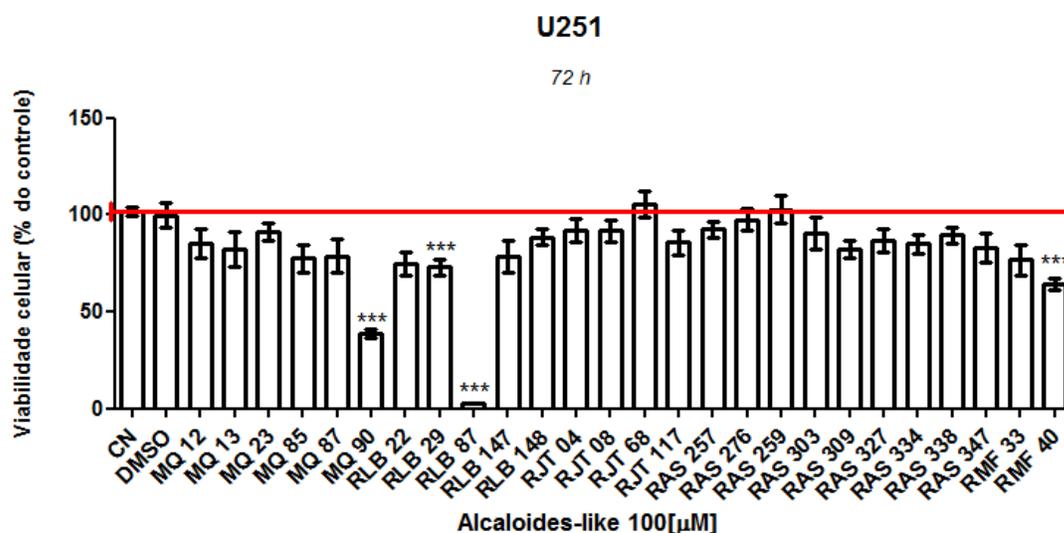


Figura 11 Triagem do efeito citotóxico dos alcalóides sintéticos na linhagem de glioblastoma humano (U251) através do teste do MTT. Células foram analisadas após 72 horas de exposição ao veículo (0.1% DMSO) e *alkaloids-like* a 100 µM. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste One-Way ANOVA, seguido do teste de Student-Neuman-Keuls para múltiplas comparações. \*\*\*= P < 0,001 para comparação com respectivo controle.

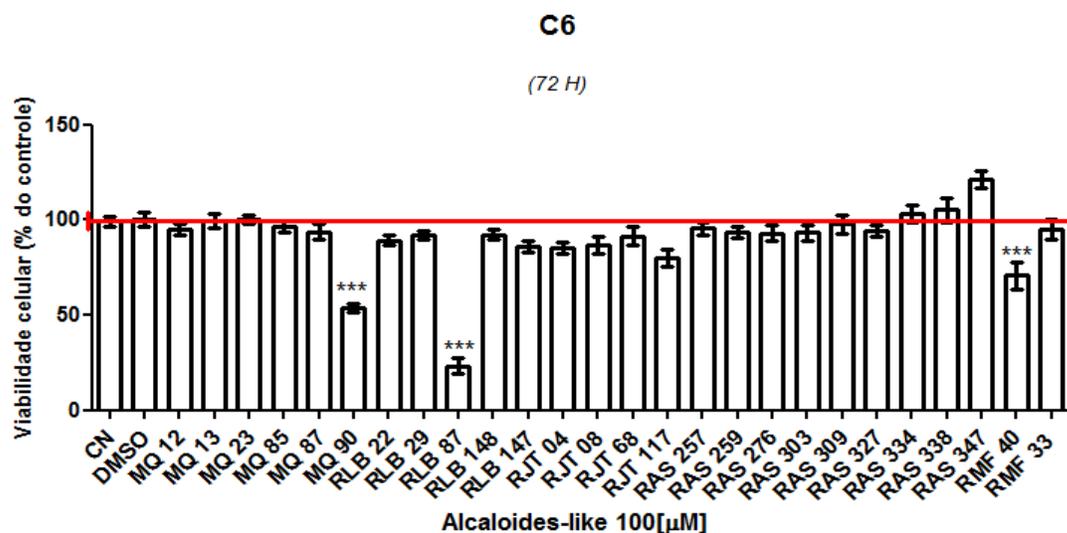


Figura 12 Triagem do efeito citotóxico dos alcalóides sintéticos na linhagem de glioma murino (C6) através do teste do MTT. Células foram analisadas após 72 horas de exposição ao veiculo (0.1% DMSO) e *alkaloids-like* a 100 µM. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste One-Way ANOVA, seguido do teste de Student-Neuman-Keuls para múltiplas comparações. \*\*\*= P < 0,001 para comparação com respectivo controle.

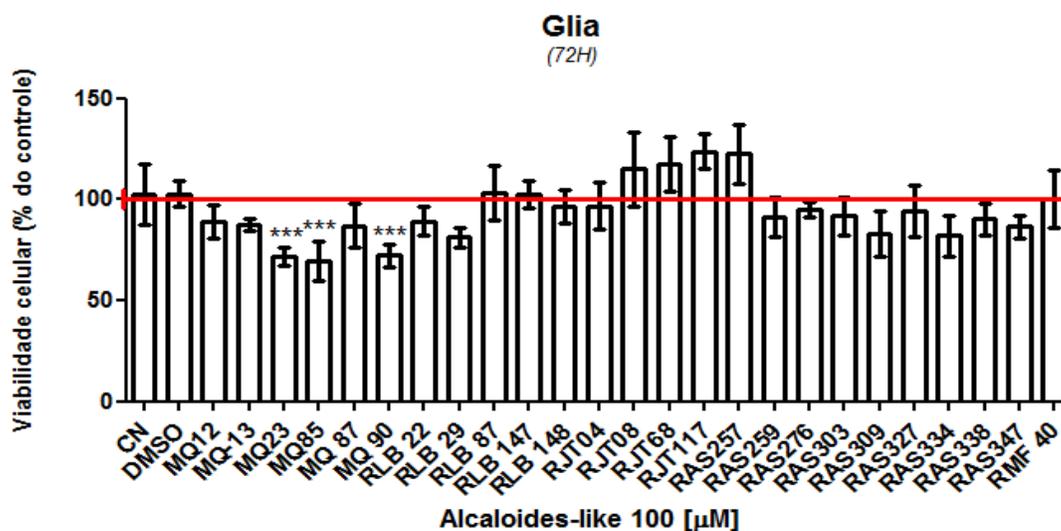
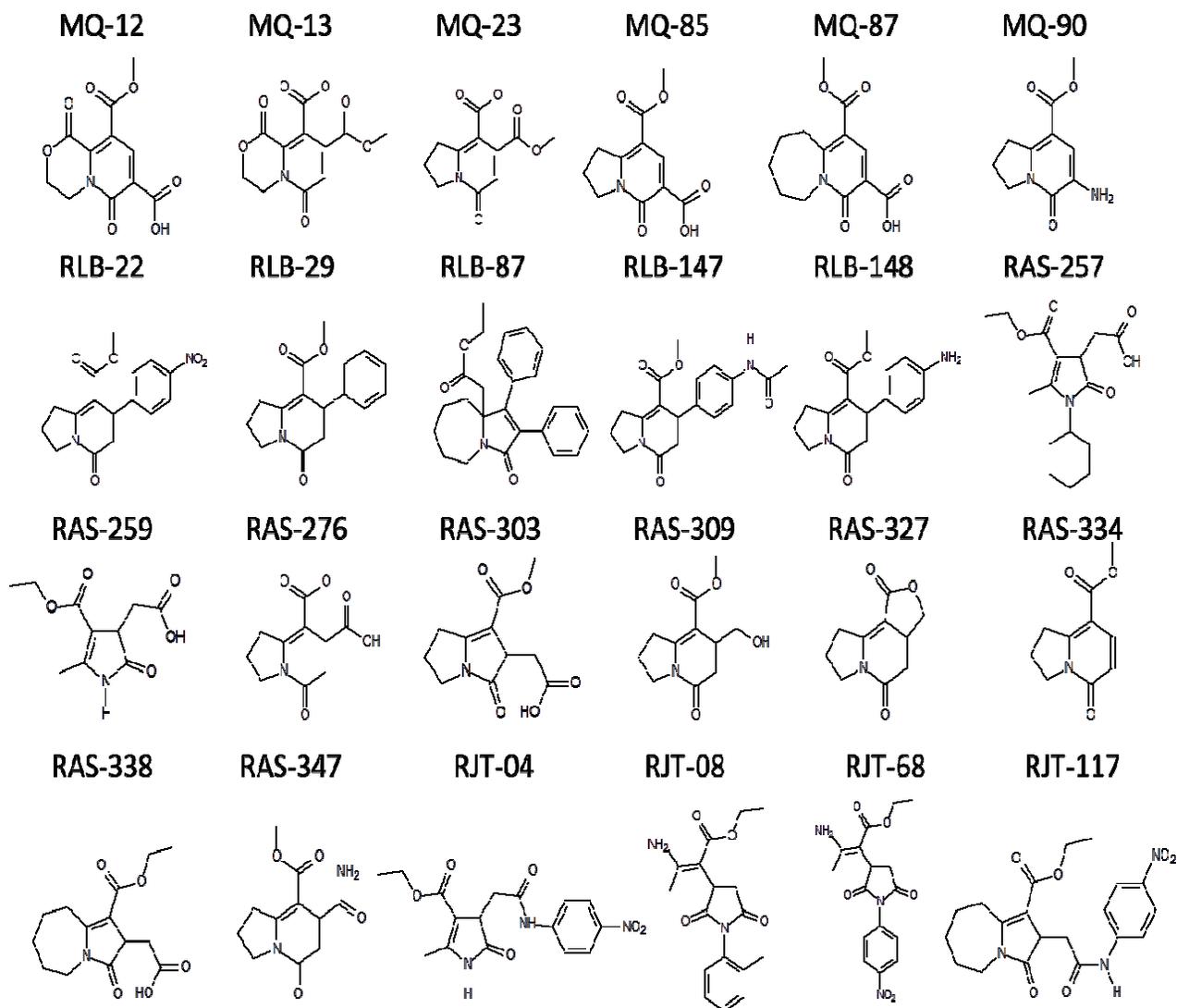
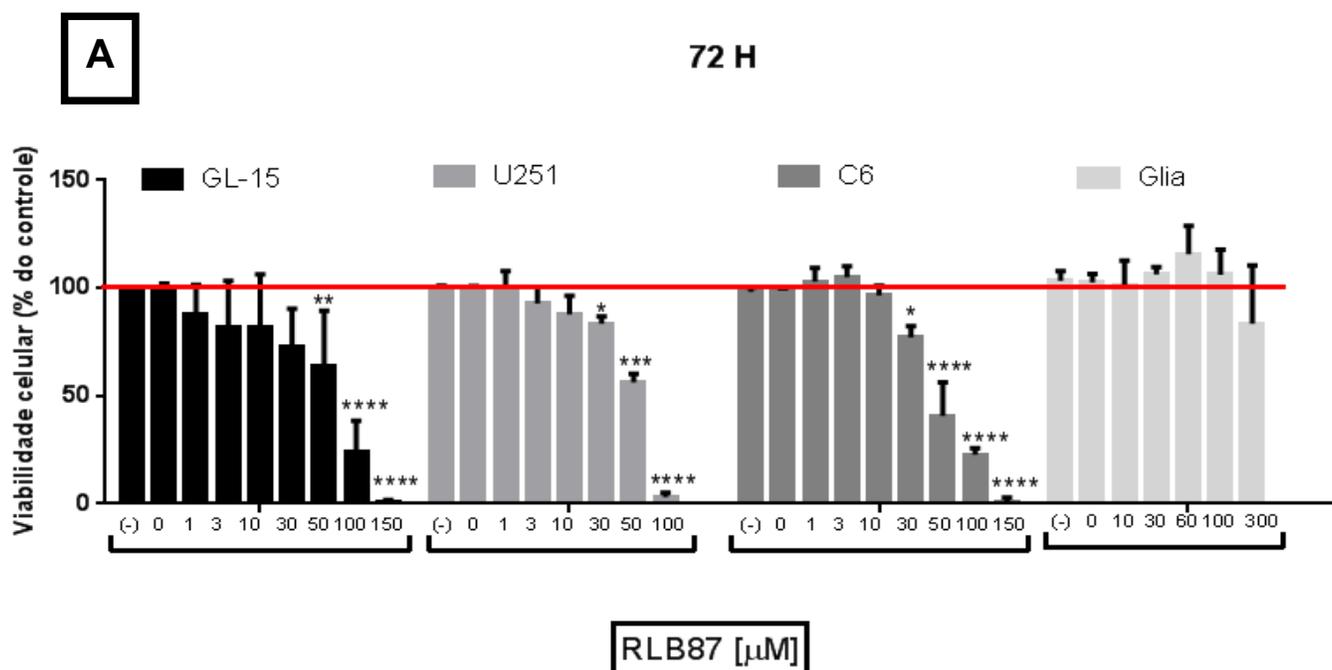


Figura 13 Triagem do efeito citotóxico dos alcalóides sintéticos na cultura primaria de Glia através do teste do MTT. Células foram analisadas após 72 horas de exposição ao veiculo (0.1% DMSO) e *alkaloids-like* a 100 µM. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste One-Way ANOVA, seguido do teste de Student-Neuman-Keuls para múltiplas comparações. \*\*\*= P < 0,001 para comparação com respectivo controle.

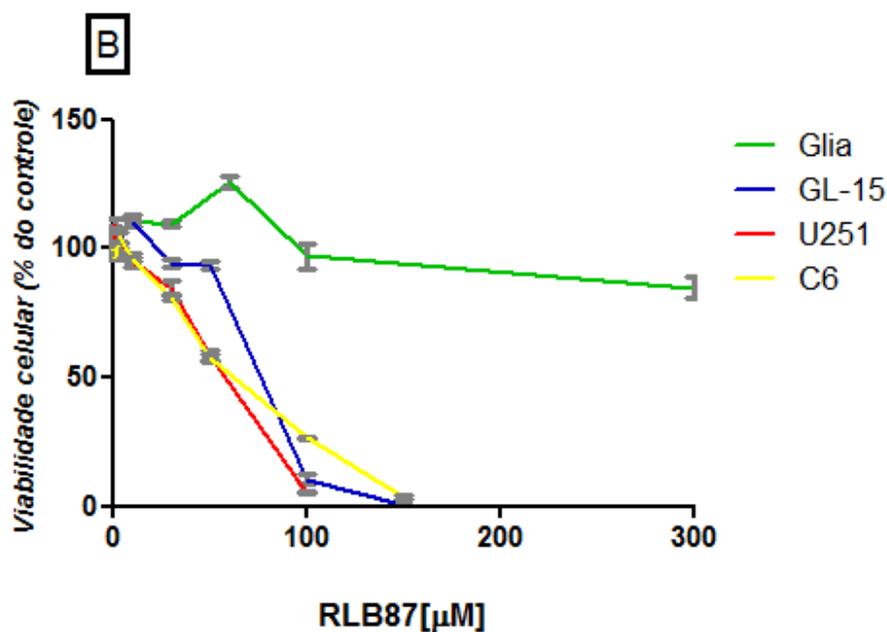


**Figura14** Estruturas dos *alkaloids like* utilizados nas prospecções das linhagens tumorais e cultura de células normais da glia.

Diante desses achados determinamos por MTT a curva dose resposta ao RLB87 nas linhagens tumorais e cultura de glia normal (Figura 15A e B) após 72 horas de tratamento. A IC50% do RLB87 foi calculada para as três linhagens através de regressão linear e corresponderam a 56,4  $\mu$ M, 51,4  $\mu$ M e 86  $\mu$ M para as linhagens GL-15, U251 e C6, respectivamente, cujas equações utilizadas foram disponível pela biblioteca do programa estatístico Graphpad. A prospecção das moléculas revelou que o *alkaloid-like* RLB87 apresenta potencial efeito antitumoral nas linhagens em concentrações micromolares e apresentando sensibilidade a partir da dose de 30  $\mu$ M (U251 e C6) e 50  $\mu$ M (GL-15). Como parâmetro de quimiosensibilidade das três linhagens testadas realizou-se o mesmo teste do MTT para verificar a ação citotóxica do quimioterápico TMZ. Todas as linhagens foram resistentes ao TMZ comparado ao efeito do RLB87, sendo a mais resistente a linhagem GL-15, resistindo a concentrações de 1mM da TMZ (Figura 16), enquanto que as linhagens U251 e C6 mostraram sensibilidade a partir da dose de 30  $\mu$ M (U251) e 1.000  $\mu$ M (C6). Apesar de apresentar sensibilidade à citotoxicidade é moderada quando comparada ao observado pelo RLB87 nessas linhagens

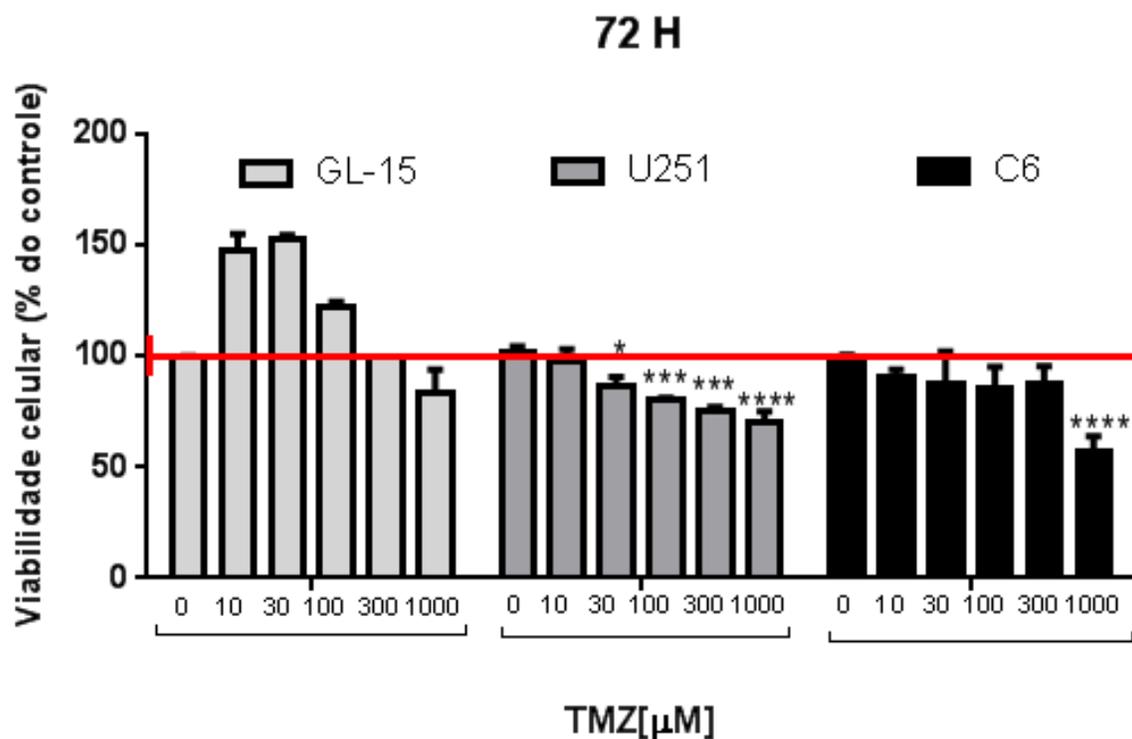


**Figura 15 (A) Análise da viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15 e U251), glioma murino (C6) e astrócitos normais de rato após tratamento com RLB87 em concentrações crescentes após 72 h de exposição. A partir da concentração de 30 $\mu\text{M}$  houve redução na viabilidade das células tumorais a 72 horas, enquanto os astrócitos não apresentaram viabilidade reduzida ao RLB87 nas condições e dose testadas. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste *One-Way ANOVA*, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. \* =  $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$ , \*\*\*= $P < 0,001$  e \*\*\*\*= $P < 0,0001$ . Foram analisados três experimentos diferentes (n=8/cada)**



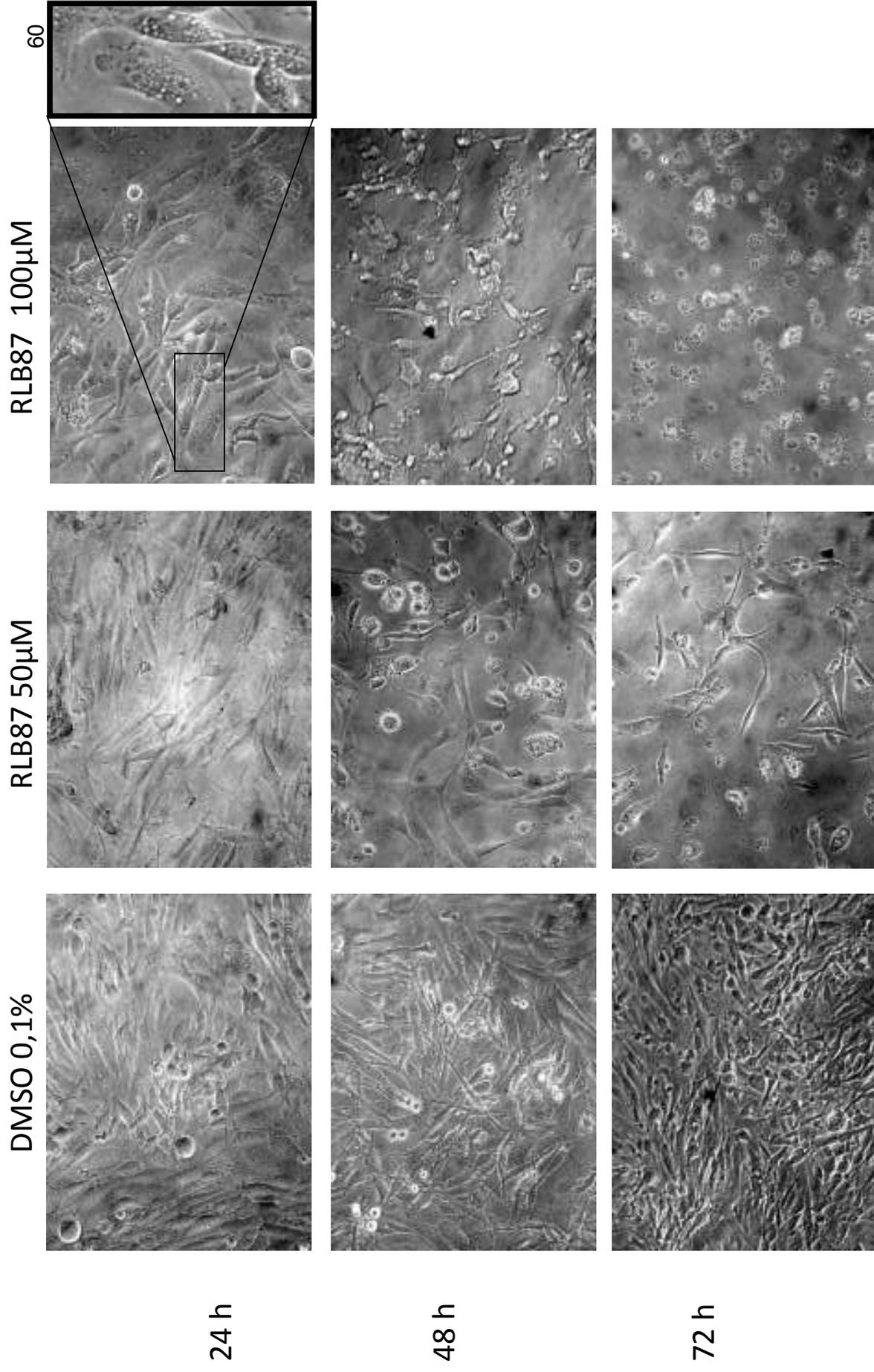
IC50( $\mu\text{M}$ )	Média	SD
GL-15	56,43	$\pm 13,48$
U251	51,44	$\pm 1,42$
C6	86,03	$\pm 2,66$

**Figura 15 (B) Curva dose resposta do RLB87 nas linhagens tumorais (GL-15, U251 e C6) e Cultura primaria de Glia após 72 h de exposição.** As curvas são resultado de regressão não linear dos dados apresentados na figura 9(A). Foram considerados os experimentos com  $R^2 \geq 0.9$ . Tabela com os Valores do IC50 determinados nas diferentes linhagens para o *alkaloid-like* RLB87. Media e SD=desvio padrão de três experimentos diferentes.

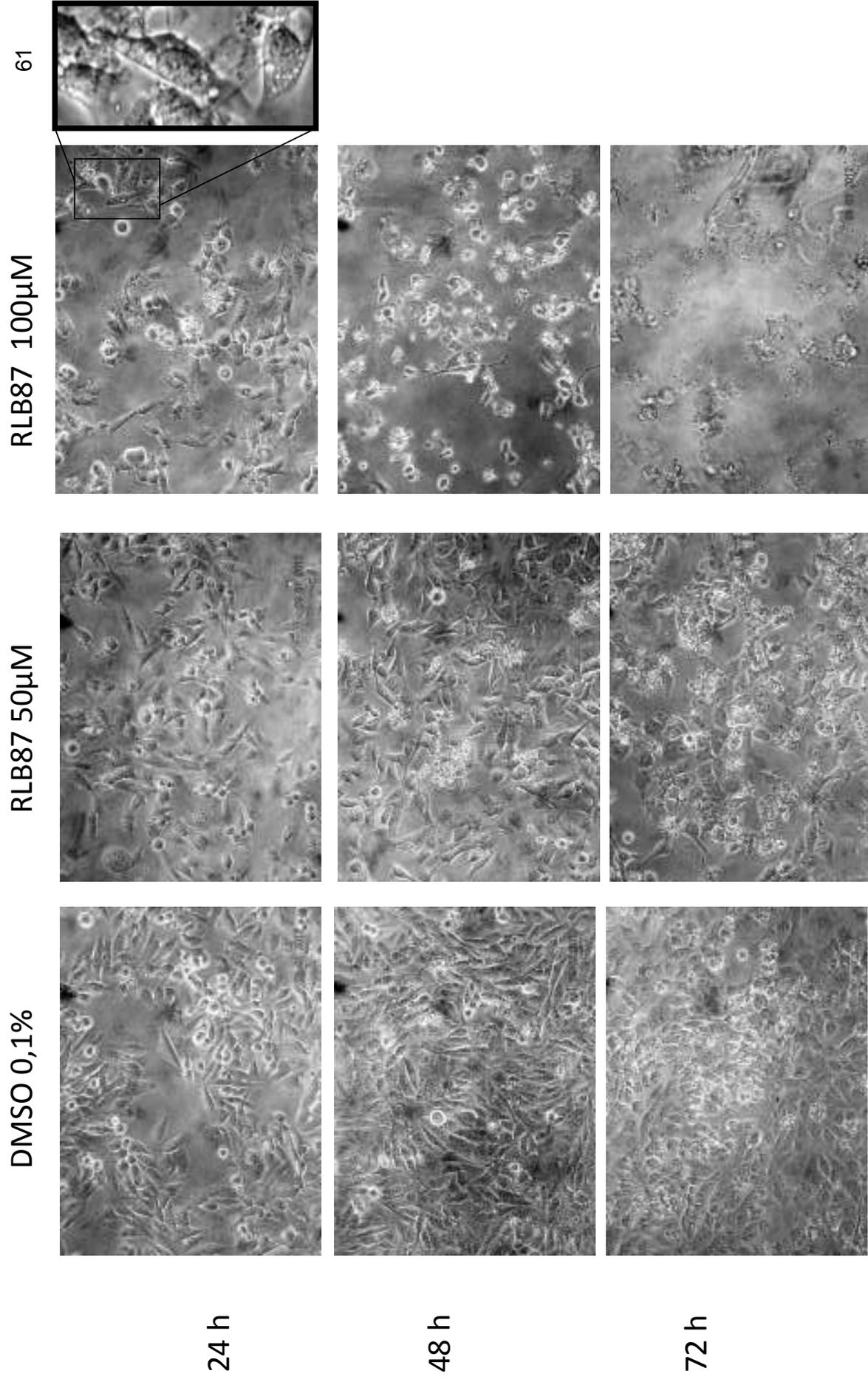


**Figura 16** Análise da viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15 e U251) e glioma murino (C6) após tratamento com TMZ em concentrações crescentes após 72 h de exposição. A linhagem GL-15 apresentou resistência ao quimioterápico, a C6 apresentou sensibilidade a 1mM e a U251 a partir de 30µM. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste Two-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. \* =  $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$ , \*\*\*= $P < 0,001$  e \*\*\*\*=  $P < 0,0001$ . Foram considerados três experimentos independentes.

As culturas foram fotografadas em microscopia com contraste de fase ao longo do tempo de tratamento com *alkaloid-like* RLB87 (24, 48 e 72 horas), nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  nas linhagens tumorais e na cultura primária de glia nas concentrações de 60 e 100  $\mu\text{M}$  (Figuras 17, 18,19 e 20), sendo observadas alterações após tratamento com o RLB87 na morfologia, distribuição celular e proliferação das células ao longo do tempo e em função da concentração. Em ambas culturas GL-15 (Figura 17) e U251 (Figura 18) Observou-se mudanças morfológicas, com células inicialmente vacuolizadas e aumento do citoplasma (24 horas de tratamento) e em seguida redução citoplasmática e proliferação reduzida juntamente com corpos celulares flutuantes (48 horas de tratamento), finalizando com 72 horas de tratamento a observação de poucas células sobreviventes, com aspectos morfológico vacuolizado, muito debris celular e corpos flutuantes refringente ou não. Esses eventos foram na concentração de 100 $\mu\text{M}$  mais evidentes, já na de 50 $\mu\text{M}$  observou-se de forma mais tardia, enfatizando a condição dose-dependente. Na C6 (Figura 19) as mudanças foram observadas também ao longo do tempo na celularidade, distribuição e a 48 horas houve maior evidencia de células vacuolizadas na concentração de 100 $\mu\text{M}$  e dessa forma apresentando fenômenos morfológicos anteriormente descritos, porem de forma tardia em relação as outras culturas. Na figura 20 visualizamos as imagens da cultura primária de glia. Observa-se a existência de tipos celulares diversificados e que a contingencia, distribuição e proliferação celular não é alterada sobre condições de tratamento ao longo do tempo, mostrando-se refrataria ao tratamento ao RLB87, no entanto observamos um aumento de células com aspecto estrelado que alguns autores já descreveram esse fenômeno e o mesmo pode ocorre por diversos estímulos, como alteração do pH ou agente como PMA, aumento do segundo mensageiro AMPc, inibição da enzima Rho-kinase entre outros fármacos (RODNIGHT e GOTTFRIED, 2013)



**Figura 17 - Fotomicrografia da linhagem GL-15 ao longo do tempo. Imagem retirada a 24, 48 e 72 horas após o tratamento com RLB87 a 50 e 100μM e nas condições controle (DMSO a 0,1%). Objetiva 20x 0,20.**



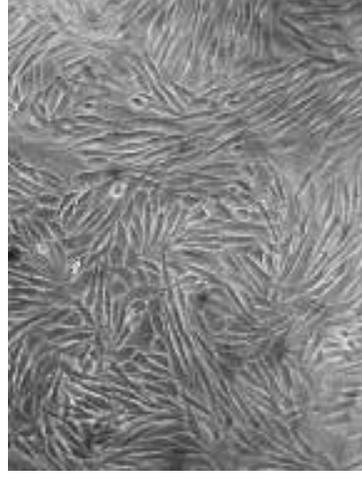
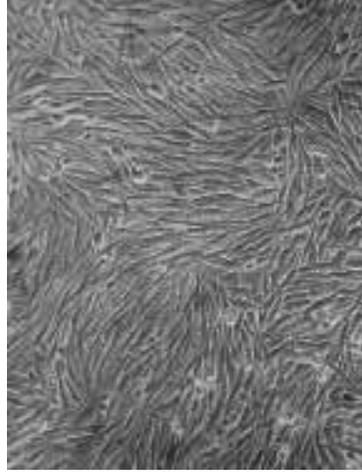
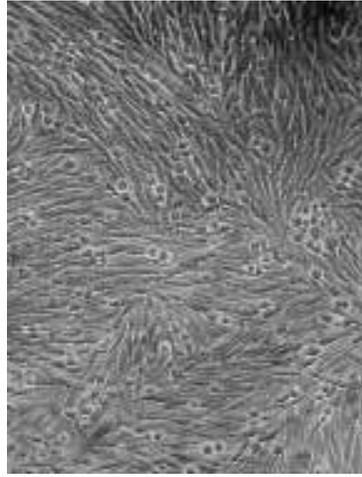
**Figura 18 - Fotomicrografia da linhagem U251 ao longo do tempo.** Imagem retirada a 24, 48 e 72horas após o tratamento com RLB87 a 50 e 100μM e nas condições controle (DMSO a 0,1%). Objetiva 10x 0,20.

DMSO 0,1%

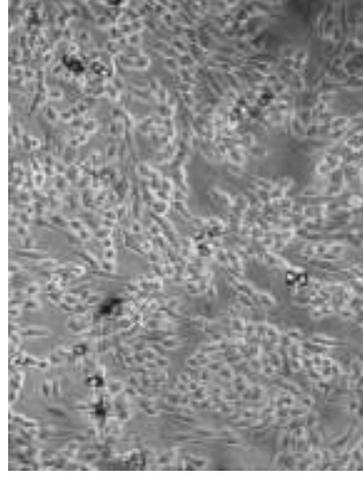
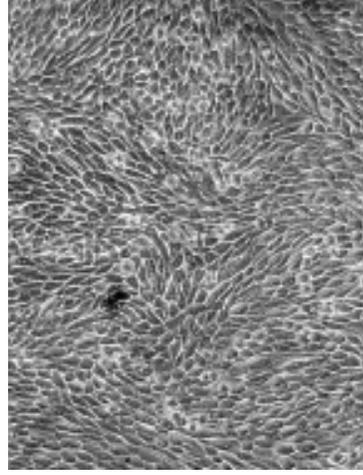
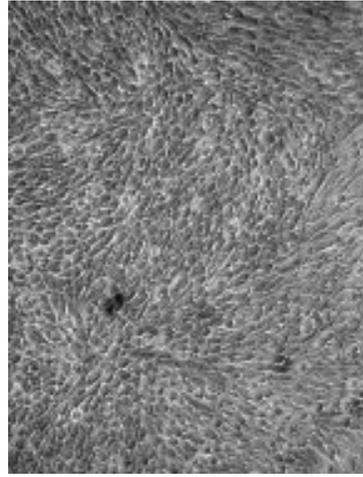
RLB87 50 $\mu$ M

RLB87 100 $\mu$ M

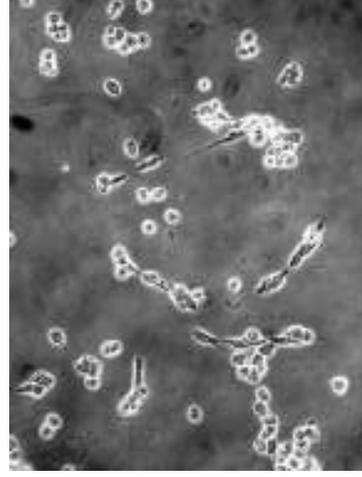
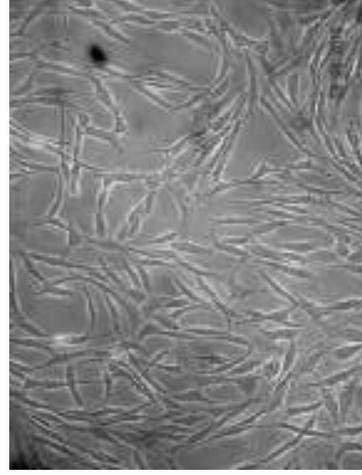
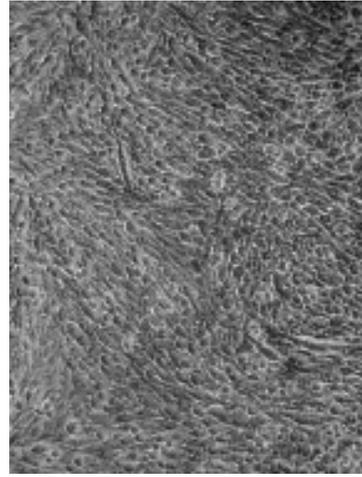
62



24 h



48 h



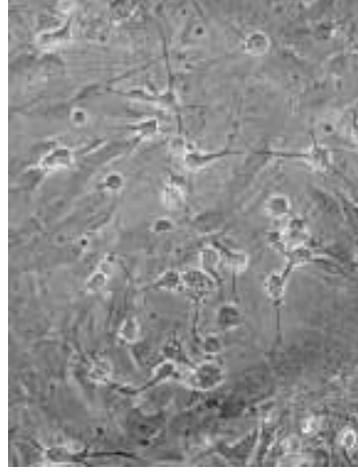
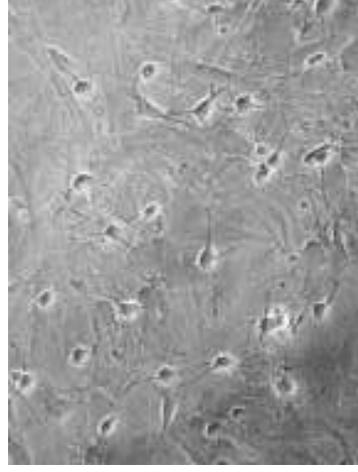
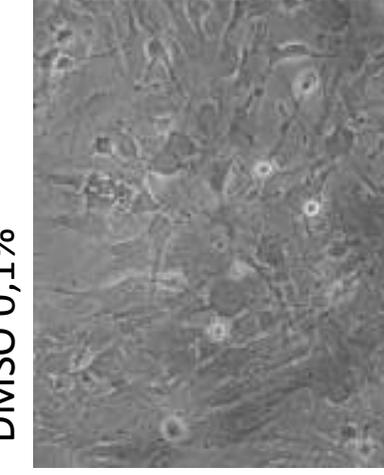
72 h

**Figura 19 - Fotomicrografia da linhagem C6 ao longo do tempo.** Imagem retirada a 24, 48 e 72 horas após o tratamento com RLB87 a 50 e 100 $\mu$ M e nas condições controle (DMSO a 0,1%). Objetiva 10x 0,20.

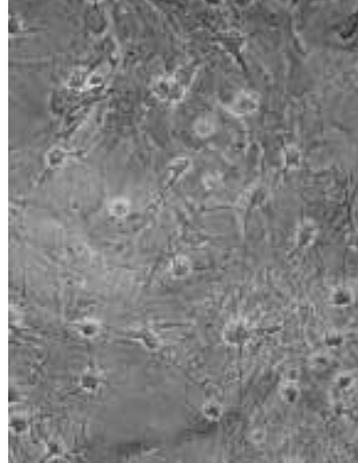
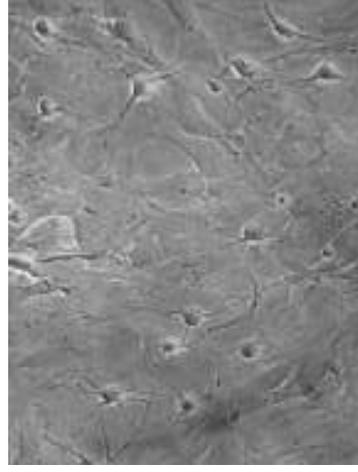
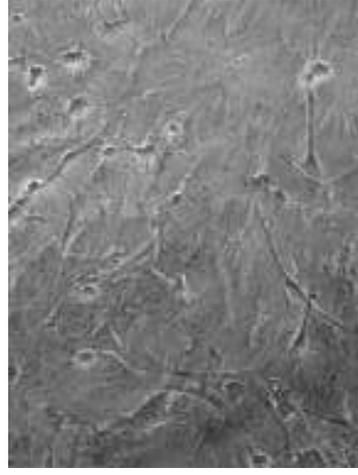
DMSO 0,1%

RLB87 60 $\mu$ M

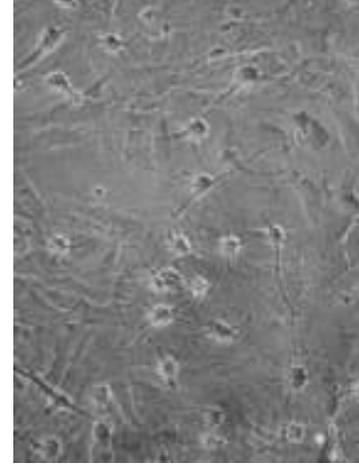
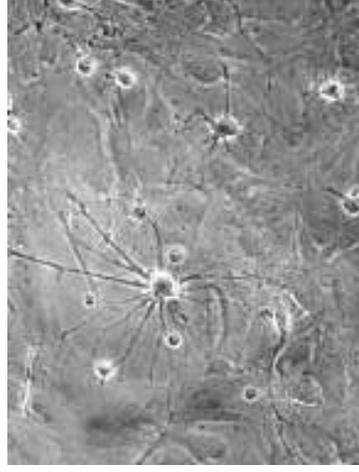
RLB87 100 $\mu$ M



24 h

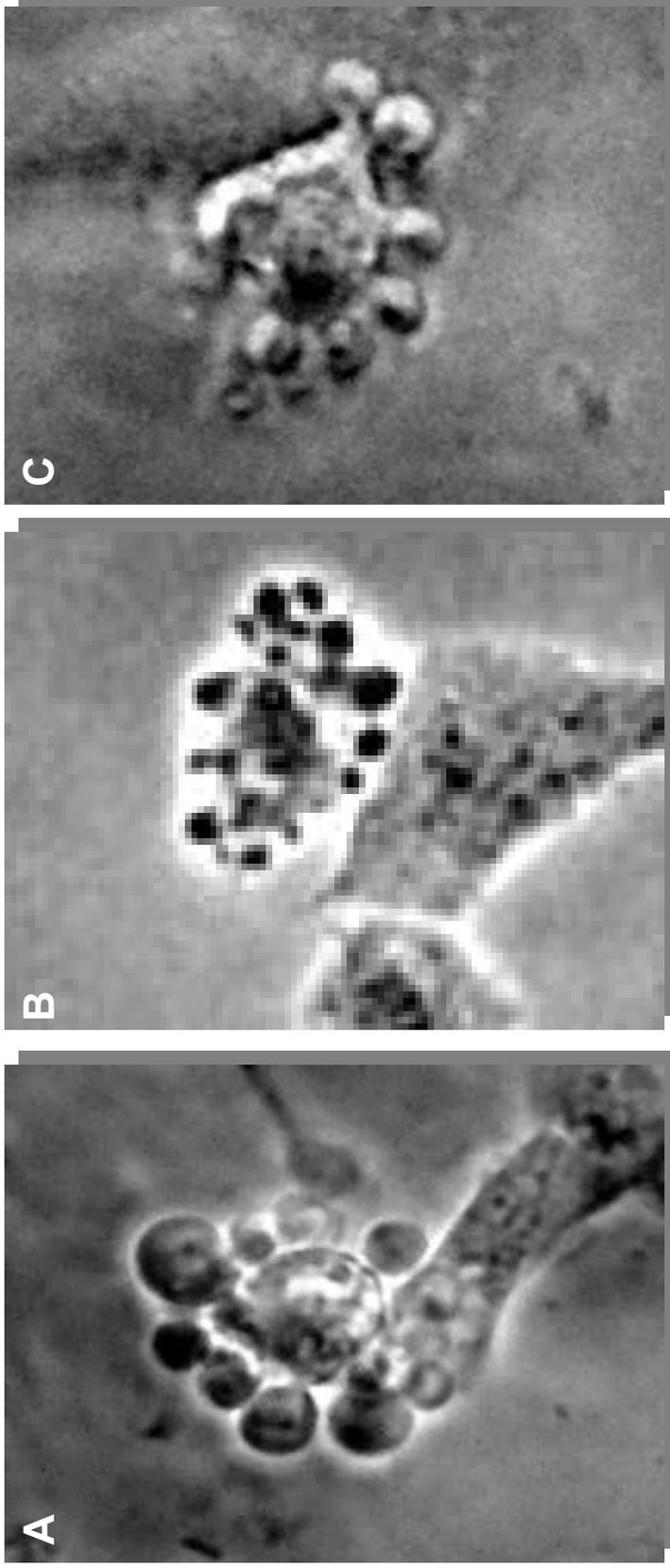


48 h



72 h

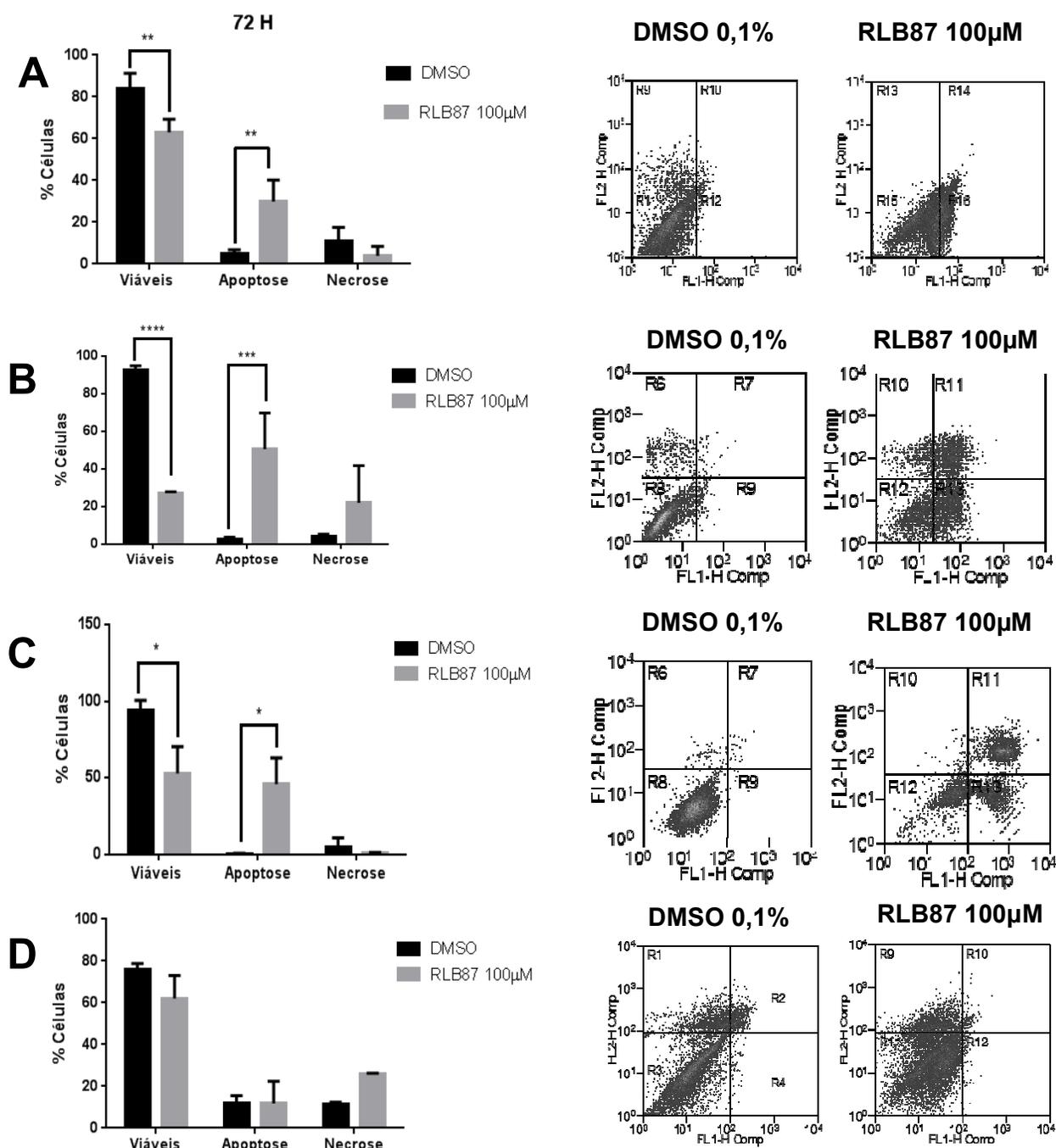
**Figura 20- Fotomicrografia da cultura primária de astrocito/microglia de ratos wistar ao longo do tempo. Imagem retirada a 24, 48 e 72horas após o tratamento com RLB87 a 50 e 100 $\mu$ M e nas condições controle (DMSO a 0,1%). Objetiva 20x 0,20..**



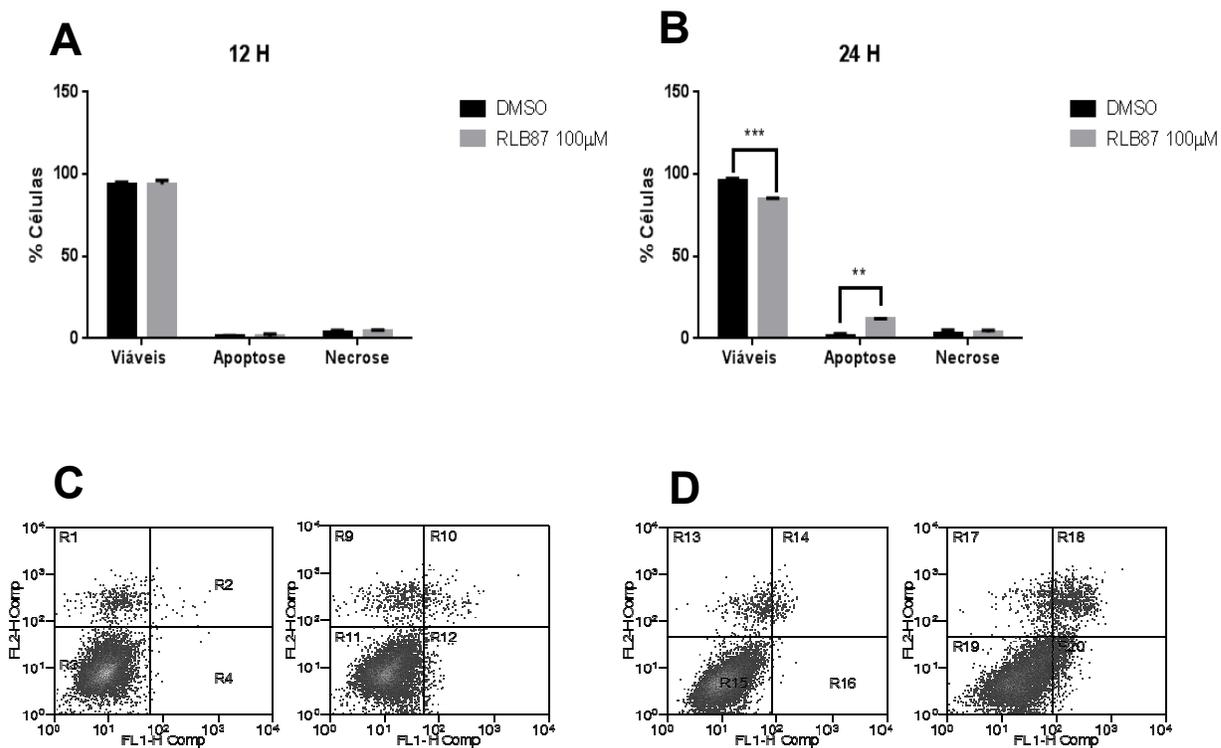
**Figura 21 - Fotomicrografia das linhagens tumorais, em (A) U251, (B) C6 e (C) GL-15. Imagem retirada a 24 horas (U251 e C6) e 48 horas (GL-15) após o tratamento com RLB87 a 100µM na Objetiva 20X. Realizou-se um recorte na imagem e aplicou um zoom no editor de imagem Adobe CS3 para demonstração da morfologia alterada de uma unidade celular do campo.**

Observou-se também que as células tumorais em resposta ao tratamento, apresentaram morfologia aparente de apoptose (Figura 21), o qual sobre condições de aumento se vê a formação de vários corpos apoptóticos em células tumorais em 24 horas (C6 e U251) e 48 horas (GI-15) em vários campos aleatórios. Para comprovação da hipótese da ocorrência de morte por apoptose após tratamento com o *alkaloid-like* RLB87 as culturas foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio e a quantificação feita por citometria de fluxo. Verificamos que a morte celular provocada pelo tratamento de fato ocorre por apoptose e não por necrose nas linhagens tumorais (Figura 22 A, B e C). Como controle negativo, os astrócitos (Figura 22-D) foram avaliados também nas mesmas condições que as células tumorais após 72 horas de tratamento, e não apresentaram morte celular significativa, nem por apoptose e nem por necrose; o esclarecimento de que a cultura primária é sensível a esta técnica foi obtido após a tripsinização e centrifugação das culturas e surgimento de um contingente de células mortas por necrose tanto no controle como no tratado.

Após a confirmação da morte por apoptose, analisamos apenas na linhagem C6, sobre um tempo de exposição menor, para determinar se esse efeito era tempo dependente (Figura 23 A-D). Observou-se que as doses de 100  $\mu$ M não apresentaram toxicidade em 12 horas após tratamento, mas que a partir de 24 horas começa induzir um aumento no número de células mortas por apoptose, representando 11,6 % das células nesse processo, o que evidencia um efeito tempo dependente.

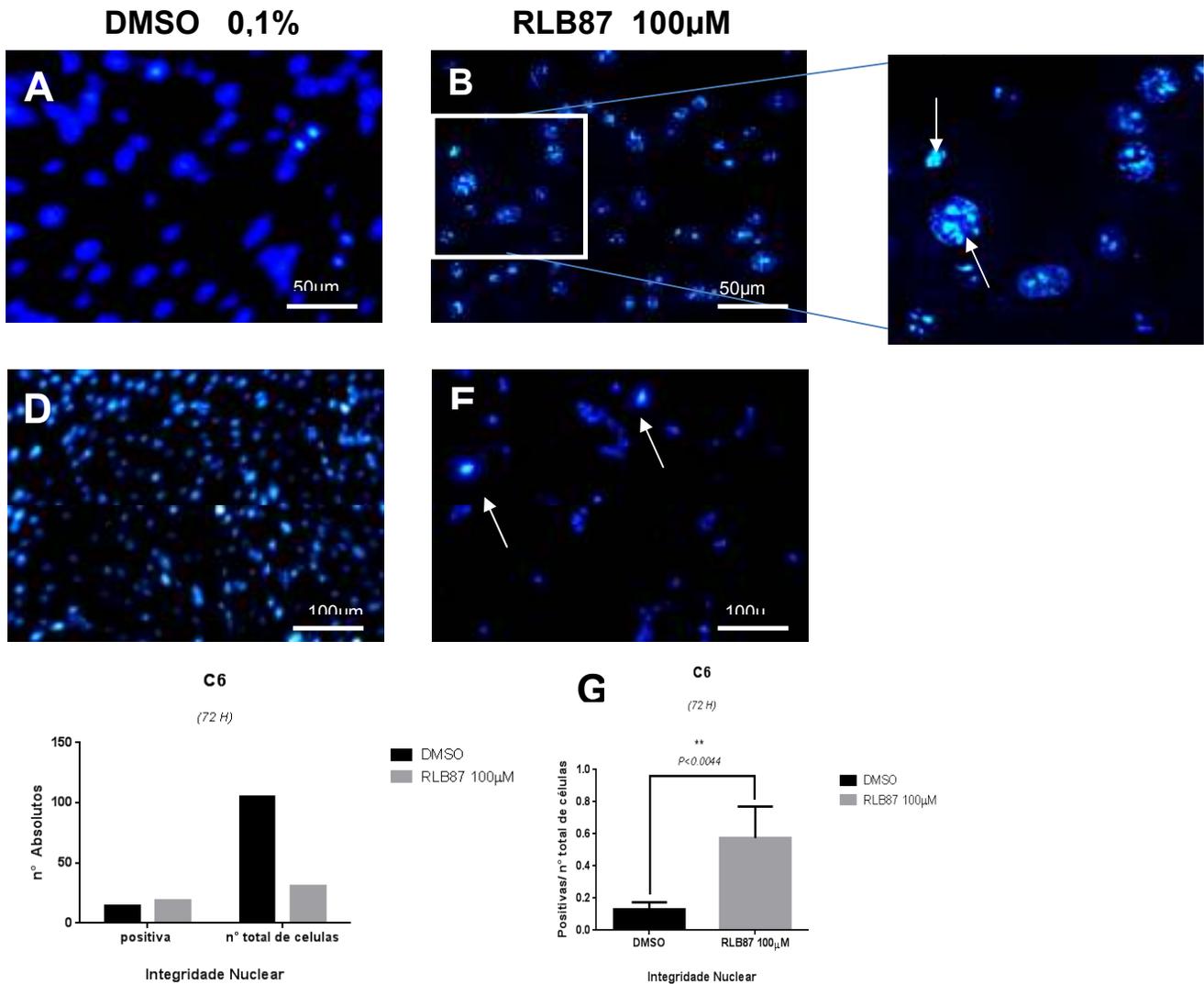


**Figura 22-Análise por citometria de fluxo da morte celular provocada pelo *alkaloid-like* RLB87 após 72 horas de exposição nas linhagens tumorais (GL-15, U251 e C6) e cultura primária de Glia. Análise por dot-plot representada em quatro quadrantes. No quadrante inferior esquerdo se encontra as células negativas para anexina e iodeto de propídio (células viáveis). No quadrante inferior direito células positivas para anexina V e negativas para iodeto de propídio (células em apoptose inicial) No quadrante superior esquerdo se encontra as células negativas para anexina e positivas para iodeto de propídio (células em necrose). No quadrante superior direito se encontra as células positivas para anexina e positivas para iodeto de propideo (células em apoptose tardia). Gráficos foram gerados de dois a três experimentos independentes e foi feita a Análise estatística pelo teste Two- way seguido pelo pós-teste de Sidak múltiplas comparações. \*= $P < 0,05$ , \*\*= $P < 0,01$  e \*\*\*= $P < 0,001$ .**



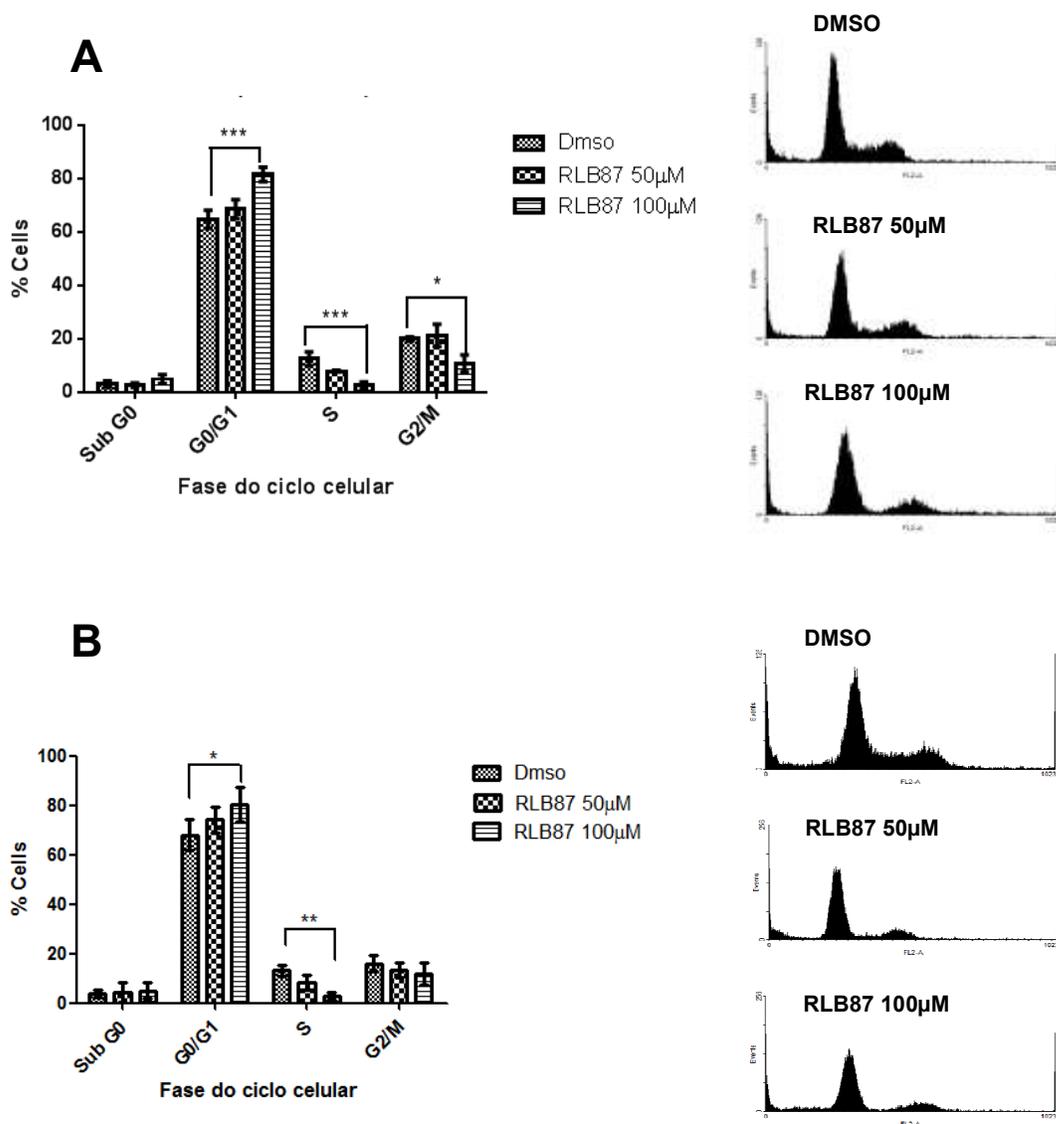
**Figura 23** Análise por citometria de fluxo da morte celular provocada pelo *alkaloid-like* RLB87 após 12 e 24 horas de exposição na linhagem tumoral C6. Em (A) o gráfico referente a 12 horas de tratamento, não houve alteração da viabilidade e (B) 24 horas começa apresentar morte por apoptose. Em (C) o dot-plot representativo de 12 h e (D) o dot-plot representativo de 24 h. Análise estatística feita pelo teste Two-Away seguido pelo pós-teste de Sidak múltiplas comparações \*\*= $P < 0,01$  e \*\*\*= $P < 0,001$ .

Fizemos também após 72 horas a avaliação da integridade nuclear das células tratadas nas mesmas condições, através de análise da cromatina nuclear com o corante intercalante de DNA Hoestch 33258 (Figura 24 A-G). A análise da Integridade nuclear mostrou condensação do núcleo, (evidenciado pelas setas brancas), fragmentação da cromatina celular com extravasamento nuclear, características de processo apoptótico (Fig 24. A-E), no entanto essas características não foram observadas nas células que permaneceram em condições controle. Esses eventos foram contabilizados em ambas condições (controle e tratado) e geraram um gráfico de números absolutos e outro gráfico relativo ao número de células positivas/ número de células totais (Fig 24 F-G)..



**Figura 24 Análise da fragmentação da cromatina nuclear na linhagem C6 após 72 horas de tratamento com RLB87.** Em (A) e (D) veem-se os núcleos C6 em condições controle. Objetiva de 20X escala=50µm Em (B) e (E) veem-se os núcleos C6 tratados com RLB87 a 100µM após 72 h Objetiva de 10X escala =100µm. Todos corados com o agente intercalante Hoechst 33258. (C) Imagens sobre aumento referente a região em destaque da fotomicrografia (B). Em (F) gráfico gerado da contagem em n° absolutos de células na condição controle e tratada. Em (G) Gráfico gerado com dados do Gráfico (F) valores da taxa relativa = (células Positivas a condensação da cromatina/n°total de células na imagem). Foram contabilizadas 8 imagens de objetivas diferentes (20X e 40X). Imagens tratadas com o Editor adobe CS3 para 90% de contraste e saturação e foi considerado núcleo fragmentado os que apresentaram dupla tonalidade de azul.

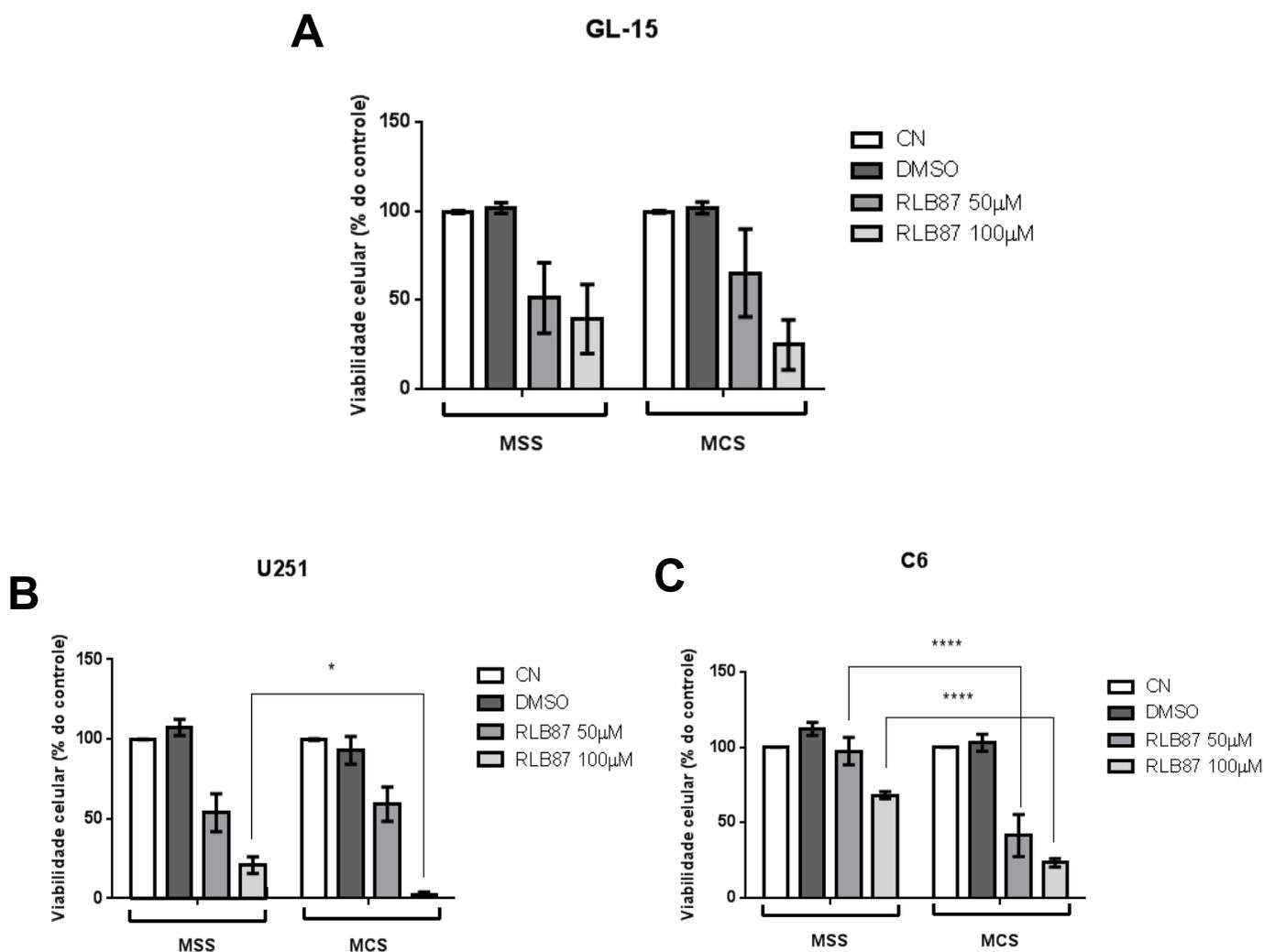
A próxima análise foi avaliar o efeito do *alkaloid-like* RLB87 a 50 e 100 $\mu$ M sobre o ciclo celular, após a exposição de 24 h na linhagem C6. Essa avaliação partiu-se do princípio que muitos alcaloides possuem o histórico de interferência no ciclo celular e a observação do ciclo celular durante as 24 horas iniciais de tratamento seria válido para determinar se o efeito da droga seria citostático nesse período, já que não foi observada muita morte celular. Essa Análise foi feita sobre duas condições: (1) *Condição com privação de SFB*, a cultura foi privada de soro fetal bovino um dia antes da modulação; (2) *Condição não privado de SFB*: foi modulada sem privação previa e todo processo até aquisição foi na presença de SFB. Observam-se na Figura 25 (A-C) os resultados expressos em gráfico e histograma, representativo de três experimentos independentes. Em ambas as condições o *alkaloid-like* RLB87 induziu parada na fase G0/G1 apenas na dose de 100 $\mu$ M, e com isso diminuiu a entrada das células nas fases subsequentes (S e G2/M), esse interferência se torna mais evidente na condição sincronizada.



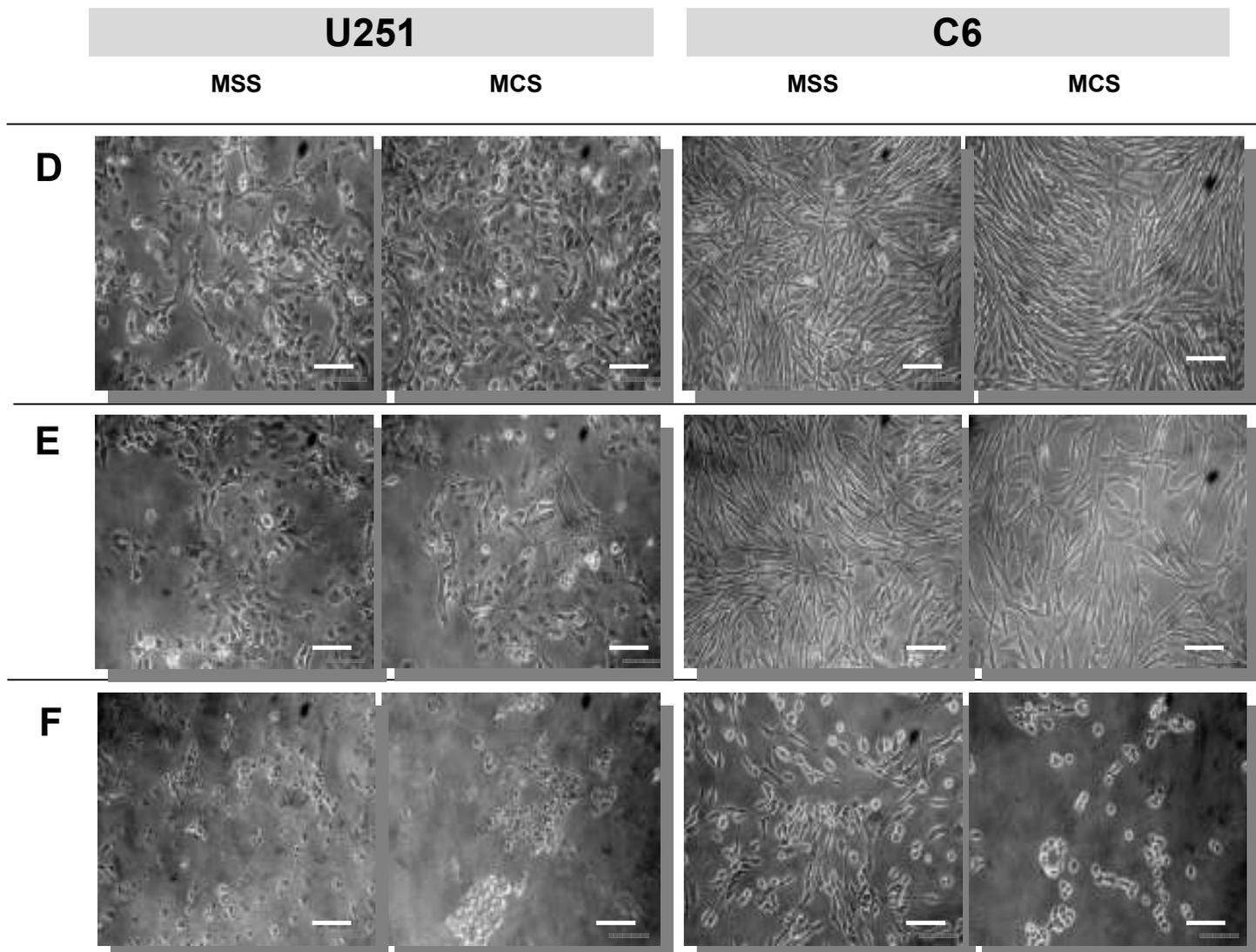
**Figura 25** Estudo da distribuição das células nas fases do ciclo celular após 24 h tratamento, com diferentes concentrações do *alkaloid-like* RLB87. Em (A) Condição SFB (-) e (B) condição SFB +. É possível observar dados representativos dos três experimentos independentes realizados e a quantificação do percentual de células em Sub-G0, G0/G1, S e G2/M, da esquerda para a direita, respectivamente. O número de eventos registrado pelo equipamento foi interpretado como número de células coradas pelo iodeto de propídeo. A direita histogramas representativos dos três experimentos. Análise estatística realizada pelo teste Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Sidak múltiplas comparações. \*=P<0,05, \*\*=P<0,01 e \*\*\*=P<0,001.

Durante o processo de aquisição das amostras para o ciclo celular observou-se que as células nas condições *sincronizadas* apresentavam a população de Sub-G0 menor que na condição *não sincronizada* quando foi tratada por 48 horas (dados não mostrados). Nesse contexto foi realizada a avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT, após 72 horas de tratamento com privação de SFB, nas concentrações de 50 e 100µM do *alkaloid-like* RLB87, em todas as linhagens tumorais. Na figura 26 (A) temos o gráfico da linhagem GL-15, (B) U251 e (C) C6. Os resultados mostraram que as linhagens U251 e C6 se apresentaram resistente ao tratamento em comparação ao tratamento com SFB.

Na ausência do SFB (MSS-Meio Sem Soro) as células apresentam resistência ao efeito citotóxico induzido pelo *alkaloid-like* RLB87, onde na C6 isso foi observado em ambas às concentrações e na U251 somente a 100µM. A GI-15 não apresentou diferença significativa e isso acreditamos devido ao alto desvio que os experimentos apresentaram, já que a mesma possuiu uma população bastante heterogênea. Na figura 27 vemos as imagens da cultura com SFB e sem SFB das duas linhagens U251 e C6 ao longo do tempo.



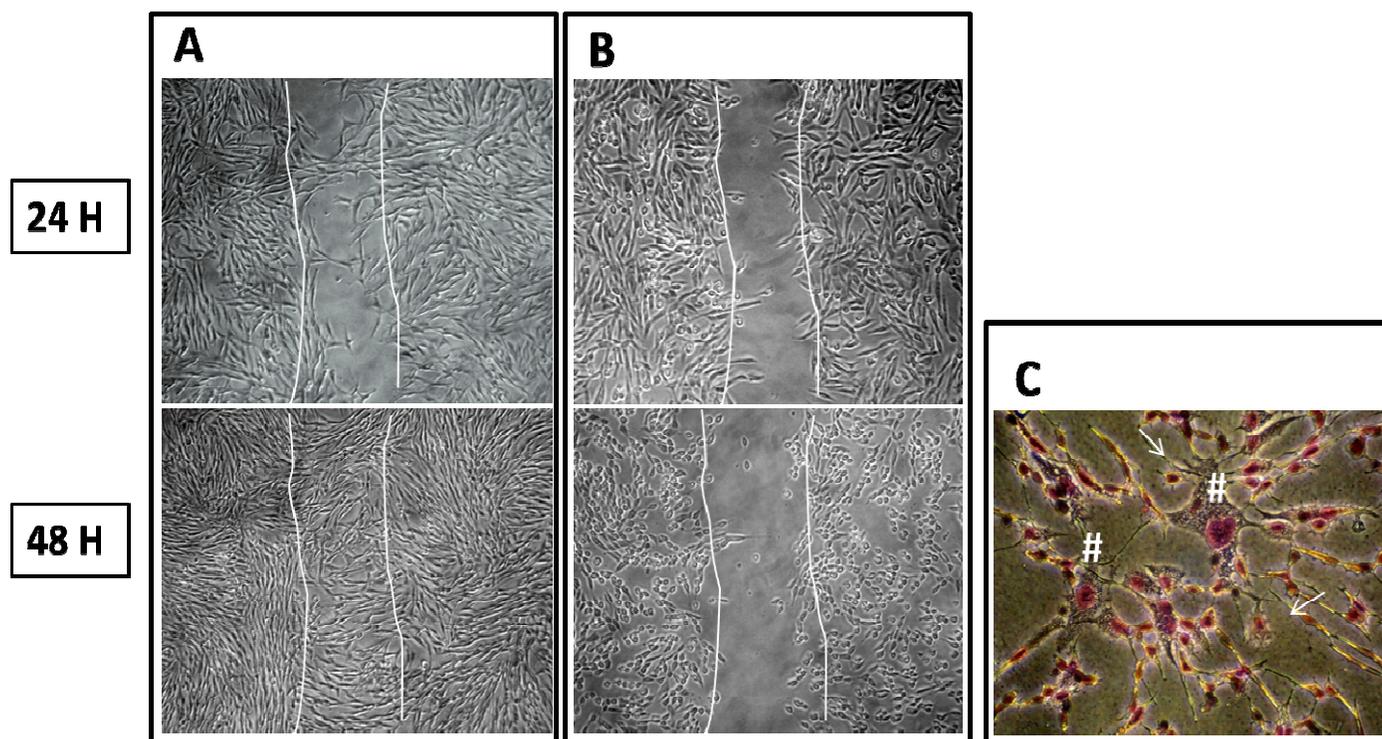
**Figura 26. Análise do efeito do SFB na viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15 e U251) e murinho (C6) após tratamento com RLB87 em concentrações (50-100µM) após 72 h de exposição. (A)-GL-15 em (B)- U251 e em (C)-C6. Os gráficos são de três experimentos independentes A linhagem GL-15 não apresentou alteração na viabilidade na presença ou ausência de SFB enquanto que U251 e C6 apresentaram. MSS- Meio Sem Soro; MCS- Meio Com Soro. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste Two-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. \*=P<0,05, \*\*=P<0,01 e \*\*\*=P<0,001.**



**Figura 27- Fotomicrografia da cultura após 72 h de exposição ao Alkaloid-like RLB87 nas duas condições MSS- Meio Sem Soro; MCS- Meio Com Soro das linhagens U251 e C6 na Obj10X Scala=100 $\mu$ m. Na linha D-DMSO a 0,1%, E- RLB87 a 50 $\mu$ M e F- RLB87 a 100 $\mu$ M. As linhagens apresentaram alterações na viabilidade na presença ou ausência de SFB**

Entretanto devemos considerar na interpretação desse resultado que o controle das células na condição MSS não prolifera como o Controle na condição MCS, como pode ser observado claramente na imagem e que graficamente repercutir em diminuição na morte celular, pois os valores da porcentagem são gerados se considerando o controle 100% e em relação ao mesmo os tratados, com isso podemos gerar a hipótese de que na condição MSS está ocorrendo um efeito citostático mais potente e esse dado analisado em conjunto com ciclo celular, onde foi verificada uma parada na fase G0/G1 mais evidente quando em condições sem SFB, corroboram com essa hipótese.

Investigamos se estes efeitos também poderiam se associado a um potencial anti-migratório. Dessa forma foi realizado o ensaio de migração por lesão na monocamada celular e registrado em 24 h e 48 h após o tratamento sobre privação de SFB. Na figura 28, coluna (A) Verificou que em condição controle (DMSO 0,1%), já nas primeiras 24 h após início do experimento, as células invadem a região da lesão, e 48 h após observa-se o total fechamento da mesma. No entanto, como podem ser verificadas na coluna (B), as culturas tratadas com *alkaloid-like* RLB87 a 100 $\mu$ M, existe claramente a manutenção da região da lesão ao longo das 24 e 48 h após o tratamento. Associado a este efeito foi também evidenciado após coloração com Rosenfeld que RLB87 induz uma mudança na morfologia das células, sendo visualizadas células com formato pentagonais, mais arredondadas de tamanho variável, algumas com citoplasma contraído, outras com citoplasma estendido contendo inúmeros vacúolos, em comparação as células em condição controle, que apresentam formato alongado tipo fibroblasto. Após 72 h de tratamento a região da lesão não estava mais delimitada possivelmente devido a promoção de morte celular (dado não mostrado).



**Figura 28-** Análise da atividade antimigratória do *alkaloid-like* RLB87 a 100µM ao longo de 48 horas de tratamento. Na coluna A temos a condição controle, 24 e 48 horas, observa-se o total fechamento da lesão. Na coluna B vemos o tratado com 100µM de RLB87, observa-se a manutenção da região da lesão com 24 e 48 horas. Em (C) células coradas com Rosenfeld, tratadas com RLB87 após 48 horas de exposição a 100µM na objetiva de 40X, as (→) estão indicando células de reduzido tamanho, arredondadas e poligonais, as (#) indicam células vacuolizadas com núcleos gigantes.

Uma vez caracterizada a ação do *alkaloid-like* RLB87, que este demonstrou potencial antitumoral *in vitro*, partiu-se para a investigação da relevância de grupamentos químicos da estrutura molecular dessa droga. Para isso, foram sintetizados compostos relacionados ao RLB87, como mostrado na figura 29 e juntamente a eles o RMF40 que agora será chamado de análogo **4**. As seguintes modificações foram realizadas no intuito de se avaliar a importância da estrutura cíclica, grupos funcionais e localizações regioisoméricas. Em (A e B) foi realizada a redução do tamanho do anel de 7 membros para 5 membros, resultando em anéis pirroolidínicos (análogo **3** e análogo **4**). Adicionalmente nesses dois análogos **3** e **4** (estruturas bicíclicas) o anel funcionalizado é regioisomérico ao RLB87. Em (C e D) foi realizada a remoção do anel de 7 membros, resultando nas estruturas monocíclicas (análogo **6** e análogo **7**). Por fim foi avaliada a influência de substituintes da cadeia lateral onde temos A-função éster, B-função hidrazida, C-função éster e D-função cetona.

O teste do MTT foi utilizado como triagem da atividade biológica dos compostos, que foram usados em concentrações crescentes (1-1.000  $\mu\text{M}$ ) após 24 h e 72 horas e testados na linhagem de glioma humano GL-15. O resultado mostrou que as moléculas apresentam efeito tempo- e dose-dependente e níveis de citotoxicidade diferentes (Figura 30). As IC<sub>50</sub> foram determinadas para os tratamentos a 72 h (Figura 31) e observamos que o análogo **6** foi o que apresentou a menor dose necessária para inibição de 50% da viabilidade das células em cultura. Enquanto que o análogo menos ativo foi o **3**. Nenhum dos análogos apresentou maior atividade citotóxica que o RLB87, evidenciando a importância do anel pirrolo-azepínico na relação com a estrutura e atividade desse composto.

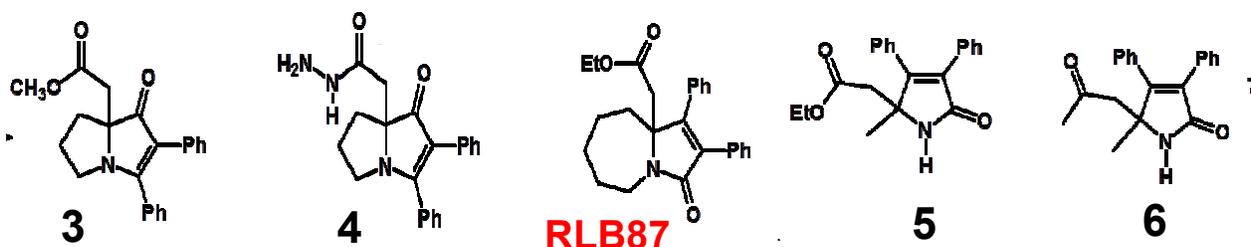
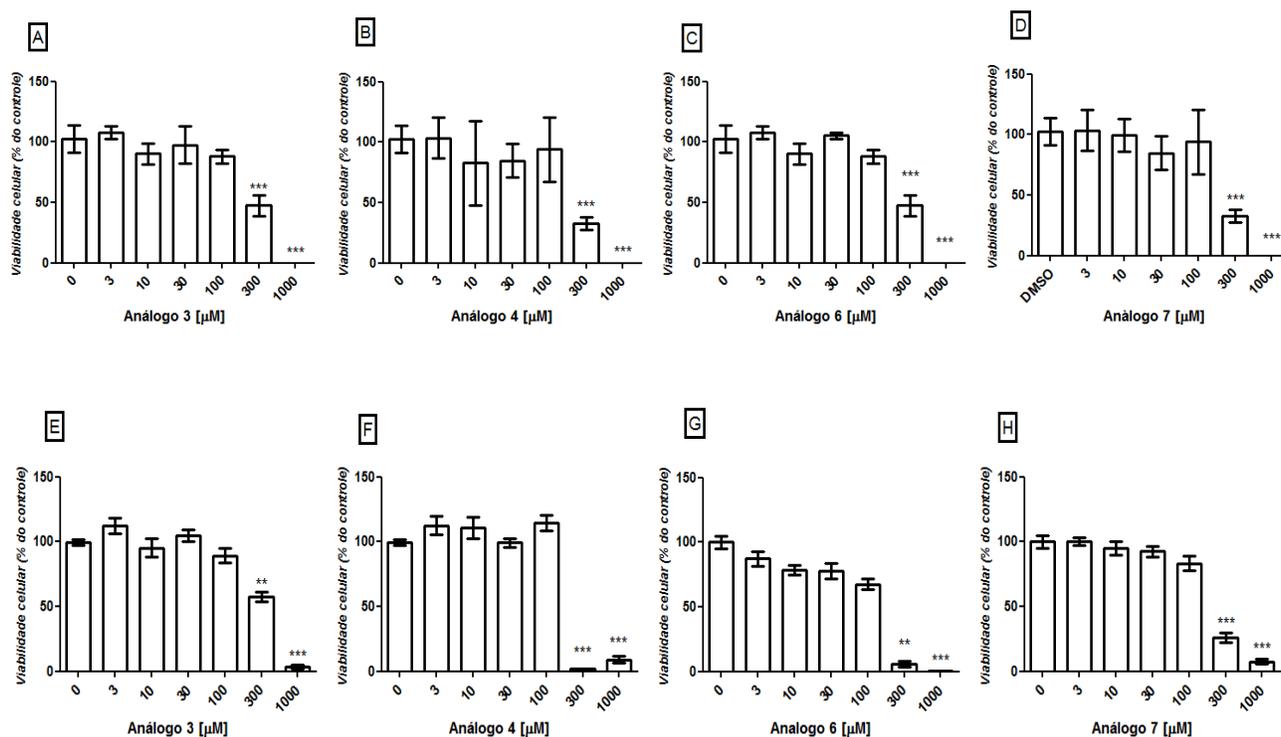
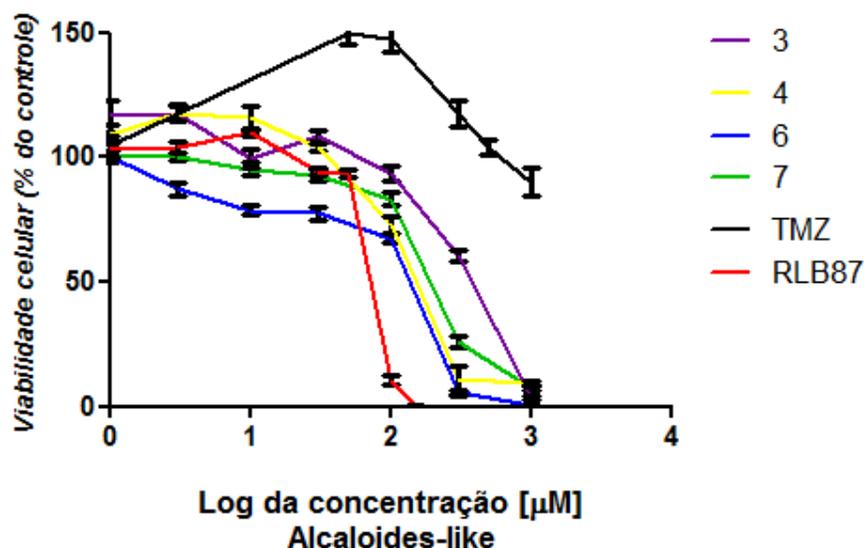


Figura 29 – Estrutura dos análogos do RLB87



**Figura 30-Análise da viabilidade celular (pelo teste do MTT) de células de glioblastoma humano (GL-15), pós-tratamento com análogos do *alkaloid-like* RLB87 em concentrações crescentes e dois tempos de exposição (24 e 72 h).** (A-D): análises realizadas em 24 h de exposição; (E-G): análises realizadas em 72 h de exposição. A partir de 30 0μM houve redução significativa da viabilidade das células tumorais nos dois tempos (24 e 72 h) em todos os tratamentos. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste one-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações para os que dados apresentaram distribuição normal; para os que dados não apresentaram distribuição normal foi feito o teste de Kruskal walli. \*\* =  $P < 0,05$ , \*\*\*=  $P < 0,001$  para comparação com respectivo controle (DMSO 0,1%).

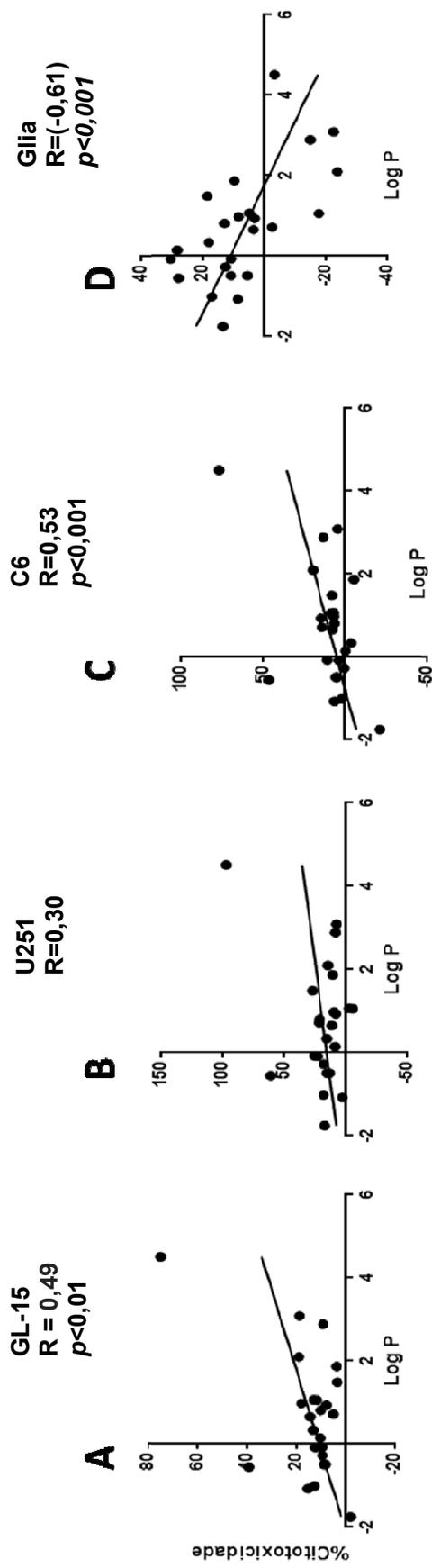


Análogos	Media (CI50) [µM]	DP
3	345	± 13,08
4	255,7	± 1,69
6	147	± 0,56
7	185,3	± 4,31
RLB87	56,4	± 13,8
TMZ	ND	ND

**Figura 31 – Análise do efeito dose-resposta após 72 h de exposição aos análogos do RLB87 e TMZ. Curvas dose resposta na linhagem GL-15; as curvas são resultado de regressão não linear dos dados apresentados na figura 22(A). Foram considerados os experimentos com  $R^2 \geq 0.9$ . Valores do EC50 dos análogos do RLB 87; os valores foram expressos pela media e desvio padrão de três experimentos diferentes. ND= Não foi possível calcular o EC50 da Temozolomida nessa linhagem, porque a mesma não promoveu toxicidade na dose de 1mM.**

A solubilidade também é um parâmetro importante que está relacionado a estrutura dos compostos, a biodisponibilidade e atividade dos mesmos. O Coeficiente de Partição óleo/água (LogP) descreve a relação das concentrações do fármaco na fase orgânica e fase aquosa, sendo assim utilizado como um parâmetro de solubilidade e biodisponibilidade. Compostos lipofílicos têm valores de LogP positivos e altos, enquanto que compostos hidrofílicos possuem valores negativos.

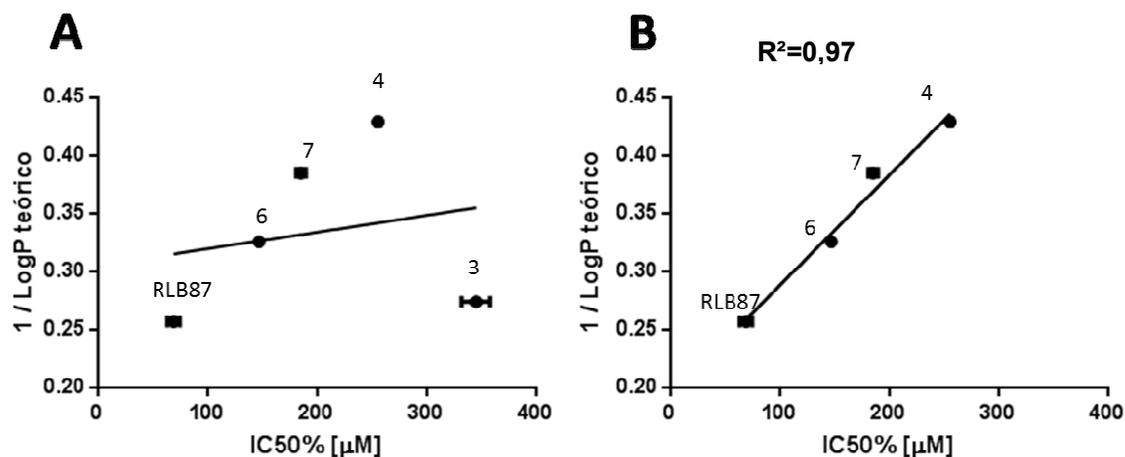
Nesse contexto foi determinado o LogP dos análogos e dos outros compostos (24 *alkaloids-like* da prospecção) e realizado uma análise estatística da correlação com o valor do LogP teórico e a citotoxicidade que esses compostos promoveram nas linhagens tumorais e na cultura de células normais de Glia no tempo de 72 h e concentração 100µM. Na figura 32(A-D) temos os gráficos da correlação nas linhagens tumorais humanas (GL-15 e U251), murina (C6) e na cultura de Glia respectivamente. Os gráficos foram gerados com dados da citotoxicidade aos 24 *alkaloids-like* testados e os análogos de RLB87. Os Rs de Pearson foram considerados como valor da correlação e quanto maior esse valor mais positiva a correlação, quanto menor mais negativa a correlação. Observou-se correlação positiva nas linhagens GL-15 e C6, no entanto a U251 não teve significância nem positiva nem negativa e de forma interessante, na cultura de Glia, a correlação foi negativa. Essa análise preliminar mostrou uma correlação moderada a baixa sobre as características da solubilidade das moléculas esta correlacionada a sua atividade citotóxica. Essa análise foi realizada com os valores da prospecção e por tanto se limitou apenas na concentração de 100µM, no entanto seria interessante ter se verificado em outras concentrações, para a observação da manutenção ou aumento da correlação ou simplesmente verificação de ausência de correlação, ficando este resultado como dado preliminar que demonstra uma tendência a correlação positiva.



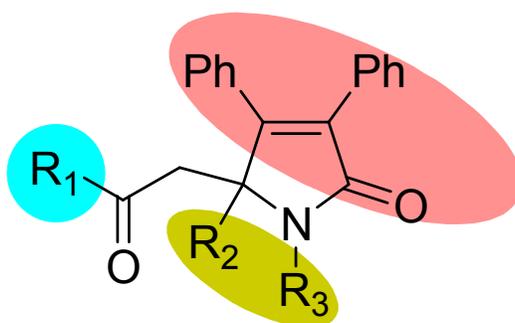
**Figura 32-**Análise da correlação da citotoxicidade a 100 $\mu$ M por 72 horas de tratamento com o LogP teórico dos alcaloídeos-like nas linhagens tumorais humanas (GL-15 e U251) e murina (C6) e em células da glia. Análise de correlação foi realizada e o R de Pearson foi considerado nas análises com valores correspondentes de  $p < 0,01$ ,  $**p < 0,001$ .

Para as moléculas análogas e o RLB87, os quais foi realizado a curva dose resposta, verificamos a correlação entre os seus IC-50 e o  $1/\text{LogP}$  (o inverso do  $\text{logP}$ ). Os resultados mostraram uma alta correlação para três dos análogos estudados, os análogos **4**, **6** e **7** (Fig. 33). Essa correlação demonstrou nesses análogos que a lipofilicidade foi um fator importante para sua atividade e o aumento da sua citotoxicidade. No entanto o análogo **3** não apresentou correlação da atividade com a lipofilicidade, nos conduzindo para importantes reflexões.

. De acordo com esses conjuntos de dados, chegamos à seguintes proposta preliminar de relação estrutura e atividade dos compostos análogos ao composto RLB7. O primeiro aspecto é a importância da regioisomeria na atividade citotóxica, pois os análogos com regioisomeria idêntica ao RLB87 (Figura 34 - região em vermelho) apresentaram maior atividade antitumoral que os de regioquímica contrária. Desses dois análogos regioisoméricos (análogo 6 e 7), a presença da função éster na cadeia lateral do anel mostrou maior atividade que a função cetona (região em azul da figura 34). A rigidez do anel bicíclico provavelmente não é o fator preponderante para a atividade citotóxica, já que os análogos 3 e 4 apresentam o anel pirrolizidínico, que confere rigidez à molécula, e no entanto esses análogos não apresentaram maior citotoxicidade que os análogos monocíclicos 6 e 7.



**Figura 33- Análise da correlação do 1/LogP com a CI50% após 72 horas de tratamento com RLB87 e os análogos 3, 4, 6 e 7 na linhagem tumoral humanas (GL-15). Em (A) o gráfico gerado com todos os análogos testados e o análogo 3 não apresenta correlação com atividade e solubilidade. Em (B) o gráfico gerado sem o análogo 3 apresentando alta correlação com atividade e solubilidade. Análise feita por regressão linear e análise de correlação, valor do  $r^2$  expresso no gráfico e na correlação  $r$  de Pearson acusou perfeita linha.**



**Figura 34-Análise de estrutura, relação e atividade.**

## 6. DISCUSSÃO

Este estudo apresentou o RLB87, um composto de estrutura relativamente simples, como um promissor quimioterápico para gliomas malignos, por apresentar alta atividade citotóxica em culturas altamente resistentes e por atuar de forma seletiva, sem dano a células gliais normais do tecido nervoso central nessa análise *in vitro*. Após a prospecção das moléculas as linhagens tumorais apresentaram sensibilidade a este composto à partir de 30  $\mu\text{M}$  sendo que a concentração de 100 $\mu\text{M}$ , inibiu 95% da viabilidade celular na linhagem U251, que é uma concentração 10 vezes menor que aquela da TMZ necessária para induzir efeito citotóxico de 30%. Em nosso Grupo, OLIVEIRA (2012), utilizando as duas das linhagens adotadas no presente trabalho (GL-15 e C6), testou diferentes quimioterápicos e mostrou que apenas na concentração de 1.000  $\mu\text{M}$  a doxorubicina e o etoposídeo promoveram 75% e 95% de inibição da viabilidade, respectivamente. QIANG et. al. (2012), promoveu, por exposição crônica de células da linhagem U251 à TMZ, uma sub-linhagem quimioresistente com IC50 de 220,86 $\mu\text{M}$ , o que denota que os nossos modelos, que apresentaram resistência a dose de 1 mM, são também quimioresistentes.

A aplicação dos agentes antineoplásicos no tratamento do câncer é baseada no conceito da cinética celular, a qual inclui o ciclo de vida celular, o tempo do ciclo celular, a fração de crescimento e do tamanho da massa tumoral (PREHN, 1991). O tumor maligno é constituído por três grupos de células: as que se dividem ativamente nas fases G1, S, G2 e M; as paradas na fase G0; e as que perdem sua capacidade reprodutiva e estão morrendo ou já estão mortas, sendo as células que estão se reproduzindo ativamente as mais sensíveis à quimioterapia (KOZUSKO et. al., 2007).

Quando avaliamos a citotoxicidade do *alkaloid-like* RLB87 em condições com e sem SFB observamos um efeito de resistência da população celular em condições sem SFB em comparação com a condição com SFB. É sabido que na ausência do SFB as células entram em diminuição e ou parada de atividade cíclica, isso se deve à necessidade de fatores promotores do crescimento importantes presentes nesse suplemento (LINDGREN,1975). Existem evidencias que as linhagens adotadas neste estudo apresentam distintos perfis de ciclo celular e, portanto, acreditamos que esta característica esteja associada à diferença de sensibilidade ao *alkaloid-like* RLB87. A linhagem C6 se apresentou menos sensível ao RLB87 em condições de privação do SFB, gerando a hipótese que o grau de toxicidade do *alkaloid-like* é potencializado em células que se encontram em alta atividade cíclica. Esta condição pode também explicar a seletividade da droga em culturas de células de glioma em proliferação e não para culturas de células gliais, cuja a maioria deixam de se replicar em culturas densas [WESTERMARK, 1971 apud LINDGREN,1975]

Outro fator a ser considerado é que sobre as vias de regulação da transição da fase G0/G1 para S, que envolve diversas proteínas, como p53, pRb, CDKs (do inglês *Cyclin Dependent Kinases*), MDM-2 (do inglês *MDM2*) e CDKIs (do inglês *Cyclin Dependent Kinases Inhibitors*) (para revisão ver DONJERKOVIC e SCOTT, 2000), que em geral nas células tumorais se encontram inativadas, suprimidas ou alteradas por mutações em genes chave (OHGAKI e KLEIHUES, 2005). RADAELLI et. al. (2009) caracterizou mutações genéticas na linhagem U251 e mostrou a existência de mutações no gene *P53*, *PTEN* e deleções nos genes *P14* e *P16*, que codificam proteínas reguladoras das atividades das ciclinas, e cuja eliminação leva a perda da atividade da proteína retinoblastoma (FURNARI et al, 2007 ; FUEYO et al, 1996.; ISHII et al., 1999). Deleção no gene *P53* também já foram caracterizadas nas células humanas da linhagem GL-15

(COSTA et al., 2001). Por outro lado, a linhagem C6, um glioma murino quimicamente induzido, difere geneticamente das linhagens GBMs humanas, por apresentar expressão mínima da PTEN e a co-expressão do tipo selvagem da proteína p53, juntamente com a proteína mutada (ASAI et al., 1994), o que poderia estar atuando como agente protetor à droga.

A citotoxicidade ao *alkaloid-like* RLB87, observada pela perda da função mitocondrial, pode está relacionada à indução de morte por apoptose após 72 h do tratamento, de forma tempo dependente, em todas as linhagens de gliomas testados. Morte celular programada foi descrita há mais de 50 anos, porém o nome apoptose foi usado pela primeira vez em 1972. O termo tem origem grega, e remete à queda das pétalas das flores ou das folhas das árvores, em função da relativa semelhança com a fragmentação da membrana plasmática celular que se observa durante o processo apoptótico (KERR et. al., 1972). Apoptose é descrita como um mecanismo de morte “limpo”, no qual a célula, após receber algum sinal pró-apoptótico, dispara o processo de morte, sofrendo compactação e segregação da cromatina, condensação do citoplasma e encolhimento celular, fragmentação nuclear, fragmentação celular (blebbing da membrana) e, finalmente, fragmentação celular em corpos apoptóticos, que são fagocitados (ELMORE, 2007) eventos que foram observados após o tratamento com o RLB87.

O processo apoptótico pode ser disparado por duas vias, intrínseca ou extrínseca, a primeira envolvendo moléculas sinalizadoras de morte extracelulares e a segunda ativada quando a célula sinaliza algum dano ao DNA, estresse do retículo endoplasmático ou estresse oxidativo (RIEDL e SHI, 2004). As vias apoptóticas induzidas pelo RLB87, não foram caracterizados nesse trabalho, apenas observamos a

existência do fenômeno. No entanto, como observamos que o *alkaloid-like* também induz acúmulo das células na fase G0/G1, podemos inferir uma relação deste efeito com a cascata de sinalização para apoptose verificado por outros agentes, como descrito por RINGER et. al. (2010) testando a eficácia de VMY-1-103, um análogo do inibidor de ciclinas purvalonol B (grupo purina 2,6,9-trissubstituído), em inibir a proliferação celular em linhagens de câncer de próstata. VMY -1-103 aumentou tanto a proporção de células em G1 como os níveis de proteína p21CIP1, e em concentrações mais elevadas induziu apoptose através de polarização da membrana mitocondrial e diminuiu a indução de fosforilação de p53. ACHARYA et. al., (2009) mostrou associação da diminuição da expressão da Ciclina D1 e 3 por ação de uma glicoproteína T11TS em gliomas de ratos, com a promoção da parada no ciclo celular em G0/G1. Fibroblastos de embriões transgênicos de camundongo Knockout Ciclina D -/-, apresentaram um aumento nos níveis de apoptose e morte celular (Fu et. al., 2004), denotando que inibidores de ciclinas D1, uma importante proteína na regulação da continuação da fase G1-S, podem estar atuando na promoção do apoptose. Outra proteína PTEN, também está associada a regulação do ciclo e normalmente está mutada ou regulado negativamente em gliomas. Como descrito no trabalho de YUNQING et. al. (2009), a expressão induzida de PTEN inibiu completamente a progressão do ciclo celular na fase G0/G1, em células de glioma U87MG, sob estímulos do fator crescimento hepático –HGF.

Por outro lado, não podemos descartar a dissociação dos dois eventos, indução de apoptose *versus* parada do ciclo celular, tendo em vista que alguns estudos, como o desenvolvido por FESTA et. al. (2011) que descreveram a atividade do Xantohumol, um flavonoide derivado da *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae) em células de glioblastoma, mostrando que o composto promovia apoptose, via mitocondrial e aumento de espécies reativas do oxigênio intracelulares, no entanto eles avaliaram o ciclo celular e o

flavonoide não promoveu alteração nas fases. Assim maiores estudos devem ser conduzidos para esclarecer as inúmeras vias de sinalização que podem estar sendo moduladas diretamente ou indiretamente por esta molécula nessas células tumorais.

A migração também é um fator muito estudado em gliomas, pois apesar da inexistência de registros de metástase de tumores cerebrais, existe uma propensão das células de gliomas malignos em dispersar-se no tecido cerebral, dificultando assim a terapêutica, já que a doença responde pobremente a ressecções cirúrgicas, radioterapia e quimioterapias atuais (NAKADA, et. al., 2007). O RLB87 apresentou também uma atividade antimigratória que pode estar relacionada aos seus efeitos antiproliferativo e proapoptótico e que deve ser melhor esclarecido com outros testes relacionados.

Quando avaliamos a relevância de grupamentos químicos na estrutura e atividade do RLB7, verificamos grupos farmacofóricos fundamentais para sua atividade. Porém não foi possível determinar com esses números de análogos e variações funcionais, todas as condições relevantes na estrutura, no entanto através desses resultados preliminares temos já uma hipótese a ser confirmada, na qual vamos avaliar a importância da solubilidade versus o anel pirrolazepínico.

A biodisponibilidade é um parâmetro importante na absorção, concentração e distribuição de fármacos nos diferentes compartimentos celulares e estes eventos são influenciados pelos aspectos biofísicos da célula e físico-químico das moléculas. Adicionalmente acreditamos que a lipofilia foi um fator importante para a citotoxicidade dos *alkaloids-like* testados. Baseando-se que a maioria das moléculas de droga são transportadas através da porção bicamada fosfolipídica das membranas biológicas, através de difusão passiva, a uma taxa referente a sua lipofilia (expressa como logP) (KELLS, 2008), realizamos nesse trabalho uma avaliação da correlação do LogP com a citotoxicidade e observamos uma correlação positiva. Diversos

autores descrevem que moléculas com LogP alto atravessam a membrana plasmática por difusão (LIEB e STEIN., 1969).

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permite concluir que:

- Entre os compostos testados o *alkaloide-like* RLB87 foi o mais citotóxico para células de glioma humano (GL-15 e U251) e murino (C6), no entanto sem apresentar toxicidade para células gliais normais
- RLB87 inibiu a proliferação com acúmulo da fase G0/G1 do ciclo celular, promoveu apoptose e inibiu a migração das células de glioma.
- Elucidamos aspectos importantes na estrutura química, requeridos para sua atividade, que possuem correlação com regioisomeria, presença da função éster e lipofilicidade, após à avaliação dos efeitos de RLB87 e análogos
- Por fim verificou uma correlação positiva do efeito citotóxico e a solubilidade nas linhagens tumorais e negativa para a cultura Glial de células normais.

## 8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas o nosso trabalho tem a seguintes propostas:

1. Avaliação da relevância da presença do anel pirroloazepínico versus a solubilidade.
2. Após a determinação dos grupamentos relevantes avaliação dos enantiômeros separados.
3. Descobrir qual via esta sendo deflagrada na apoptose induzida pelo RLB87
4. Avaliar a expressão das ciclinas, fatores de transcrição, CDKs e CDKIs, moduladas pelo RLB87.
5. Avaliar o potencial in vivo do “*alcalóide-like*” RLB87 e molécula análoga.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA SAGAR, ET. AL. (2010) INDUCTION OF G1 ARREST IN GLIOMA CELLS BY T11TS IS ASSOCIATED WITH UPREGULATION OF CIP1/KIP1 AND CONCURRENT DOWNREGULATION OF CYCLIN D (1 AND 3). ANTI-CANCER DRUGS 2010, VOL 21 N° 1
- AMERICAN CANCER SOCIETY (2006) CANCER FACTS AND FIGURES 2006, AMERICAN CANCER SOCIETY, ATLANTA.
- ANCLAES ALBERT J. IDEMA · PIETER WESSELING (2007) (REVIEW )DIFUSE GLIOMA GROWTH: A GUERRILLA WAR ACTA NEUROPATHOL 114:443–458, SEP.
- ARRIETA, ET. AL. (2002). ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF THALIDOMIDE ALONE AND COMBINED WITH CARMUSTINE AGAINST C6 RAT GLIOMA. INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, V. 83, P. 99-104.
- ASAI A, ET. AL. (1994) NEGATIVE EFFECTS OF WILD-TYPE P53 AND S-MYC ON CELLULAR GROWTH AND TUMORIGENICITY OF GLIOMA CELLS. IMPLICATION OF THE TUMOR SUPPRESSOR GENES FOR GENE THERAPY. J NEUROONCOL 19:259–268.
- ASHBY, L.S. E. RYKEN T.C, (2006) MANAGEMENT OF MALIGNANT GLIOMA: STEADY PROGRESS WITH MULTIMODAL APPROACHES. NEUROSURG FOCUS, 2006. 20(4): P. E3.
- AUER RN, DEL MAESTRO RF, ANDERSON R (1981) A SIMPLE AND REPRODUCIBLE EXPERIMENTAL IN VIVO GLIOMA MODEL. CAN J NEUROLSCI 8:325–331.
- AWANISHI, ET. AL. (2010). BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF 2-AMINOTHIAZOLE-DERIVED CDK4/6 SELECTIVE INHIBITOR IN VITRO AND IN VIVO CELL CYCLE 9:8, 1590-1600; APRIL 15, VOLUME 9 ISSUE 8
- BEIER, D. ET.AL. (2008). TEMOZOLOMIDE PREFERENTIALLY DEPLETES CANCER STEM CELLS IN GLIOBLASTOMA. CANCER RESEARCH, V. 68, P. 5706-5715,.
- BELANI, C. P. AND ECKARDT, J. (2004) (REVIEW) DEVELOPMENT OF DOCETAXEL IN ADVANCED NON-SMALL-CELL. LUNG CANCER, 46, S3–S1,

- BENDA P, LIGHTBODY J, SATO G, LEVINE L, SWEET W (1968)  
DIFFERENTIATED RAT GLIAL CELL STRAIN IN TISSUE CULTURE.  
SCIENCE 161:370–371.
- BERTOLAI, J.D.P. (2006). TRANSFORMAÇÕES NA INSERÇÃO  
INTERNACIONAL DO SETOR PRODUTOR DE FÁRMACOS E  
MEDICAMENTOS: UMA ANÁLISE DO COMÉRCIO EXTERIOR  
BRASILEIRO. RIBEIRÃO PRETO: FEARP/USP, 2006. 139F.  
(MONOGRAFIA EM ECONOMIA) – FACULDADE DE ECONOMIA,  
ADMINISTRAÇÃO E CONTABILIDADE DE RIBEIRÃO PRETO DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, RIBEIRÃO PRETO.
- BOCCHINI, V. ; BECCARI, T. ; ARCURI, C. ; BRUYERE, L. ; FAGES, C. ; TARDY,  
M. (1993). GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN AND ITS ENCODING  
MRNA EXHIBIT MOSAIC EXPRESSION IN A GLIOBLASTOMA  
MULTIFORM CELL LINE OF CLONAL ORIGIN. INTERNATIONAL  
JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE: 11(4): 485-492..
- BRAT, D.J., ET AL.,(2007) NEWLY CODIFIED GLIAL NEOPLASMS OF THE 2007  
WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS OF THE CENTRAL NERVOUS  
SYSTEM: ANGIOCENTRIC-GLIOMA, PILOMYXOID ASTROCYTOMA AND  
PITUICYTOMA. BRAIN PATHOL, 2007. 17(3): P. 319-24.
- BRUYÈRE, C.ET. AL. (2011). JLK1486, A BIS 8-HYDROXYQUINOLINE-  
SUBSTITUTED BENZYLAMINE, DISPLAYS CYTOSTATIC EFFECTS IN  
EXPERIMENTAL GLIOMAS THROUGH MYT1 AND STAT1 ACTIVATION  
AND, TO A LESSER EXTENT, PPAR $\gamma$  ACTIVATION. TRANSLATIONAL  
ONCOLOGY, V. 4, P. 126-137.
- CBTRUS (2010); VILLANO J. ET. AL., 2010 DESCRIPTIVE EPIDEMIOLOGY OF  
CENTRAL NERVOUS SYSTEM GERM CELL TUMORS: NON- PINEAL  
ANALYSIS. NEURO ONCOLOGY. (2010); 12:257-64
- CHICOINE MR, SILBERGELD DL (1995) INVADING C6 GLIOMA CELLS  
MAINTAINING TUMORIGENICITY. J NEUROSURGERY 83:665–671.
- CHOU YH, KHUON S, HERRMANN H, GOLDMAN RD (2003) NESTIN  
PROMOTES THE PHOSPHORYLATION-DEPENDENT DISASSEMBLY OF  
VIMENTIN INTERMEDIATE FILAMENTS DURING MITOSIS. MOLBIOL  
CELL 14:1468–478.
- CLOUGHESY TF,ET. AL.(2008). ANTITUMOR ACTIVITY OF RAPAMYCIN IN A  
PHASE I TRIAL FOR PATIENTS WITH RECURRENT PTEN-DEFICIENT  
GLIOBLASTOMA.PLOS MED 5:E8..
- COOKSON, M. R.; PENTREATH, V. W.(1994). ALTERATIONS IN THE GLIAL  
FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN CONTENT OF PRIMARY ASTROCYTE  
CULTURES FOR EVALUATION OF GLIAL CELL TOXICITY.  
TOXICOLOGY IN VITRO, V. 8, P. 351-359.

- COSTA, PAULO R. R. (2009) PRODUTOS NATURAIS COMO PONTO DE PARTIDA PARA A DESCOBERTA DE NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS: CANDIDATOS A FÁRMACOS COM AÇÃO ANTIOFÍDICA, ANTICÂNCER E ANTIPARASITÁRIA. REV. VIRTUAL QUIM.1 (1), 58-66.
- COSTA, S.L, (2001) EFFECTS OF A NOVEL SYNTHETIC RETINOID ON MALIGNANT GLIOMA IN VITRO: INHIBITION OF CELL PROLIFERATION, INDUCTION OF APOPTOSIS AND DIFFERENTIATION. EU. J. CANCER (37):520-530.
- DAUD, A., ET. AL. (2005) PHASE II TRIAL OF KARENITECIN IN PATIENTS WITH MALIGNANT MELANOMA: CLINICAL AND TRANSLATIONAL STUDY. CLINICAL CANCER RESEARCH, 11, 3009–3016.
- DAVID C. YOUNG, ( 2009). LIVRO COMPUTATIONAL DRUG DESIGN.-CAP. 2- PROPERTIES THAT MAKE A MOLECULE A GOOD DRUG, ED- JOHN WILEY & SONS, INC. 2009. PAG-9-17
- DAVID N. LOUIS, ERIC C. HOLLAND, E J. GREGORY CAIRNCROSS (2001). GLIOMA CLASSIFICATION A MOLECULAR REAPPRAISAL. AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, VOL. 159, NO. 3, SEP..
- DE OLIVEIRA, M. S, ET. AL.,(2009) ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT OF THE GASTRIN-RELEASE PEPTIDE RECEPTOR ANTAGONIST RC-3095 PLUS TEMOZOLOMIDE IN EXPERIMENTAL GLIOBLASTOMA MODELS. JOURNAL OF NEUROONCOLOGY, V. 93, P. 191-201.
- DEORAH S. ET. AL. (2006) TRENDS IN BRAIN CANCER INCIDENCE AND SURVIVAL IN THE UNITED STATES: SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY, AND END RESULTS PROGRAM, 1973 TO 2001. NEUROSURG FOCUS. 2006;20(4):E
- DE BOER, A. G.; GAILLARD, P. J.(2007) STRATEGIES TO IMPROVE DRUG DELIVERY ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER. CLINICAL PHARMACOKINETICS, V. 46, P. 553-576.
- DONJERKOVIC DUBRAVKA, DAVID W. SCOTT (2000) .REVIEW REGULATION OF THE G1 PHASE OF THE MAMMALIAN CELL CYCLE. CELL RESEARCH,10, 1-16..
- DUCRAY, F.(2008). BIOLOGY OF GLIOMAS. CANCER/RADIOTHÉRAPIE, V. 12, N. 6D7, P. 663D668.
- ELMORE S. (2007). APOPTOSIS: REVIEW OF PROGRAMMED CELL DEATH. TOXICOL PATHOL, 2007. 35(4); P.495-516
- FAN M, GOODWIN ME, BIRRER MJ, CHAMBERS TC (2001) THE C-JUN NH(2)-TERMINAL PROTEIN KINASE/AP-1 PATHWAY IS REQUIRED FOR EFFICIENT APOPTOSIS INDUCED BY VINBLASTINE. CANCER RES 61:

4450-4458..

- FATTORUSSO ERNESTO E TAGLIALATELA-SCAFAT ORAZIO (2008);  
MODERN ALKALOIDS STRUCTURE, ISOLATION, SYNTHESIS AND  
BIOLOGY; WILEY-VCH, CAP-2; 25-32P.
- FERRAZ, H. M. C \* E. GONÇALOE. R. S. (2007) PREPARAÇÕES E  
APLICAÇÕES SINTÉTICAS RECENTES DE ENAMINONAS. QUIM. NOVA,  
VOL. 30, NO. 4, 957-964.
- FERRAZ, H. M. C \* E. PEREIRA, F. L. C. (2004) SÍNTESE DE ENAMINONAS  
(REVISÃO) QUIM. NOVA, VOL. 27, NO. 1, 89-95
- FESTA MICHELA, ET. AL. (2011) XANTHOMOL INDUCES APOPTOSIS IN  
HUMAN MALIGNANT GLIOBLASTOMA CELLS BY INCREASING  
REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ACTIVATING MAPK PATHWAYS. J.  
NAT. PROD., 74, 2505 – 2513
- FREITAS ET. AL. (2010). "FLAVONOIDS INHIBIT ANGIOGENIC CYTOKINE  
PRODUCTION BY HUMAN GLIOMA CELLS." PHYTOTHERAPY  
RESEARCH 25(6): 916-921.
- FU MAOFU, CHENGUANG WANG, ZHIPING LI, TOSHIYUKI SAKAMAKI, AND  
RICHARD G. PESTELMINIREVIEW: CYCLIN D1: NORMAL AND  
ABNORMAL FUNCTIONS ENDOCRINOLOGY 145 (12):5439 –5447T ©  
2004 BY THE ENDOCRINE SOCIETY DOI: 10.1210/EN.2004-0959
- FU, J.; LIU, Z. G.; LIU, X. M.; CHEN, F. R.; SHI, H. L.; PANG, J. C. S.; NG, H. K.;  
CHEN, Z. P. GLIOBLASTOMA STEM CELLS RESISTANT TO  
TEMOZOLOMIDE-INDUCED AUTOPHAGY. CHINESE MEDICAL  
JOURNAL, V. 122, P. 1255-1259, 2009
- FUEYO J, ET. AL. (1996) ADENOVIRUS-MEDIATED P16/CDKN2 GENE  
TRANSFER INDUCES GROWTH ARREST AND MODIFIES THE  
TRANSFORMED PHENOTYPE OF GLIOMA CELLS. ONCOGENE 12:103–  
110.
- FULLER, G.N. AND. SCHEITHAUER, B.W, (2007). THE 2007 REVISED WORLD  
HEALTH ORGANIZATION (WHO) CLASSIFICATION OF TUMOURS OF  
THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM: NEWLY CODIFIED ENTITIES.  
BRAIN PATHOL, 2007. 17(3): P. 304-7.
- FURNARI F.B, ET AL. (2007) MALIGNANT ASTROCYTIC GLIOMA: GENETICS,  
BIOLOGY, AND PATHS TO TREATMENT. GENES DEV 21: 2683-2710.
- GERMANO, I.; SWISS, V.; CASACCIA, P. (2010) PRIMARY BRAIN TUMORS,  
NEURAL STEM CELL, AND BRAIN TUMOR CANCER CELLS: WHERE IS  
THE LINK? NEUROPHARMACOLOGY, V. 58, N. 6, P. 903D910, 2010.
- GRONINGER E, MEEUWSEN-DE BOER GJ, DE GRAAF SS, KAMPS WA,

DEBONTES (2002) VINCRISTINE INDUCED APOPTOSIS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA CELLS: A MITOCHONDRIAL CONTROLLED PATHWAY REGULATED BY REACTIVE OXYGEN SPECIES? INT J ONCOL 21: 1339-1345.

GUPTA, M., FUJIMORI, A., POMMIER, Y. (1995) EUKARYOTIC DNA TOPOISOMERASES I. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA , 1262, 1–14.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ ET. AL., (2010) CHEMOTHERAPY-INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY: CLINICAL FEATURES, DIAGNOSIS, PREVENTION AND TREATMENT STRATEGIES. CLIN TRANSL ONCOL. 2010; FEB;12(2):81-91

HOLLAND, E. C. (2001). GLIOMAGENESIS: GENETIC ALTERATIONS AND MOUSE MODELS. NATURE REVIEWS | GENETICS, VOLUME 2, FEBRUARY 2001.

HOUCHENS DP, OVEJERA AA, RIBLET SM, SLAGEL DE (1983) HUMAN BRAIN TUMOR XENOGRAFTS IN NUDE MICE AS A CHEMOTHERAPY MODEL. EUR. J. CANCER CLIN ONCOL 19:799–805.

HSIANG, Y. H., HERTZBERG, R., HECHT, S., LIU, L. F. (1985) CAMPTOTHECIN INDUCES PROTEIN-LINKED DNA BREAKS VIA MAMMALIAN DNA TOPOISOMERASE I THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 260 , 14873–14878.

INCA (2012) INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. ESTIMATIVA 2012 INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, RIO DE JANEIRO 2011.

ISHII N, MAIER D, MERLO A, TADA M, SAWAMURA Y, DISERENS AC, VAN MEIR EG (1999) FREQUENT CO-ALTERATIONS OF TP53, P16/CDKN2A, P14ARF, PTEN TUMOR SUPPRESSOR GENES IN HUMAN GLIOMA CELL LINES. BRAIN PATHOL 9:469–479

JACQUES T.S., ET. AL. (2010) COMBINATIONS OF GENETIC MUTATIONS IN THE ADULT NEURAL STEM CELL COMPARTMENT DETERMINE BRAIN TUMOUR PHENOTYPES. EMBO J 29:222–235

JOHNSON, I. S., ARMSTRONG, J. G., GORMAN, M., BURNETT, J. P., JR. (1963) THE VINCA ALKALOIDS: A NEW CLASS OF ONCOLYTIC AGENTS CANCER RESEARCH, 23, 1390–1427

JORDAN MA, THROWER D, WILSON L (1991) MECHANISM OF INHIBITION OF CELL PROLIFERATION BY VINCA ALKALOIDS. CANCER RES 51: 2212-2222.

JORDAN MA, THROWER D, WILSON L (1992) EFFECTS OF VINBLASTINE, PODOPHYLLOTOXIN AND NOCODAZOLE ON MITOTIC

SPINDLES.IMPLICATIONS FOR THE ROLE OF MICROTUBULE DYNAMICS IN MITOSIS. J CELL SCI 102 ( PT 3): 401-416.

KAUP, B., ET AL.,(2001) TIME-DEPENDENT INHIBITION OF GLIOBLASTOMA CELL PROLIFERATION BY DEXAMETHASONE. J NEUROONCOL, 2001. 51(2): P. 105-10

KAUR B, TAN C, BRAT DJ, POST DE, VAN MEIR EG (2004) GENETIC AND HYPOXIC REGULATION OF ANGIOGENESIS IN GLIOMAS. J NEUROONCOL 70: 229–243

KELLES, SILVANA MÁRCIA BRUSCHI, (2011) TRATAMENTO DE GLIOMA DE ALTO GRAU: TEMOZOLOMIDA OU NITROSURÉIAS;.NUCLEO DE AVALIAÇÃO EM TECNOLOGIA DE SAÚDE; JULHO DE 2011, PAG 14 E 15.

KERR, J. F, WYLLIE A. H AND. CURRIE A. R.(1972) APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATION IN TISSUE KINETICS. BR. J. CANCER, 1972. 26(4): P.239-257.

KIM, E.H., ET AL.,(2004). ROSCOVITINE SENSITIZES GLIOMA CELLS TO TRAIL-MEDIATED APOPTOSIS BY DOWNREGULATION OF SURVIVIN AND XIAP. ONCOGENE, 2004. 23(2): P. 446-56.

KOZUSKO F, BOURDEAU M, BAJZER Z, DINGLI D. (2007) MICROENVIRONMENT BASED MODEL OF ANTIMITOTIC THERAPY OF GOMPERTZIAN TUMOR GROWTH. BULL MATH BIOL. JUL;69(5):1691-708.

KREISLT.N., ET. AL.,(2009). PHASE II TRIAL OF SINGLE-AGENT BEVACIZUMAB FOLLOWED BY BEVACIZUMAB PLUS IRINOTECAN AT TUMOR PROGRESSION IN RECURRENT GLIOBLASTOMA. J CLINONCOL 27:740–745 .

KUMAR, N. (1981) INTERACTION OF TUBULIN WITH PHOSPHOLIPID VESICLES. II. PHYSICAL CHANGES OF THE PROTEIN THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 256 , 10435–10441

KUPPENS, I. E., BEIJNEN, J., SCHELLENS,J. H. (2004) DIFFERENTIATED HUMAN COLORECTAL CANCER CELLS PROTECT TUMOR-INITIATING CELLS FROM IRINOTECAN CLINICAL COLORECTAL CANCER, 4, 163–180.

KUSABA, H.ET. AL., (2013) PHASE I STUDY OF BEVACIZUMAB COMBINED WITH IRINOTECAN AND S-1AS SECOND-LINE CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH ADVANCED COLORECTAL CANCER. CANCER CHEMOTHERAPY PHARMACOLOGICAL 71:29–34

LACKEY, K., ET. AL., (1995) RIGID ANALOGS OF CAMPTOTHECIN AS DNA

TOPOISOMERASE I INHIBITORS. JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 38 , 906–911.

- LAL, P.G.; GHIRNIKAR, R.S.; ENG, L.F. (1996). ASTROCYTE-ASTROCYTOMA CELL LINE INTERACTION IN CULTURE. J. NEUROSCIENCE. RES, V.44, P.216-22,
- LIEB, W.R., STEIN, W.D. (1969). BIOLOGICAL MEMBRANES BEHAVE AS NON-POROUS POLYMERIC SHEETS WITH RESPECT TO THE DIFFUSION OF NON-ELECTROLYTES. NATURE 224 :240 – 3
- LINDGREN A., B. WESTERMARK AND J. PONT B. N. SERUM STIMULATION OF STATIONARY HUMAN GLIA AND GLIOMA CELLS IN CULTURE. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 95 (1975) 3 1 L-3 19
- LOUIS, D. N ET. AL., (2007). THE 2007 WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. ACTA NEUROPATHOLOGY, V. 114, P. 97-109.
- LOUIS, D.N., ET. AL., (2006). MOLECULAR PATHOLOGY OF MALIGNANT GLIOMAS. ANNU REV PATHOL, 2006. 1: P. 97-117.
- LUCAS, H. ARCH. PHARM. 1856, 85 APUD.
- MALKIN D (2001) THE ROLE OF P53 IN HUMAN CANCER. J NEUROONCOL 51: 231–243
- MANFREDI, J. J. AND HORWITZ, S. B. (1984) TAXOL: AN ANTIMITOTIC AGENT WITH A NEW MECHANISM OF ACTION. PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 25, 83–125.
- MARK S. BUTLER. THE ROLE OF NATURAL PRODUCT CHEMISTRY IN DRUG DISCOVERY *J. NAT. PROD.*, 2004, 67 (12), PP 2141–2153 P
- MELO, J. O. F.; DONNICI, C. L.; AUGUSTI, R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B.; FERREIRA, M. L. G.; CUNHA, A. C.; QUIM. NOVA 2006, 29, 569
- MENEGATTI, R CARLOS ALBERTO MANSSOUR FRAGA E ELIEZER J. BARREIRO. (2001) A IMPORTÂNCIA DA SÍNTESE DE FÁRMACOS. CADERNOS TEMÁTICOS DE QUÍMICA NOVA NA ESCOLA N° 3 – MAIO.
- MICHAEL D. CUSIMANO & PETER B. DIRKS. IDENTIFICATION OF HUMAN BRAIN TUMOUR INITIATING CELLS. NATURE | VOL 432 | 18 NOVEMBER 2004
- MIRIMANOFF R, ET AL. (2007) IS LONG-TERM SURVIVAL IN GLIOBLASTOMA POSSIBLE? UPDATED RESULTS OF THE EORTC/NCIC PHASE III RANDOMIZED TRIAL ON RADIOTHERAPY (RT) AND CONCOMITANT AND ADJUVANT TEMOZOLAMIDE VERSUS RT ALONE. J RAD. ONCOL. BIOL. PHYSI.; 69(SUPPL.)

- MONTANARI C.E BOLZANI A. V. DA S. (2001) PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS BASEADO EM PRODUTOS NATURAIS .QUIM.NOVA, VOL. 24, NO. 1, 105-111.
- MONTEIRO, G.T.R.K., F.,(2003) MORTALIDADE POR TUMORES DE CÉREBRO NO BRASIL: 1980-1998. CADERNO DE SAÚDE PÚBLICA.,19(4): P. 1139-1151
- MOSMANN, T. RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL: APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTOTOXICITY ASSAYS. JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, V. 65, P. 55-63, 1983.
- NAGANO N, SASAKI H, AOYAGI M, HIRAKAWA K (1993) INVASION OF EXPERIMENTAL RAT BRAIN TUMOR: EARLY MORPHOLOGICAL CHANGES FOLLOWING MICROINJECTION OF C6 GLIOMA CELLS. ACTA NEUROPATHOL 86:117-125
- NAKADA, M. ET. AL. (2007). MOLECULAR TARGETS OF GLIOMA INVASION. CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCE, V. 64, P. 458 – 478, 2007.
- NATSUME, A., ET AL., IFN-BETA DOWN-REGULATES THE EXPRESSION OF DNA REPAIR GENE MGMT AND SENSITIZES RESISTANT GLIOMA CELLS TO TEMOZOLOMIDE. CANCER RES, 2005. 65(17): P. 7573-9.
- OCEAN A, VAHDAT L. (2004) CHEMOTHERAPY INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY: PATHOGENESIS AND EMERGING THERAPIES. SUPPORT CARE CANCER. 2004 SEP;12(9):619-25.
- OHGAKI H, KLEIHUES P. (2005). POPULATION-BASED STUDIES ON INCIDENCE, SURVIVAL RATES, AND GENETIC ALTERATIONS IN ASTROCYTIC AND OLIGODENDROGLIAL GLIOMAS. J NEUROPATHOL EXP NEUROL. 2005 JUN;64(6):479-89.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.(2007) GENETIC PATHWAYS TO PRIMARY AND SECONDARY GLIOBLASTOMA. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, V. 170, N. 5, P. 1445-1453, 2007
- OLIVEIRA, D. M. DE (2012) ATIVIDADE QUIMIOSENSIBILIZANTE E ANTITUMORAL IN VITRO DO 8-METOXIPSORALENO, UM NOVO INIBIDOR DA GLUTATION S-TRANSFERASE- $\pi$ - TESE (DOUTORADO EM PATOLOGIA E CLINICA) FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ, SALVADOR. 50-53 P
- PATOLE, J.; PADHYE, S.; MOOBBIDRI, M.S.; SHIRSAT, N. (2005) ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF IRON AND PLATINUM CONJUGATES OF SALICYLALDEHYDE SEMI/ THIOSEMICARBAZONES AGAINST C6 GLIOMA CELLS. EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, V. 40, P. 1052-1055.

- PEDEBOSCQ, S.; L'AZOU, B.; LIGUORO D.; POMETAN, J.P.; CAMBAR J.(2007) INTERINDIVIDUAL DIFFERENCES IN ANTICANCER DRUG CYTOTOXICITY IN PRIMARY HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS. EXPERIMENTAL AND TOXICOLOGIC PATHOLOGY, V. 58, P. 247-253, 2007
- PERZELCOVÁ A, MÁCIKOVÁ, TARDY M, MRÁZ P, STENO J, BÍZIK (2000) CO-EXPRESSION OF GFAP, VIMENTIN AND CYTOKERATINS IN GL-15 GLIOBLASTOMA CELL LINE. NEOPLASMA. 2000;47(6):362-6
- PFEIFFER SE, HERSCHMAN HR, LIGHTBODY J, SATO G (1970) SYNTHESIS BY A CLONAL LINE OF RAT GLIAL CELLS OF A PROTEIN UNIQUE TO THE NERVOUS SYSTEM. J CELL PHYSIOL 75:329–339
- PONTEN J (1975) NEOPLASTIC HUMAN GLIA CELLS IN CULTURE. IN HUMAN TUMOR CELLS IN VITRO (FOGH J, ED), PP. 175–185, PLENUM PRESS, NEW YORK.
- POTIER, P. (1989) THE SYNTHESIS OF NAVELBINE PROTOTYPE OF A NEW SERIES OF VINBLASTINE DERIVATIVES. SEMINARS IN ONCOLOGY, 16, 2–4
- POURROY B, ET. AL., (2004) LOW CONCENTRATIONS OF VINFLUNINE INDUCE APOPTOSIS IN HUMAN SK-N-SH NEUROBLASTOMA CELLS THROUGH A POSTMITOTIC G1 ARREST AND A MITOCHONDRIAL PATHWAY. MOL PHARMACOL 66: 580-591
- PRATESI G, BERETTA GL, ZUNINO F, AND GIMATECAN F (2004). A NOVEL CAMPTOTHECIN WITH A PROMISING PRECLINICAL PROFILE. ANTICANCER DRUGS 15, 545 – 552.
- PREHN R. T.(1991). THE INHIBITION OF TUMOR GROWTH BY TUMOR MASS. CANCER RES. JAN 1;51(1):2-4
- QIANG P. ET. AL., (2012) CHEMORESISTANCE TO TEMOZOLOMIDE IN HUMAN GLIOMA CELL LINE U251 IS ASSOCIATED WITH INCREASED ACTIVITY OF O6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE AND CAN BE OVERCOME BY METRONOMIC TEMOZOLOMIDE REGIMEN. CELL BIOCHEM BIOPHYS (2012) 62:185–191.
- QUASTHOFF S, HARTUNG H. (2002). CHEMOTHERAPY-INDUCED PERIPHERAL NEUROPATHY. J NEUROL. 2002(JAN;249(1)):9-17
- QUINONES-HINOJOSA A, CHAICHANA K. (2007). THE HUMAN SUBVENTRICULAR ZONE: A SOURCE OF NEW CELLS AND A POTENTIAL SOURCE OF BRAIN TUMORS. EXP NEUROL 205:313–324.
- RADAELLI E, ET. AL., (2009) IMMUNOHISTOPATHOLOGICAL AND NEUROIMAGING CHARACTERIZATION OF MURINE

ORTHOTOPICXENOGRAFT MODELS OF GLIOBLASTOMA MULTIFORME RECAPITULATING THE MOST SALIENT FEATURES OF HUMAN DISEASE. HISTOL. HISTOPATHOL 24:879–891.

REARDON DA, WEN PY (2006) THERAPEUTIC ADVANCES IN THE TREATMENT OF GLIOBLASTOMA: RATIONALE AND POTENTIAL ROLE OF TARGETED AGENTS. THE ONCOLOGIST, VOL. 11, NO. 2, 152-164.

REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, WEISSMAN IL. (2001) STEM CELLS, CANCER, AND CANCER STEM CELLS. NATURE 414:105–111

RIEDL S. J E SHI, E Y, (2004). MOLECULAR MECHANISMS OF CASPASES REGULATION DURING APOPTOSIS. NAT. REV. MOL. CELL BIOL. 5(11) P.897-907

RINGER L. ET. AL. (2010).VMY-1-103, A DANSYLATED ANALOG OF PURVALANOL B, INDUCES CASPASE-3-DEPENDENT APOPTOSIS IN LNCAP PROSTATE CANCER CELLS. CANCER BIOL. THER. AUGUST 15; 10(4): 320–325

RISHTON,G.M. (2008). NATURAL PRODUCTS AS A ROBUST SOURCE OF NEW DRUGS AND DRUG LEADS: PAST SUCCESSES AND PRESENT DAY ISSUES. AM. J. CARDIOL. 2008, MAY 22;101(10A):43D-49D.

ROSENFELD, G. CORANTE PANCRÔMICO PARA HEMATOLOGIA E CITOLOGIA CLÍNICA: NOVA COMBINAÇÃO DOS COMPONENTES DO MAY GRUNWALD E DO GIEMSA NUM SÓ CORANTE DE EMPREGO PRÁTICO. MEM INST BUTANTÃ, V.20, P.329-335, 1947

ROYTTA, M., LAINE, K. M., HARKONEN,P. (1987) MORPHOLOGICAL STUDIES ON THE EFFECT OF TAXOL ON CULTURED HUMAN PROSTATIC CANCER CELLS PROSTATE, 11, 95–106

SANAI N, ALVAREZ-BUYLLA A, BERGER MS (2005) NEURAL STEM CELLS AND THE ORIGIN OF GLIOMAS. N ENGL J MED 353: 811–822

RODNIIGHT R. E GOTTFRIED C. MORPHOLOGICAL PLASTICITY OF RODENT ASTROGLIAL JOURNAL O F NEUROCHEMISTRY | 2013 | 124 | 263–275

SANTOS, B. L, (2010). AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE FLAVONÓIDES POLIHIDROXILADOS SOBRE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO TESE (DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, FEIRA DE SANTANA.

SAUVAGEOT, C.M.; STILES, C.D.(2002) MOLECULAR MECHANISMS CONTROLLING CORTICAL GLIOGENESIS. CUR. OPIN. NEUROBIOL., V.12, P.244-249, 2002

SCHILSKY, R., HAUSHEER, F., BERTUCCI,D., BERGHORN, E., KINDLER, H., RATAIN,M. (2000) PHASE I AND PHARMACOKINETIC STUDY OF

KARENITECIN IN PATIENTS WITH RECURRENT MALIGNANT GLIOMAS. PROCEEDINGS OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, 19, 195.

SCHMIDT, B.; RIBNICK, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. (2008) A NATURAL HISTORY OF BOTANICAL THERAPEUTICS. METABOLISM, CLINICAL AND EXPERIMENTAL, 57.

SELAN, B.; KANNEBLEY JÚNIOR, S.; PORTO, G. S (2007). RELATÓRIO SETORIAL SOBRE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA BRASILEIRA: UMA ANÁLISE A PARTIR DOS INDICADORES DE INOVAÇÃO, 79 P.

SELIGMAN AM, SHEAR MJ (1939) EXPERIMENTAL PRODUCTION OF BRAIN TUMORS IN MICE WITH METHYLCHOLANTHRENE. AM J CANCER 37:364–395

SIEBZEHRUBL F. A REYNOLDS, A. VESCOVI D. A. STEINDLER, AND L. P. DELEYROLLE B. A THE ORIGINS OF GLIOMA: E PLURIBUS UNUM?. . REV. GLIA 59:1135–1147 (2011)

SILVA AR, HUGHES JB, BARRETO RA, SOUZA JS, COSTA MFD, EL-BACHÁ RS, VELOZO ES, TARDY M, FREIRE SM, COSTA SL (2002) THE FLAVONOID RUTIN, EXTRACTED FROM DIMORPHANDRA MOLLIS, INHIBITS PROLIFERATION AND STIMULATES DIFFERENTIATION OF GL-15 HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS. IN: XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, CUIABÁ. ANAIS DO XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002 [RESUMO].

SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; SOUZA, C. S.; FREITAS, S. R. V. B.; VASCONCELLOS, V.; FREIRE, S. M.; VELOZO, E. S.; TARDY, M.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; COSTA, S. L. THE FLAVONOID RUTIN INDUCES ASTROCYTE AND MICROGLIA ACTIVATION AND REGULATES TNF-ALPHA AND NO RELEASE IN PRIMARY GLIAL CELL CULTURES. CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY, V. 24, P. 75-86, 2008

SILVA, A. M. M.; SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; FREITAS, S. R. V. B.; SILVA, V. D. A.; SOUZA, C. S.; HUGHES, J. B.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; VELOZO, E. S.; TARDY, M.; COSTA, S. L. ALKALOIDS FROM PROSOPIS JULIFLORA LEAVES INDUCE GLIAL ACTIVATION, CYTOTOXICITY AND STIMULATE NO PRODUCTION. TOXICON, V. 49, P. 601-614, 2007

SILVA-NETO, J.P.; BARRETO, R.A.; PITANGA, B.P.S.; SOUZA, C.S.; SILVA, V.D.; SILVA, A.R.; VELOZO, E.S.; CUNHA, S.D.; BATATINHA, M.J.M.; TARDY, M.; RIBEIRO, C.S.O.; COSTA, M.F.D.; EL-BACHA, R.S.; COSTA S.L. GENOTOXICITY AND MORPHOLOGICAL CHANGES INDUCED BY THE ALKALOID MONOCROTALINE, EXTRACTED FROM CROTALARIA RETUSA, IN A MODEL OF GLIAL CELLS. TOXICON, ( 2009)

- SINGH SK, CLARKE ID, TERASAKI M, BONN VE, HAWKINS C, SQUIRE J, DIRKS PB (2003) IDENTIFICATION OF A CANCER STEM CELL IN HUMAN BRAIN TUMORS. *CANCER RES* 63: 5821–5828
- SINGH SK, HAWKINS C, CLARKE ID, SQUIRE JA, BAYANI J, HIDE T, HENKELMAN RM, CUSIMANO MD, DIRKS PB (2004) IDENTIFICATION OF HUMAN BRAIN TUMOUR INITIATING CELLS. *NATURE* 432: 396–401
- SOUZA, C.S. EFEITOS DO FLAVONÓIDE AGATHISFLAVONA OBTIDO A PARTIR DE FOLHAS DA *CAESALPINIA PYRAMIDALIS* NA MORFOGÊNESE DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA, NEUROBLASTOMA, CO-CULTURA NEURÔNIO/GLIA E CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS. 2009 TESE (MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA) - UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, P144. SALVADOR
- STAKER, B. L., HJERRILD, K., FEESE, M.D., BEHNKE, C. A., BURGIN, A. B., JR., STEWART, L. (2002) THE MECHANISM OF TOPOISOMERASE I POISONING BY A CAMPTOTHECIN ANALOG. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 99, 15387–15392
- STUPP R, HEGI ME, MASON WP, ET AL. (2009) EFFECTS OF RADIOTHERAPY WITH CONCOMITANT AND ADJUVANT TEMOZOLOMIDE VERSUS RADIOTHERAPY ALONE ON SURVIVAL IN GLIOBLASTOMA IN A RANDOMISED PHASE III STUDY: 5-YEAR ANALYSIS OF THE EORTCNCIC TRIAL. *LANCET ONCOL* 2009;10:459–66.
- STUPP R, MASON W, VAN DEN BENT MJ, ET AL (2005) RADIOTHERAPY PLUS CONCOMITANT AND ADJUVANT TEMOZOLOMIDE FOR GLIOBLASTOMA. *N ENGL J MED.* ;352:987–96.
- SUFFNESS, M. (1995) *TAXOL: SCIENCE AND APPLICATIONS*, CRC PRESS, BOCA RATON,
- THOMPSON , THOMPSON – (LIVRO) *GENETIC MEDICAL*. 7 ° ED CAPITULO 16 389-390P
- THOMPSON, W. C., WILSON, L., PURICH, D. L. (1981) CELL MOTILITY, 1,445–454.
- TRAN B E ROSENTHAL M.A. REVIEW SURVIVAL COMPARISON BETWEEN GLIOBLASTOMA MULTIFORME AND OTHER INCURABLE CANCERS. *JOURNAL OF CLINICAL NEUROSCIENCE* 17 (2010) 417–421
- TSAO, Y. P., RUSSO, A., NYAMUSWA, G., SILBER, R., LIU, L. F. (1993) INTERACTION BETWEEN REPLICATION FORKS AND TOPOISOMERASE I-DNA CLEAVABLE COMPLEXES: STUDIES IN A

CELL-FREE SV40 DNA REPLICATION SYSTEM. CANCER RESEARCH, 53, 5908–5914.

TURINI M, REDAELLI A . PRIMARY BRAIN TUMOURS: A REVIEW OF RESEARCH AND MANAGEMENT. INT J CLIN PRACT. 2001 SEP; 55(7):471-5.

WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGON, P., MCPHAIL, A. T. (1971) PLANT ANTITUMOR AGENTS. VI. THE ISOLATION AND STRUCTURE OF TAXOL, A NOVEL ANTILEUKEMIC AND ANTITUMOR AGENT FROM TAXUS BREVIFOLIA. JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 93, 2325–232

WEN PY, KESARI, S. (2008). MALIGNANT GLIOMAS IN ADULTS. N ENGL J MED 359:492–507.

WHITTLE IR, MACARTHUR DC, MALCOLM GP, LI M, WASHINGTON K, IRONSIDE J.W. (1998) CAN EXPERIMENTAL MODELS OF RODENT IMPLANTATION GLIOMAS BE IMPROVED? A STUDY OF PURE AND MIXED GLIOMA CELL LINE TUMOURS. J NEUROONCOL 36:231–242

WHO-INTERNATIONAL FEDERATION OF PHARMACEUTICAL MANUFACTURERS & ASSOCIATIONS. PHARMACEUTICAL AND VACCINE RESEARCH AND DEVELOPMENT OR THE WORLD MEDICAL NEEDS, [INTERNET]. [CITADO] (2006). DISPONÍVEL EM- [HTTP://WWW.PHRMA.ORG/READ\\_SURVEYS/](http://www.phrma.org/read_surveys/) [HTTP://WWW.IFPMA.ORG](http://www.ifpma.org)

YUNES, A. R.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. (2001). FÁRMACOS E FITOTERÁPICOS: A NECESSIDADE DO DESENVOLVIMENTO DA INDÚSTRIA DE FITOFÁRMACOS NO BRASIL. QUÍMICA NOVA 24 (1): 147-152P

ZHENG H, YING H, YAN H, KIMMELMAN AC, HILLER DJ, CHEN AJ, PERRY SR, TONON G, CHU GC, DING Z, ET AL. 2008. P53 AND PTEN CONTROL NEURAL AND GLIOMA STEM/PROGENITOR CELL RENEWAL AND DIFFERENTIATION. NATURE 455:1129–1133



ANEXO 1												
	GL-15			U251			C6			Glia		
	Mean	Median	CV	Mean	Median	CV	Mean	Median	CV	Mean	Median	CV
CN	102,8	104,9	± 5,7	101,6	101,2	± 2,1	97,02	97,02	± 2,46	102,7	102,5	± 14,47
DMSO	99,28	98,68	± 3,33	99,85	100,1	± 6,51	100,4	99,81	± 3,85	102,9	103,5	± 5,89
MQ 12	92,49	91,39	± 4,35	85,15	86,08	± 8,59	95,02	95,02	± 3,38	89,18	90,98	± 9,06
MQ 13	89,7	90,48	± 4,47	82,17	80,31	± 10,78	99,65	99,47	± 3,58	87,33	87,38	± 3,26
MQ 23	89,82	89,73	± 5,66	91,44	91,33	± 5,01	100,3	99,56	± 2,28	71,67	70,6	± 6,65
MQ 85	87,47	87,67	± 3,3	77,4	76,56	± 9,62	96,25	95,73	± 3,11	69,6	72,32	± 14,39
MQ 87	90,01	89,83	± 4,52	78,79	75,35	± 10,73	93,6	93,28	± 4,49	87,02	83,51	± 12,72
MQ 90	60,09	60,72	± 5,96	38,88	38,93	± 5,53	53,57	53,15	± 4,09	72,2	72,44	± 7,91
RLB 22	92,72	90,46	± 5,55	74,74	77,08	± 7,75	89,29	89,81	± 3,05	89,2	90,04	± 7,96
RLB 29	97,23	96,59	± 4,16	72,94	71,97	± 5,79	91,9	91,15	± 2,42	81,43	80,94	± 6,01
RLB 87	24,91	24,88	± 8,41	2,75	2,884	± 12,01	23,32	22,85	± 16,58	103,2	108,6	± 13,12
RLB 147	96,46	95,06	± 6,54	78,39	77,27	± 10,61	85,84	85,34	± 3,33	102,5	99,77	± 6,66
RLB 148	87,78	85,53	± 10,5	88,62	88,25	± 4,66	92,14	92,2	± 2,96	96,44	93,78	± 8,32
RJT 04	93,23	92,26	± 4,13	91,9	92,04	± 6,59	85,24	85,55	± 3,74	96,86	95,64	± 12,26
RJT 08	91,77	90,86	± 5,74	91,73	90,95	± 6,43	86,76	87,62	± 5,51	114,9	110,2	± 15,79
RJT 68	87,84	88,5	± 6,25	105,6	105,8	± 6,23	91,45	91,2	± 5,47	117,7	112,6	± 11,56
RJT 117	82,95	81,03	± 8,6	85,75	84,79	± 7,25	80,3	80,91	± 5,67	123,7	123,1	± 7,1
RAS 257	82,36	81,3	± 4,08	92,59	92,78	± 4,3	95,42	95,69	± 3,35	122,5	118,4	± 11,76
RAS 276	86,01	84,79	± 3,7	97,31	97,46	± 5,76	93,54	94,38	± 3	91,39	90,35	± 10,49
RAS 259	87,63	87,08	± 3,98	102,9	102,4	± 6,85	93,01	92,54	± 4,4	95,07	95,61	± 3,88
RAS 303	84,45	82,03	± 5,47	90,54	88,97	± 9,21	93,24	91,71	± 4,69	91,63	89,84	± 10,13
RAS 309	87,7	87,28	± 2,87	82,15	81,59	± 5,8	97,84	96,82	± 4,82	83,04	78,82	± 13,51
RAS 327	93,05	91,95	± 3,24	86,8	86,32	± 6,99	94,39	94,41	± 3,25	94,41	88,96	± 13,45
RAS 334	88,33	86,73	± 4,78	85	84,35	± 5,45	103,4	102,6	± 4,44	81,94	78,73	± 12,14
RAS 338	97,75	96,36	± 4,16	89,4	90,33	± 4,9	105,4	106,8	± 5,97	90,22	92,04	± 8,77
RAS 347	101,2	102	± 1,96	83,02	81,68	± 9,23	121,1	122,3	± 3,7	86,59	87,23	± 6,59
RMF 40	75,35	73,96	± 7,55	76,87	74,77	± 10,2	70,87	74,46	± 10,23	100,3	104,6	± 14,03
RMF 33				63,9	63,83	± 4,67	95,1	95,92	± 5,71			

## Anexo 2

