

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia
Trabalho de Conclusão de Curso



**Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Cecropia pachystachya* em
linhagem celular de glioma (GL261)**

Bernardo de Moraes Meine

Pelotas, 2018

Bernardo de Moraes Meine

**Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Cecropia pachystachya* em
linhagem celular de glioma (GL261)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora Acadêmica: Francieli Moro Stefanello

Orientadora de Estágio: Natália Pontes Bona

Pelotas, 2018

Bernardo de Moraes Meine

Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Cecropia pachystachya* em
linhagem celular de glioma (GL261)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/11/2018

Banca examinadora:

Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello (orientadora)

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....

Ma. Luiza Spohr

Mestra em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Bela. Natália Pontes Bona

Bacharela em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Ma. Nathalia Stark Pedra

Mestra em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M514a Meine, Bernardo de Moraes

Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Cecropia pachystachya* em linhagem celular de glioma (GL261). / Bernardo de Moraes Meine ; Francieli Moro Stefanello, Natália Pontes Bona, orientadoras. — Pelotas, 2018.

39 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. *Cecropia pachystachya*. 2. Glioblastoma multiforme. 3. Citotoxicidade. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Bona, Natália Pontes, orient. III. Título.

CDD : 616.99491

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Dedico este trabalho aos meus pais Ben-Hur e Daniela e a minha irmã Paola.

“ A verdadeira força não provém de uma grande capacidade física. Provém de uma vontade indomável “.

(Mahatma Gandhi)

Agradecimentos

Primeiramente, meus agradecimentos iniciais eu dedico aos meus pais, pois sem eles ao meu lado, me incentivando, apoiando, ensinando, as vezes criticando (com razão), enfim, me guiando, eu provavelmente não estaria aqui. Eles são a minha rocha e meu exemplo de vida, pessoas maravilhosas que Deus me presenteou no momento do meu nascimento.

A minha irmã, por servir como exemplo para mim, pois mesmo sendo a caçula, sempre se empenhou e se dedicou muito mais do que eu, uma mulher de responsabilidade e senso de dever exemplares, que me traz orgulho a cada dia, me mostrando que eu não posso baixar a cabeça e esperar um milagre, só a verdadeira dedicação é capaz de trazer frutos.

A minha família, os que estão perto e os que estão longe, agradeço por estarem sempre comigo, me incentivando de diversas formas, especialmente aos meus avôs, que são um exemplo de trabalho e resiliência que eu guardo comigo como figuras a serem seguidas.

Aos meus amigos, por terem me ajudado tanto nessa caminhada acadêmica, sempre me apoiando e me incentivando de maneiras que me é difícil colocar em palavras. Gabriel, Rodrigo, Antonio, Max, Manoel, Fred, Felipe, amo vocês, muito obrigado por tudo.

Aos colegas e amigos que construí na faculdade, especialmente as 4 pessoas que eu tive o maior prazer de conhecer melhor: o Lucas, o Matheus, o Pedro e a Isadora. Ao Lucas, eterno Chiuintcher do grupo, eu agradeço por ter sido meu companheiro de festas e apreciação de músicas, e a nossa eterna rivalidade Inter X Grêmio, tu foi essencial nesse tempo, me colocando pra cima sempre que podia. Ao Matheus por ter sido um exemplo de maturidade e dedicação, uma pessoa que eu sempre tive muito respeito e que me ajudou muito em diversos momentos. Ao Pedro, por ser o homem mais crítico e articulado de toda a turma, pessoa que me ensinou muito sobre filosofia e sobre a vida, além de possuir um humor e capacidade em fazer piadas que foram essenciais nessa caminhada. E por último, a minha Rainha, Isadora, que eu não tenho a menor dúvida, foi a pessoa que mais me ajudou e ensinou durante a faculdade, uma verdadeira mãe e companheira para mim e para os guris, um exemplo de mulher que vai ter um futuro brilhante, fica o meu eterno agradecimento pela amizade e companheirismo.

As gurias do laboratório (Neurocan e Biomarcadores) por me ensinarem e me tratarem tão bem nesses quase dois anos que faço parte do grupo, especialmente a Nati Bona, a Nathi Pedra e a Fer, por terem me guiado e ajudado tanto no tempo que fiquei lá, sempre me ensinando e com uma paciência invejável.

A Fran, minha querida orientadora, por ter me acolhido e depositado a confiança em mim, se Deus permitir que isso possa ocorrer no Mestrado também.

E finalmente, agradeço a Deus, por ter sido o responsável em colocar na minha vida pessoas tão maravilhosas e especiais, que me ajudam e me fazem um

homem melhor a cada dia, mesmo sem merecer tudo isso, eu vou fazer o máximo para que a esperança depositada em mim não seja desperdiçada.

Resumo

MEINE, Bernardo de Moraes. **Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Cecropia pachystachya* em linhagem celular de glioma (GL261)**. 2018. 39 f. Trabalho de conclusão de curso, curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, Brasil.

O Glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral, representando cerca de 50% de todas as neoplasias do sistema nervoso central (SNC), onde o tratamento aplicado consiste em ressecção cirúrgica seguido de radioterapia e quimioterapia com o fármaco padrão temozolomida. Tendo em vista os dados expostos, é imprescindível a realização de pesquisas que busquem novas alternativas farmacológicas, com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Neste contexto, o foco deste estudo foi avaliar o efeito antitumoral do extrato de *Cecropia pachystachya*, nas concentrações de 25 a 500 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72 horas em linhagem de glioma de camundongo (GL261) e avaliar o potencial citotóxico em cultivo primário de astrócitos de ratos jovens. Nossos resultados demonstraram que o extrato de *C. pachystachya* exerceu uma atividade antiproliferativa promissora, apresentando uma redução média na proliferação de 47% nos três tempos testados, mas seu efeito não foi seletivo, demonstrando citotoxicidade no cultivo primário de astrócitos nas duas concentrações testadas de 400 e 500 µg/mL em 72 horas. Conclui-se que o extrato apresenta ação antiglioma potente, mas efeito citotóxico em células não transformadas. Assim, mais estudos são necessários para avaliar a citotoxicidade em concentrações mais baixas e também os mecanismos envolvidos nos efeitos apresentados pelo extrato de *C. pachystachya*.

Palavras-chave: *Cecropia pachystachya*; Glioblastoma multiforme; citotoxicidade

Abstract

MEINE, Bernardo de Moraes. **Evaluation of the cytotoxicity of *Cecropia pachystachya* extract in glioma cell line (GL261)**. 2018.39f. Completion of course work, Bachelor's degree in Biotechnology. Federal University of Pelotas. Pelotas, RS, Brazil.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and devastating form of brain tumor, accounting for about 50% of all central nervous system (CNS) neoplasms, and the treatment consists of surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy with the standard drug temozolomide. In view of the data presented, it is essential to carry out research that looks for new pharmacological alternatives, with the aim of improving patient's quality of life. In this context, the focus of this study was to evaluate the antitumor effect of *Cecropia pachystachya* extract, at concentrations of 25 to 500 µg/mL, at 24, 48 and 72 hours in mouse glioma lineage (GL261) and to evaluate the cytotoxic potential in primary culture of astrocytes of young rats. Our results demonstrated that *Cecropia pachystachya* extract exerted a promising antiproliferative activity, presenting a mean reduction in proliferation of 47% in the three times tested, but its effect was not selective, demonstrating cytotoxicity in the primary culture of astrocytes in the two tested concentrations of 400 and 500 µg/mL in 72 hours. In conclusion, the extract shows potent antiglioma action, but cytotoxic effect in non-transformed cells. Thus, more studies are needed to evaluate the cytotoxicity at lower concentrations and also the mechanisms involved in the effects presented by the extract of *C. pachystachya*.

Keywords: *Cecropia pachystachya*; Glioblastoma multiforme; cytotoxicity

Lista de Figuras

Figura 1	Classificação dos gliomas.....	20
Figura 2	Avaliação do efeito antiproliferativo do extrato de <i>Cecropia pachystachya</i> em cultura de células de glioma de camundongo (GL261).....	32
Figura 3	Avaliação do efeito citotóxico do extrato de <i>Cecropia pachystachya</i> em cultura de células de glioma de camundongo (GL261).....	33
Figura 4	Avaliação do efeito citotóxico do extrato de <i>Cecropia pachystachya</i> em cultura primária de astrócitos.....	35

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (do inglês)
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Gramas
GL261	Linhagem de glioma de camundongo
GBM	Glioblastoma Multiforme
h	Horas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
min	Minutos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NIH	Instituto Nacional da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TMZ	Temozolomida
µg	Micrograma
µL	Microlitro
%	Porcentagem
°	Graus
x	Vezes
≤	Menor e igual

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVO	16
2.1.	Objetivo Geral	16
2.2.	Objetivos Específicos	16
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1.	Câncer	17
3.2.	Gliomas	17
3.2.1.	Incidência dos Gliomas	18
3.2.2.	Classificação dos Gliomas	19
3.2.3.	Glioblastoma Multiforme	20
3.2.4.	Sintomatologia e Diagnóstico dos Gliomas	21
3.2.5.	Tratamento dos Gliomas	21
3.3.	Tratamentos antitumorais derivados de plantas	23
3.4.	Cecropia pachystachya	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1.	Preparação do Extrato e Concentrações	25
4.2.	Cultivo da Linhagem de Glioma de Camundongo (GL261)	25
4.3.	Cultivo primário de Astrócitos de Ratos	25
4.4.	Tripsinização e Plaqueamento das Linhagens	26
4.5.	Tratamento das Linhagens	26
4.6.	Teste de Viabilidade por MTT	26
	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]	26
4.7.	Teste de proliferação celular por Sulforodamina B	27
	2-[3-(dietilamino)-6-dietilazaniidenexanten-9-il]-5-sulfobenzenossulfonato	27
4.8.	Análise Estatística	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.	CONCLUSÃO	34

1. INTRODUÇÃO

O câncer, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS 2018), é um termo genérico para um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento rápido e desordenado de células, além de seus limites habituais que podem invadir partes adjacentes do corpo e/ou se espalhar para outros órgãos. É um problema a nível global, onde é estimado que ocorram 18,1 milhões novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer no mundo em 2018 (BRAY et al., 2018). Devido ao fato de que o diagnóstico do câncer é realizado em estágios mais avançados da doença, os tratamentos são por diversas vezes limitados e onerosos. Dessa forma, a busca por novas terapêuticas alternativas torna-se cada vez mais importante, com o objetivo de melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes (MILLER et al., 2016).

Sabe-se que o glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral, representando cerca de 50% de todas as neoplasias do sistema nervoso central (HANIF et al., 2017). Pacientes acometidos com GBM apresentam uma sobrevida média de 14-15 meses após o diagnóstico (THAKKAR et al., 2014). É o tumor cerebral com maior letalidade conhecida, sendo caracterizado por uma elevada capacidade infiltrativa através do tecido cerebral (JOVCEVSKA et al., 2013). Atualmente, o tratamento aplicado consiste em ressecção cirúrgica seguido de radioterapia e quimioterapia com o fármaco padrão temozolomida (TMZ) (MRUGALA et al., 2013).

Devido ao alto índice de mortalidade que acomete os pacientes pelo tumor supracitado, e em decorrência da limitação e da ineficiência dos tratamentos disponíveis atualmente, há um crescente interesse da comunidade científica em estudar produtos naturais, com o objetivo de realizar pesquisas e experimentos que busquem novas terapias podendo possibilitar uma melhora no prognóstico dos pacientes. Dessa forma, as plantas tornam-se excelentes alvos de pesquisa, pois apresentam uma grande diversidade em termos de estrutura e propriedades físico-químicas, além de ser uma excelente fonte de compostos biologicamente ativos (SIMÕES et al., 2007). Nesse contexto, os extratos provenientes da folha de *Cecropia pachystachya*, também conhecida como Embaúba, são o foco deste trabalho e apresentam-se como importantes alvos, devido aos seus elevados níveis

de compostos fenólicos, que podem ser relacionados com uma atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antiproliferativa (ARAGÃO et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico do extrato de *Cecropia pachystachya* em linhagem de glioma de camundongo (GL261) e em cultivo primário de astrócitos.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar o efeito do extrato de *Cecropia pachystachya* nos seguintes parâmetros:

- Viabilidade celular de linhagem de glioma de camundongo (GL261);
- Proliferação celular de linhagem de glioma de camundongo (GL261);
- Citotoxicidade em cultivo primário de astrócitos através da análise de viabilidade celular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2018). É considerado uma doença de alta periculosidade em decorrência de seis fatores, que são conhecidos por serem suas “marcas registradas”: sustentar a sinalização proliferativa, evitar supressores de crescimento, resistir a apoptose, permitir a imortalidade replicativa, induzir a angiogênese e ativar a invasão e metástase (HANAHAN et al., 2011).

Existem dois tipos de tumores, os benignos, que não são considerados câncer, pois a massa de células não apresenta características metastáticas, ou seja, não invade outros tecidos, dessa maneira é possível a remoção cirúrgica da massa tecidual localizada. Tumores considerados malignos apresentam características com a capacidade de invasão de tecidos adjacentes, onde nesse caso são classificados como câncer. Essa capacidade de invasão, chamada metástase, permite que o câncer se espalhe para outros locais do corpo, através dos vasos sanguíneos e linfáticos, criando tumores secundários, o que torna essa uma das principais razões pelo qual essa patologia torna-se tão difícil de ser erradicado, principalmente quando o diagnóstico é tardio (NIH, 2015).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2015, o câncer é a primeira causa de morte em pessoas com menos de 70 anos em 48 países e a segunda causa de morte em pessoas com menos de 70 anos em 43 países, e ocupa o terceiro ou quarto lugar em outros 22 países. É estimado que para o Brasil, nos anos de 2018-2019, ocorram 600 mil casos novos de câncer, para cada ano (INCA, 2018).

3.2 Gliomas

Gliomas são os tumores intracerebrais primários mais frequentes, incluindo diversos tipos tumorais e histológicos de malignidade, sendo caracterizado por possuir uma semelhança com as células da glia, as quais executam diversas funções importantes, incluindo o suporte dos neurônios. A origem celular dos gliomas ainda é desconhecida, porém estudos sugerem que se inicie em células estaminais ou progenitoras neurais neoplasticamente transformadas. No entanto, a classificação histológica de gliomas é baseada essencialmente nas semelhanças morfológicas das células tumorais com células gliais não neoplásicas e a presença de características arquitetônicas determinadas (ALCANTARA et al., 2016).

Dentre os gliomas malignos, os GBM estão entre os tipos mais mortais de câncros humanos. Esses tumores foram reconhecidos pela primeira vez e tratados em meados do século XIX, a partir disso têm-se acumulado uma quantidade enorme de dados sobre essa doença, porém observou-se uma baixa melhoria no prognóstico dos pacientes (ARVOLD et al., 2014).

3.2.1 Incidência dos Gliomas

Os gliomas constituem aproximadamente 26% de todos os tumores cerebrais e do sistema nervoso central (SNC) nos Estados Unidos e 80% de todos os tumores cerebrais malignos. Sendo o GBM responsável pela maioria dos gliomas, representando 56,6% de todos os gliomas presentes no SNC. Quanto ao gênero, a taxa de incidência é bem maior em homens (7,14 por 100.000 pessoas) do que em mulheres (5,06 por 100.000 pessoas) (OSTROM et al., 2015). As taxas de incidência ajustadas por idade variam de 4,67 a 5,73 por 100.000 pessoas (LARJAVAARA et al., 2007).

A incidência do astrocitoma anaplásico e o glioblastoma aumentam com a idade, atingindo o pico na faixa etária de 75 a 84 anos. Oligodendrogliomas e oligoastrocitomas são mais comuns na faixa etária de 35 a 44 anos. Os idosos têm menor probabilidade de diagnóstico microscópico de glioma, o que pode estar relacionado com as taxas de incidência relacionadas à idade (DUBROW et al., 2011). Para o Brasil, estimam-se 5.810 novos casos de câncer do SNC em homens e 5.510 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores

correspondem a um risco estimado de 5,62 novos casos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

3.2.2 Classificação dos Gliomas

De acordo com a OMS, em 2007, os gliomas foram divididos com base nas seguintes características: histologia, malignidade e localização no sistema nervoso (LOUIS et al., 2007).

Quanto ao seu grau de malignidade celular, os gliomas foram divididos em 4 diferentes graus (LOUIS et al., 2007). Os tumores classificados como de grau I, são considerados histologicamente benignos e podem ser curados através de ressecção cirúrgica. Já os tumores de grau II ao IV, estão presentes em adultos e são infiltrativos. Os tumores de grau II apresentam uma leve proliferação celular, possuindo um pleomorfismo celular moderado e tornam a ressecção cirúrgica mais difícil em razão de sua capacidade de se infiltrar no cérebro circundante. Os tumores de grau III, por outro lado, têm um alto grau de proliferação, apresentam capacidade metastática e são malignos, conferindo ao paciente uma sobrevida de 2 a 5 anos, porém ainda responde ao tratamento. Tumores como o GBM são classificados como grau IV, pois são excepcionalmente agressivos e malignos, possuindo um grande aumento da atividade mitótica, uma alta capacidade de angiogênese, além de apresentarem necrose e serem resistentes à quimioterapia (CLOUGUESY et al., 2014).

No entanto, em 2016, os tumores do SNC foram reclassificados, onde foram adicionadas neoplasias recém descobertas, dessa forma, removendo variantes e padrões que já não demonstravam mais tanta importância diagnóstica e/ou biológica. Nessa classificação, pela primeira vez, são usados parâmetros moleculares, possibilitando assim a elaboração de diagnósticos de tumores do SNC estruturados na era molecular (LOUIS et al., 2016).

Segundo a OMS, em 2007, a classificação dos gliomas quanto a sua histologia compreendia o agrupamento de todos os tumores astrocíticos. Todavia, na nova classificação, conforme a Figura 1, são agrupados todos os gliomas difusos com capacidade de infiltração tanto os astrocitários quanto os oligodendrogliais,

baseando-se não apenas no seu padrão e comportamento de crescimento, mas também na presença de mutações nos genes IDH1 e IDH2, o que permite definir a sua classificação (LOUIS et al., 2016).

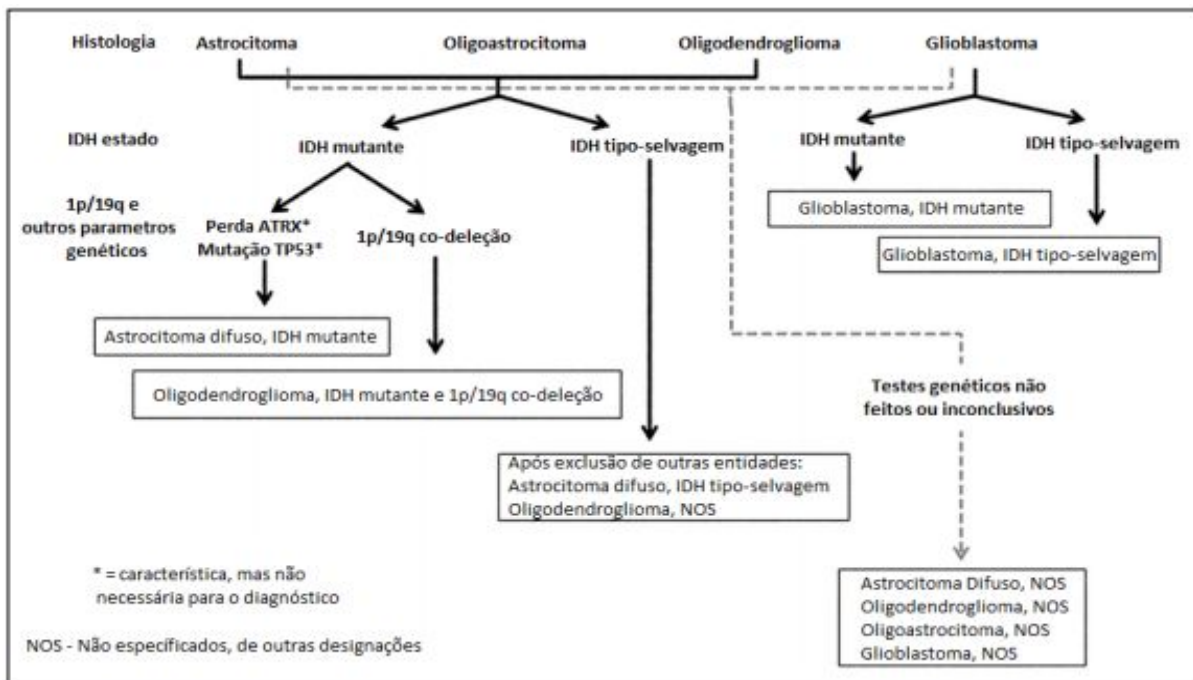


Figura 1 – Classificação dos gliomas (adaptado de LOUIS et al., 2016)

3.2.3 Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral, representando cerca de 50% de todas as neoplasias do SNC, além de apresentar uma grande divergência histológica (HANIF et al., 2017). O GBM é considerado uma astrocitoma de grau mais avançado ou de grau IV, sendo identificado como um tumor muito agressivo e considerado um astrocitoma, pois se origina a partir dos astrócitos e pode ser classificado em dois subtipos: glioblastoma primário, que se instala diretamente no grau IV sem a presença de uma progressão anterior da doença, e o glioblastoma secundário, que se origina da progressão de tumores tipo II e III e pode levar entre 5 e 10 anos para se estabelecer no grau IV (KLEIHUES, 1999).

Pacientes acometidos com GBM apresentam uma sobrevida média de 14-15

meses após o diagnóstico, além disso, a sobrevida é ainda menor no caso de ser um glioblastoma primário (THAKKAR et al., 2014). É o tumor cerebral com maior incidência na população e também de maior letalidade, mesmo não possuindo uma capacidade metastática muito alta, ele ainda possui uma elevada capacidade infiltrativa através do tecido cerebral (JOVCEVSKA et al., 2013).

3.2.4 Sintomatologia e diagnóstico dos gliomas

Ainda que nos dias atuais o câncer seja uma doença de conhecimento geral, no caso das neoplasias cerebrais, como os gliomas, o diagnóstico geralmente é feito depois que os sintomas já estão presentes no paciente após um longo período de tempo, existindo dessa forma um intervalo de tempo considerável entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Esse fato ocorre, porque normalmente o paciente não tem conhecimento de que esses sintomas são sugestivos da existência de um tumor cerebral ao invés de outra condição benigna, procurando ajuda médica apenas quando os sintomas se tornam agudos (BUNYARATAVEJ et al. 2010).

Concomitante a isso, é possível observar a presença de alguns sintomas que podem ser decorrentes de um tumor no cérebro, sendo divididos dessa maneira em sintomas motores, como enfraquecimento de força física nas extremidades do corpo, sintomas visuais, como a diminuição do foco, da acuidade e do campo de visão, sintomas hormonais, como a diminuição da libido, e o por último o aumento da pressão intracraniana, podendo causar desequilíbrio, vômitos, vertigem, ataxia, cefaleia e até a morte (BUNYARATAVEJ et al. 2010).

O diagnóstico de um tumor cerebral suspeito depende de imagens cerebrais e histopatologia adequada. A ressonância magnética (RM) com gadolínio é a ferramenta preferida devido a sua resolução e aprimoramento com agentes de contraste. Se a ressonância não puder ser realizada (por exemplo, em pacientes com implantes metálicos, dispositivos embebidos ou claustrofobia), a tomografia computadorizada de cabeça e coluna (TC) é aceitável. Imagens adicionais, como perfusão por ressonância magnética, espectroscopia de ressonância magnética ou tomografia por emissão de pósitrons fluordesoxiglicose, podem ser necessárias para o diagnóstico e estadiamento (JACOBS et al., 2005; TREISTER et al., 2014).

3.2.5 Tratamento dos gliomas

A sobrevida do paciente se dá conforme o grau de malignidade do tumor, os de grau II tem uma sobrevida média de 5 a 10 anos, os de grau III de 2 a 3 anos, já os de grau IV, no caso de ser um glioblastoma secundário de 9 a 14 meses e sendo um glioblastoma primário, de 9 a 12 meses. A sobrevida do paciente está diretamente relacionada com a agressividade do tumor (FURNARI et al., 2007).

A ressecção cirúrgica é o tratamento padrão, realizado sempre que possível. Dependendo do tipo de tumor, a cirurgia pode reduzir a carga tumoral, controlar convulsões, reverter déficit neurológico, introduzir o agente terapêutico local e melhorar a qualidade de vida. O GBM é um tumor localmente muito invasivo que não pode ser curado completamente por cirurgia e a recorrência do tumor ocorre em aproximadamente 80% dos casos. No entanto, no caso de pacientes recém-diagnosticados, a extensão da ressecção cirúrgica tem valor prognóstico, no entanto, quando os tumores residem em locais como córtex, tronco cerebral ou gânglios basais não são passíveis de intervenção cirúrgica e geralmente têm o pior prognóstico (MRUGALA, 2013).

O tratamento cirúrgico é usualmente seguido por radioterapia para neutralizar as células tumorais remanescentes, mostrando sua capacidade em melhorar a expectativa de vida dos pacientes. Subgrupos de pacientes que sofreram uma ressecção total podem obter uma vantagem de sobrevida após receberem radioterapia estereotáxica. No entanto, a radioterapia hiperfracionada mostrou que os resultados de sobrevida no GBM podem, na verdade, ser desfavoráveis em certos subgrupos de pacientes. Vários fatores de limitação e de risco estão associados à radioterapia, incluindo a natureza invasiva do GBM, a necrose de radiação, o dano neuronal permanente induzido pela radiação e a rádio-resistência de alguns tumores (CHANG et al., 2007).

A temozolomida (TMZ) é o quimioterápico usual para pacientes com GBM. A administração oral, como adjuvante ou concomitante à radioterapia, está se tornando um padrão de tratamento para pacientes com GBM, pelo menos em países que podem arcar com o alto preço da terapia com TMZ. O principal mecanismo responsável pela citotoxicidade da TMZ é a metilação da guanina no DNA na

posição N7 e O6, levando ao fracasso do sistema de reparo de DNA em encontrar uma base complementar para a guanina metilada, resultando em cortes longos no DNA, conseqüentemente bloqueando o ciclo celular na fase G2-M, dessa maneira desencadeando a apoptose (SCOTT et al., 2011). No entanto, existem relatos demonstrando que altos níveis de metilguanina metiltransferase (MGMT) em células tumorais estão associados a uma fraca resposta ao TMZ. A MGMT é uma proteína crítica de reparo de DNA que protege células tumorais contra agentes quimioterápicos alquilantes (CHANG et al., 2007). Embora o TMZ tenha aumentado ligeiramente a sobrevida dos pacientes, ele também é responsável por induzir muitos efeitos adversos, como náuseas, fadiga, perda de cabelo e do apetite, entre outros (SENGUPTA et al., 2012).

3.3 Tratamentos antitumorais derivados de plantas

As plantas têm sido usadas como medicamentos por pelo menos 60.000 anos, uma vez que seus metabólitos secundários possuem amplas propriedades, incluindo atividade anticancerígena (FABRICANT et al., 2001). Os compostos fenólicos, como os flavonoides, estão entre os metabólitos derivados mais promissores de plantas para o tratamento de câncer (WAHL et al, 2011).

Extratos derivados de plantas vêm sendo usados como fontes de metabólitos secundários com potencial anticancerígeno, sendo possível a produção de importantes alvos no desenvolvimento de novas terapias, visando à melhora na qualidade de vida dos pacientes. Alguns estudos recentes relataram que agentes antitumorais derivados de compostos naturais possuem diversos mecanismos de ação promissores, como ligação a microtúbulos, inibição da topoisomerase, metilação do DNA, parada do ciclo celular e geração de apoptose, onde tais propriedades foram testadas em linhagens tumorais, animais experimentais e em tratamentos quimioterápicos humanos (LICHOTA et al., 2018). O extrato derivado de *Cecropia pachystachya* já demonstrou atividade citotóxica em linhagens celulares humanas de leucemia (ARAGÃO et al., 2012).

O número de publicações que relatam a atividade anticancerígena de extratos de plantas está se expandindo rapidamente: uma pesquisa bibliográfica no PubMed

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) em 1º de novembro de 2018 resultou em 5595 resultados incluindo 644 artigos de revisão ao usar o termo de pesquisa “extrato vegetal anti-câncer ”e um aumento maciço na atividade de publicações pode ser observado no campo desde o ano 2000.

3.4. *Cecropia pachystachya*

A espécie *Cecropia pachystachya* é uma árvore pertencente à família Urticaceae, que são representadas por plantas eudicotiledôneas, onde a família é constituída por 55 gêneros e mais de 2000 espécies, variando entre plantas de porte herbáceo até lenhosas.

O gênero *Cecropia*, é considerado o de maior destaque da família na flora brasileira, onde suas espécies são conhecidas por Embaúbas, árvores típicas no interior de clareiras presentes em grande parte do território nacional, especialmente como árvores pioneiras em áreas desmatadas que também possuem grande interesse comercial e medicinal (SOUZA et al., 2008).

Além disso, essas árvores servem como proteção e abrigo para diversas espécies de aves e outros animais silvestres, além de manter uma relação de mutualismo com formigas e outros insetos, pois possuem o tronco oco e suscetível à habitação (ROQUE, 1968)

As embaúbas também vêm mostrando um grande potencial terapêutico advindo de compostos presentes em suas folhas e casca, como por exemplo, atividade hipoglicêmica em modelos animais de diabetes (ARAGÃO et al., 2010), proteção cardiovascular (CONSOLINI et al., 2005), efeito cardiotônico e sedativo (CONSOLINI et al., 2006), ação anti-inflamatória (HIKAWCZUK et al., 1998), antinociceptiva e citotóxica (ARAGÃO et al., 2012), bem como neuroprotetora em modelos animais de transtornos de humor (GAZAL et al., 2014; 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extrato

As partes aéreas da *C. pachystachya* foram coletas em Viamão (Rio Grande do Sul, Brasil). As folhas foram secas (35–40°C) por 3 dias em estufa de ar circulante e depois fez-se a extração por decocção. Resumidamente, as folhas pulverizadas (100 g) foram extraídas com água destilada fervida por 30 min, o extrato foi filtrado, liofilizado e o pó armazenado a –20°C até a realização dos ensaios.

Para os ensaios *in vitro* foi preparada uma solução estoque do extrato (0,1 g em 1000 µL de água para injetáveis) e a partir dessa foram feitas diluições nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL. Tanto a solução estoque quanto as diluições foram preparadas em condições de esterilidade.

4.2 Cultivo da linhagem de glioma de camundongo (GL261)

A linhagem foi obtida da ATCC (*American Type Culture Collection* - Rockville, Maryland, USA) e cultivada em meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas sob condições padrões de cultivo em incubadora a 5% de CO₂, a uma temperatura de 37°C e atmosfera umidificada, até atingirem uma confluência de 90%.

4.3 Cultivo primário de astrócitos de ratos

O cultivo dos astrócitos foi realizado como descrito previamente por Da Frola et al., (2009). Primeiramente, o córtex cerebral de ratos Wistar recém-nascidos (1 a 3 dias de idade) foram removidos e dissociados mecanicamente em CMF (pH 7,4), contendo NaCl 137 mM, KCl 5,36 mM, 0,27 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 1,1 mM e glicose 6,1 mM. O tecido dissociado foi submetido à centrifugação de 1000 x g por 5 min. Posteriormente o pellet de células foi suspenso em DMEM (pH 7,6) suplementado com 10% de SFB. Após isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços revestidas com poli-L-lisina. As culturas foram mantidas em incubadora a 5% de CO₂ até atingir a confluência em 15-20 dias e o meio foi substituído a cada 5 dias. Todos

os procedimentos utilizados no presente estudo seguiram os “Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório” do Instituto Nacional de Saúde e foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFPel.

4.4 Tripsinização e plaqueamento das linhagens

Após as células atingirem a confluência de 90%, elas estavam aptas a serem semeadas. Com isso, foi retirado o meio da garrafa e as células foram soltas com a adição de tripsina, a garrafa retornou para a incubadora por 5 minutos e após esse período foi adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SFB para neutralizar o efeito da tripsina. Para a contagem, foram retirados 10 µL do total do volume da garrafa e colocados na câmara de Neubauer para a devida contagem das células em microscópio óptico. Em seguida da contagem, foram realizados os cálculos e verificado o quanto de volume deveria ser retirado de acordo com o número de células que foi preciso no experimento, que seria 5×10^3 células, posteriormente foi adicionado um volume final de meio, o qual é necessário para o plaqueamento.

Para o plaqueamento foram utilizadas placas de 96 poços, onde foram semeados 100 µL em cada poço do homogeneizado (meio + células). Placas foram incubadas a 37 °C por 24 h até o momento do tratamento.

4.5 Tratamento das Linhagens

O extrato de *C. pachystachya* foi dissolvido em água para injetáveis a uma concentração de 100 mg/mL (solução estoque), a partir da qual foram preparadas as soluções de uso (25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL) as quais foram utilizadas no tratamento. Células expostas ao DMEM foram consideradas como controle. Após o tratamento, as placas novamente foram incubadas a 37°C durante 24, 48 e 72 h. Todo o processo foi realizado em condições de esterilidade.

4.6 Teste de Viabilidade por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]

O ensaio do MTT é baseado na redução celular de MTT[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] (MOSMAN, 1983). Através da quantificação da redução do

MTT, o mesmo é estabelecido como um método colorimétrico simples que avalia a viabilidade celular. Sendo assim, após a redução, o MTT formará cristais de formazan, na coloração violeta, que após serem dissolvidos irão absorver na região do visível e poderão ser quantificados por espectrofotometria. Para isso, após decorrido o tempo do tratamento de 24, 48 e 72 h, foi retirado o meio de incubação da placa e as células foram lavadas gentilmente com PBS, posteriormente foi adicionado por poço uma solução de MTT, a uma concentração de 0,5 mg/mL. Por fim, as células foram incubadas por 90 min a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. O precipitado formado foi diluído em 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 492 nm, onde os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

4.7 Teste de Proliferação por Sulforodamina B 2-[3-(dietilamino)-6-dietilazanilidenexanten-9-il]-5-sulfobenzenossulfonato

O ensaio do sulforodamina B é baseado na utilização de um corante aminoxanteno de coloração rosa que possui dois grupos sulfônicos e é capaz de marcar proteínas (SKEKAN, 1990). Dessa forma, o corante se liga aos resíduos de aminoácidos em células fixadas por TCA, marcando esses resíduos, onde será possível quantificar a proliferação celular em um espectrofotômetro, fornecendo assim um índice sensível de proteína celular (SKEKAN, 1990).

Sendo assim, depois de decorrido o tempo do tratamento de 24, 48 e 72 horas, o meio foi removido e foram adicionados 50 µL de TCA por poço. As células foram incubadas na geladeira a 4°C por 45 min, o TCA foi aspirado e as células foram lavadas 5 vezes com água destilada. Foi adicionado 50 µL de sulforodamina por poço, as placas foram incubadas no escuro por mais 30 min. Decorrido esse tempo as células foram lavadas 5 vezes com ácido acético 1%, onde foram secas a temperatura ambiente, seguido pela solubilização do corante com 10 mM de tris (pH 10,5) durante 5 min em agitação, por fim, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 530 nm, onde os resultados foram expressos como porcentagem do controle.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados em triplicata, utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0. Todas as análises foram feitas pelo teste ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Tukey, os valores foram considerados significativos para um valor de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linhagem celular de glioma de camundongo (GL261) foi utilizada com o objetivo de avaliar o efeito *in vitro* do extrato de *C. pachystachya* nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL, durante 24, 48 e 72 h, sobre a proliferação celular pelo método do sulforodamina B e sobre a viabilidade celular pelo método do MTT.

De acordo com o apresentado na Figura 2A, pode-se observar que o extrato reduziu significativamente a proliferação celular da GL261 a partir da concentração de 100 µg/mL, com uma redução média de 45% no tempo de 24 h de exposição ao tratamento. Na figura 2B pode-se observar uma redução significativa da proliferação celular pelo extrato a partir da concentração de 50 µg/mL, com uma média de 57% de redução em 48 h. Houve também uma redução significativa da proliferação celular a partir de 100 µg/mL, porém com uma redução média entre as concentrações de 41% em 72 h (Figura 2C). O tratamento com o extrato apresentou o seu maior efeito no tempo de 48h, na concentração de 300 µg/mL, com uma redução de 65,5% da proliferação celular.

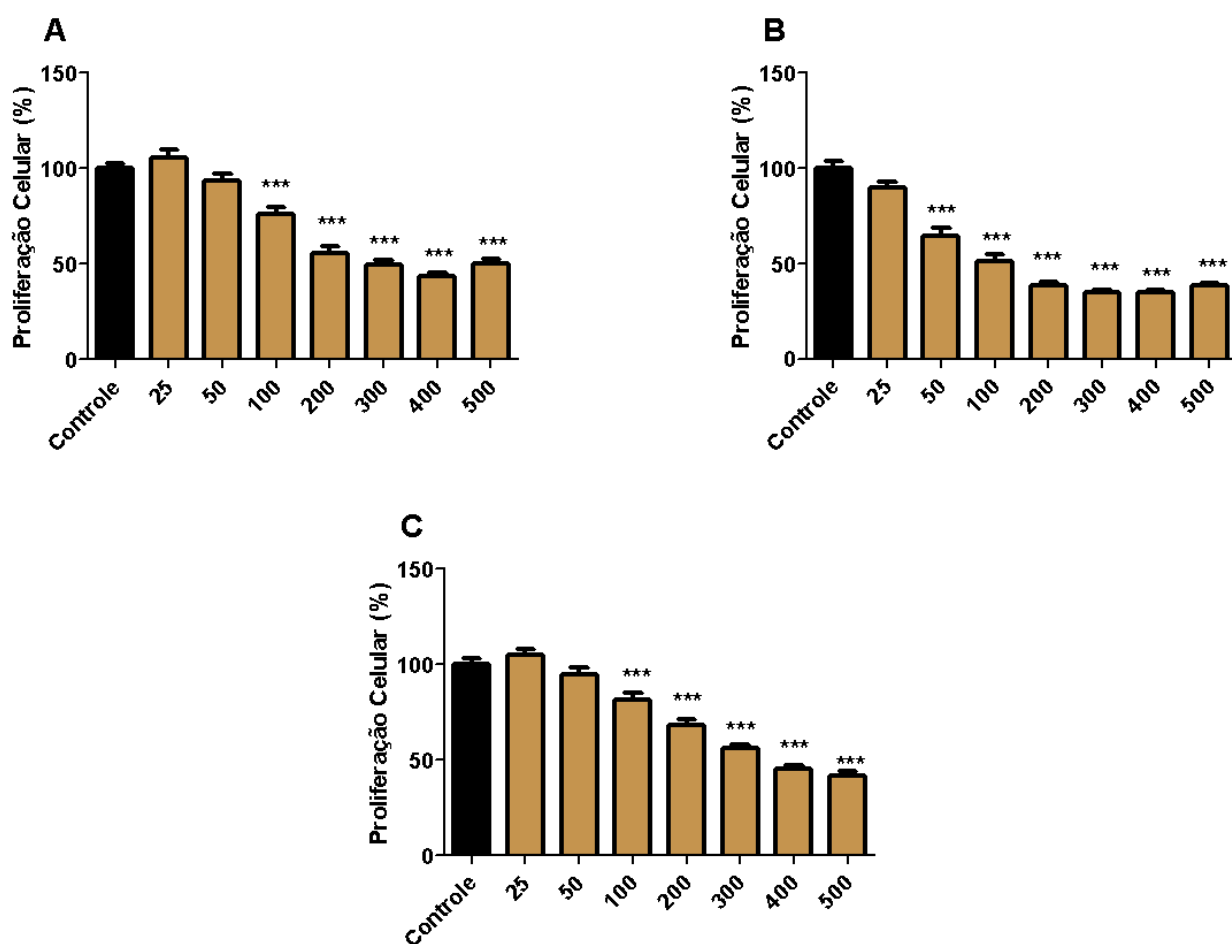


Figura 2 – Avaliação do efeito antiproliferativo do extrato de *Cecropia pachystachya* em cultura de células de glioma de camundongo (GL261). As culturas foram tratadas com concentrações crescentes do extrato (25 - 500 µg/mL) por 24 (A), 48 (B) e 72 h (C), a proliferação celular foi avaliada pelo método do sulforodamina B. Dados são expressos como média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey. (***) Diferença significativa quando comparado ao controle ($P \leq 0,001$).

Com relação à viabilidade celular, a Figura 3A demonstra que o extrato reduziu aproximadamente 28% a viabilidade celular a partir da concentração de 200 µg/mL no tempo de 24 h. No entanto, em 48 h, o extrato diminuiu a viabilidade celular apenas na concentração de 200 µg/mL (Figura 3B). Na Figura 3C, pode-se observar que não ocorreu alteração na viabilidade em nenhuma concentração testada.

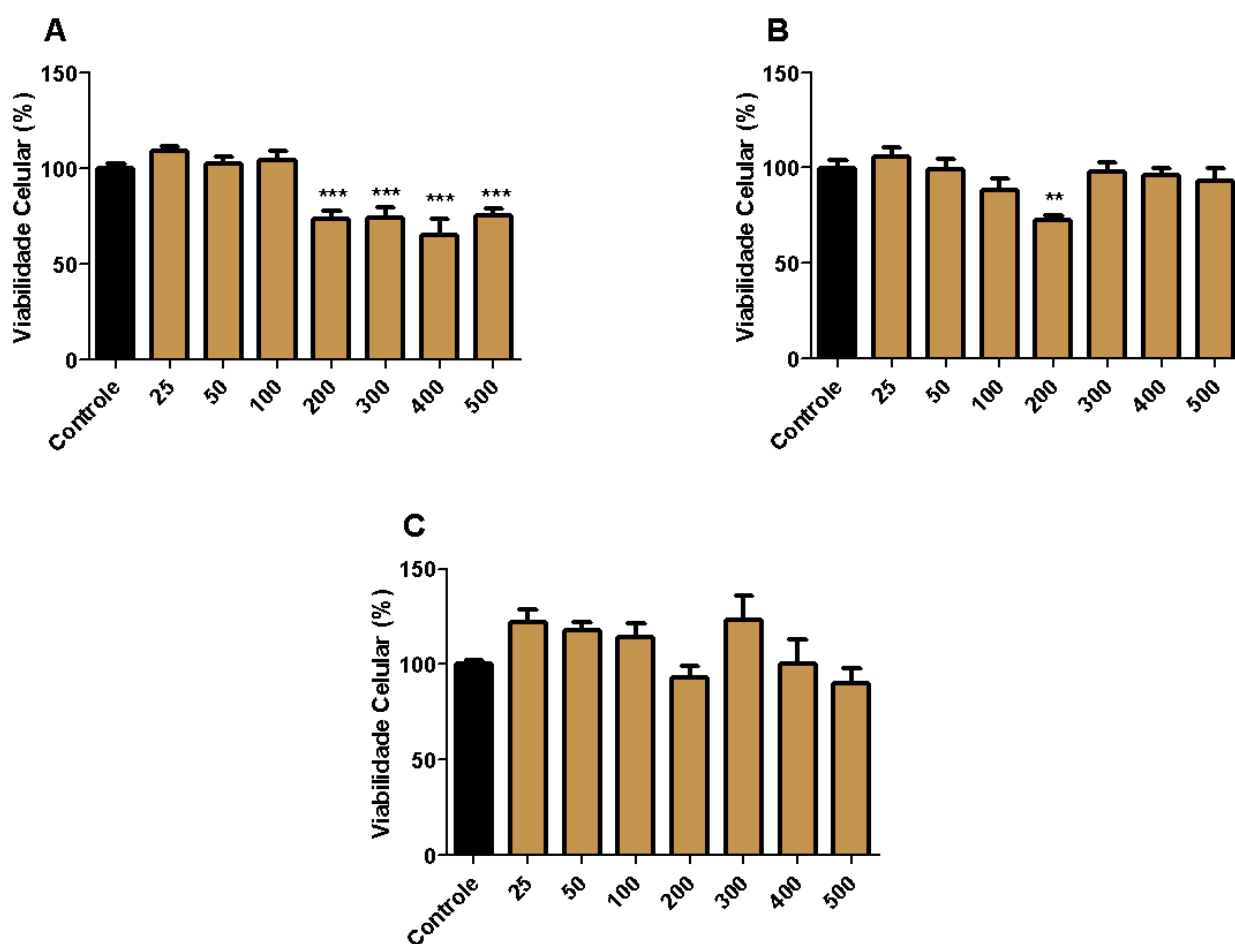


Figura 3 – Avaliação do efeito citotóxico do extrato de *Cecropia pachystachya* em cultura de células de glioma de camundongo (GL261). As culturas foram tratadas com concentrações crescentes do extrato (25 - 500 µg/mL) por 24 (A), 48 (B) e 72 h (C), a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Dados são expressos como média \pm desvio padrão três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey. (**) Diferença significativa quando comparado ao controle ($P < 0,01$) (***) Diferença significativa quando comparado ao controle ($P < 0,001$).

Por fim, foi realizado um cultivo primário de astrócitos com o objetivo de avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato de *C. pachystachya* nas concentrações de 400 e 500 µg/mL durante o tempo de 72 h. Os resultados foram analisados através dos testes do MTT e da sulforodamina B. Através dos resultados obtidos, é possível observar que o extrato de *Cecropia pachystachya* não apresentou um efeito seletivo para glioma, demonstrando citotoxicidade frente à cultura celular de astrócito, diminuindo tanto a viabilidade quanto a proliferação celular (Figura 4A e 4B).

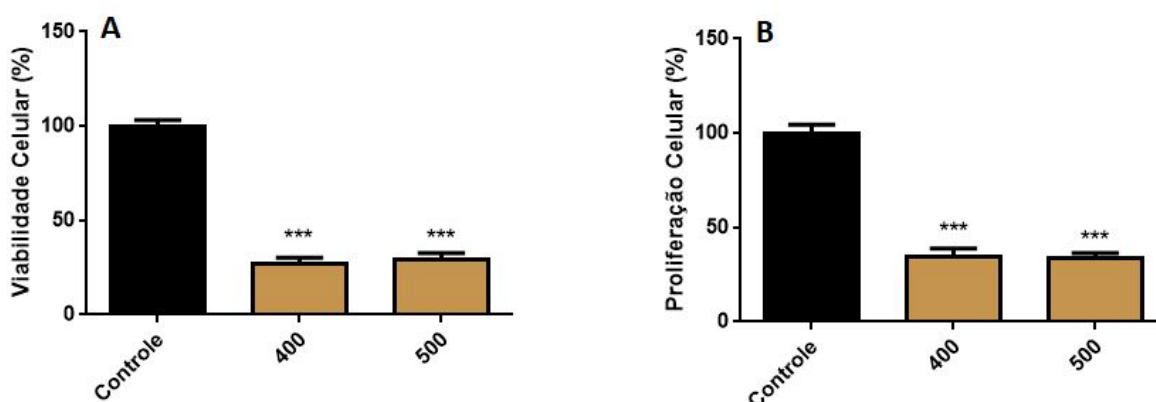


Figura 4 – Avaliação do efeito citotóxico do extrato de *Cecropia pachystachya* em cultura primário de astrócitos de ratos jovens. As culturas foram tratadas com concentrações crescentes do extrato (400 - 500 µg/ml) por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a proliferação celular foi avaliada pelo teste do sulforodamina B. Dados são expressos como média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey. (***) Diferença significativa quando comparado ao controle ($P < 0,001$).

Nossos resultados demonstraram uma significativa capacidade antiproliferativa do extrato de *C. pachystachya*, que pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos no extrato, dentre estes uma grande quantidade de flavonoides e ao composto encontrado em maior quantidade no extrato, o ácido clorogênico, que também é conhecido por possuir atividade anticancerígena (ORTMANN et al., 2017).

O ácido clorogênico é o éster do ácido cafeico e do ácido quínico, funcionando como um intermediário na biossíntese da lignina (CLIFFORD et al., 2003). Além disso, é responsável por apresentar efeito antibacteriano, antiviral, antioxidante e antitumoral (GIL, 2017). Ademais, seu mecanismo molecular antitumoral foi elucidado, onde o ácido clorogênico foi responsável por induzir a expressão dos genes GSK-3 β e APC e inibir o gene β -cateína, promovendo a apoptose de linhagens tumorais murinas de câncer de mama (RUOSHI et al., 2018).

Além disso, outros estudos foram realizados com o intuito de testar extratos derivados de plantas com a presença de compostos anticancerígenos, onde extratos dos frutos de cajá foram responsáveis por exercer um efeito citotóxico em modelos murinos de melanoma *in vivo* e *in vitro* (YOLANDE et al., 2018). Extratos de chá Oolong induziram dano ao DNA de linhagens celulares de câncer de mama, além de inibir o crescimento celular e a tumorigênese (SHI et al., 2018). Além disso, cascas

do caule de cipó-miraruíra foram capazes de exercer uma atividade antileucêmica em modelos experimentais de leucemia *in vitro* e *in vivo* (RODRIGUES et al., 2018).

CONCLUSÃO

Através do presente estudo, foi possível constatar uma atividade citotóxica do extrato de *C. pachystachya* frente à linhagem de glioma de camundongo, representando um interessante composto com potencial terapêutico. No entanto, o extrato demonstrou citotoxicidade no cultivo primário de astrócitos. Dessa forma, mais estudos precisam ser realizados com o intuito de avaliar os mecanismos celulares envolvidos no efeito citotóxico observado, estudar os compostos majoritários presentes no extrato e também reduzir as concentrações testadas.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA Sheila, PARADA Luis et al. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications **British Journal of Cancer**.(2016). doi: 10.1038/bjc.2016.354
- ARAGÃO Danielle, GUARIZE Lyvia, LANINI Juliana et al. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**.(2010). doi:10.1016/j.jep.2010.01.008
- ARAGÃO, Danielle ; LIMA, Isabel ; DA SILVA, Josiane et al .Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**.(2013).doi: 10.1002/ptr.4811
- ARVOLD, Nils ; REARDON, David et al. Treatment options and outcomes for glioblastoma in the elderly patient **Clinical Intervation in Aging**.(2014).doi: 10.2147/CIA.S44259
- BRAY, Freddie ; FERLEY, Jackes et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries **CA: A Cancer Journal for Clinicians**.(2018).doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- BUNYARATAVEJ, Krishnapundha ; SIWANUWATN, Rungsak ; CHANTRA Kraisri et al. “Duration of symptoms in brain tumors: influencing factor and its value in predicting malignant tumors”, **Journal of the Medicine Association of Thailand**.(2010).PMID: 20718165
- CHANG, Julie ; KHUNTIA, Deepak ; ROBINS, Ian et al. Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. **Clinical Advances in Hematology and Oncology**.(2007).PMID: 18185489
- CLIFFORD, Michael; JONHSTON, Kelly; KNIGHT, Susan.Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.(2003).doi:10.1021/jf026187q
- CLOUGHESY, Timothy ; CAVENEE, Webster ; MISCHERL, Paul. Glioblastoma:from molecular pathology to targeted treatment.**Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**.(2014). doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130324>

- CONSOLINI, Alicia ; MIGLIORI Graciela et al. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**.(2005).doi: 10.1016/j.jep.2004.09.030
- DA FROTA, Mário ; BRAGANHOL Elizandra ; CANEDO, Andrés et al. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. **Investigational New Drugs**.(2009). DOI: 10.1007/s10637-008-9134-3
- DUBROW, Robert ; DAREFSKY, Amy et al. Demographic variation in incidence of adult glioma by subtype, United States, 1992-2007. **BioMed Central Cancer**.(2011).doi: 10.1186/1471-2407-11-325
- FABRICANT, Daniel ; FARNSWORTH, Norman et al. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery.**Environmental Health Perspectives**. (2001).doi: .
<http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/2001/suppl-1/69-75fabricant/abstract.html>
- FURNARI, Frank et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & development**.(2007).doi: 10.1101/gad.1596707
- GAZAL, Marta ; KAUFMANN, Fernanda ; ACOSTA, Bruna et al. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. **Neurochemical Research**. (2015).doi: 10.1007/s11064-015-1610-5
- GAZAL, Marta ; ORTMANN, Caroline ; Martins, Fernanda et al. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**.(2014).doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.07.007
- HANIF, Farina ; MUZAFFAR, Kanza ; PERVEEN, Kahkashan et al. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific journal of cancer prevention**.(2017).doi:10.22034/APJCP.2017.18.1.3
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em -
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> Acesso em Outubro de 2018.

- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em - <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp> Acesso em Outubro de 2018.
- JACOBS, Andreas ; KRACHT, Lutz ; GOSSMANN, Axel, et al. Imaging in neuro oncology. **Neurotherapeutics**.(2005).doi:10.1602/neurorx.2.2.333
- JOVCEVSKA Ivana, KOCEVAR Nina, KOMEL Radovan. Glioma and glioblastoma-how much do we (not) know? **Molecular and Clinical Oncology**.(2013).doi:10.3892/mco.2013.172
- LARJAVAARA, Suvi ; MANTYLA Riitta ; SALMINEN, Tiina et al. Incidence of gliomas by anatomic location. **Neuro-Oncology**.(2007). doi: 10.1215/15228517-2007-016
- LICHOTA, Anna ; GWOZDZINSKI, Krzysztof et al. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine. **Environment International Journal of Molecular Science**.(2018).doi:<https://doi.org/10.3390/ijms19113533>
- LOUIS, David ; PERRY, Arrie et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary **Acta Neuropathologica**.(2016).doi:10.1007/s00401-016-1545-1
- MILLER, Kimberly ; SIEGEL, Rebecca ; LIN, Chun Chieh et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**.(2016).doi: 10.3322/caac.21349.
- MOSMANN, Tim et al. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**.(1983). PMID: 6606682
- MRUGULA, Maciej et al. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma:a clinician's perspective. **Discovery Medicine**.(2013).PMID: 23636139
- National Cancer Institute Disponível em - <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> Acesso em Outubro de 2018.
- Organização Mundial da Saúde Disponível em - <http://www.who.int/cancer/en/> Acesso em Outubro de 2018.

- ORTMANN, Caroline ; ABELAIRA, Helena ; RÉUS, Gislaine et al. LC/QTOF profile and preliminary stability studies of an enriched flavonoid fraction of *Cecropia pachystachya* Trécul leaves with potential antidepressant-like activity. **Biomedical Chromatography**.(2017).doi:
<https://doi.org/10.1002/bmc.3982>

- OSTROM, Quinn ; GITTLEMAN, Haley et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015 **Neuro-Oncology**.(2018). doi:
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noy131>.

- KLEIHUES, Paul ; OHGAKI , Hiroko et al. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro-Oncology**.(1999). doi:10.1093/neuonc/1.1.44.

- RODRIGUES, Ana ; DE OLIVEIRA, Felipe ; DIAS, Rosane et al. In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**.(2018).doi:
10.1016/j.jep.2018.11.008

- ROQUE, Carlos. Grande enciclopédia da Amazônia. **Amazônia Editora**. (1968).

- RUOSHI, Xiu ; QIUMEI, Kang ; JIE, Ren et al. Antitumor Molecular Mechanism of Chlorogenic Acid on Inducing Genes GSK-3 β and APC and Inhibiting Gene β -Catenin. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. (2013).doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2013/951319>

- SCOTT, Jacob ; TSAI, Ya-Yu ; CHINNAIYAN, Prakash et al. Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics** .(2011). doi:
10.1016/j.ijrobp.2010.04.033

- SENGUPTA, Sadhak ; MARRIANAN, Jaclyn ; FRISHMAN, Caroline et al. Impact of temozolomide on immune response during malignant glioma chemotherapy. **Clinical and Developmental Immunology**.(2012).doi:
<http://dx.doi.org/10.1155/2012/831090>

- SHI Haihong, LIU Jin et al. Oolong Tea Extract Induces DNA Damage and Cleavage and Inhibits Breast Cancer Cell Growth and Tumorigenesis. **Anticancer Research**.(2018).doi:10.21873/anticancer.12976.

- SIMÕES, Cláudia et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª edição. **Editora da UFSC**.(2007).
- SKEHAN, Philip ; STORENG, Ritsa ; SCUDIERO, Dominic et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**.(1990). PMID: 2359136
- SOUZA, Vinicius ; LORENZI, Harri. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil. **Instituto Plantarum**.(2008).
- THAKKAR, Jigisha ; DOLECEK, Therese ; HORBINSKI, Craig et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of Glioblastoma. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**.(2014). doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
- TREISTER, Daniel ; KINGSTON, Sara ; HOQUE, Kristina et al. Multimodal magnetic resonance imaging evaluation of primary brain tumors. **Seminars in Oncology**.(2014).doi:10.1053/j.seminoncol.2014.06.006
- YOLANDE, Feudjio ; SAYANTAN Bhattacharyya et al. Cytotoxic Effect of Spondias cytherea Fruit Extract in Murine Melanoma Model In Vivo and In Vitro. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**. (2018).doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026697
- WAHL, Oliver., OSWALD, Martin., TRETZEL, Louis et al. Inhibition of tumor angiogenesis by antibodies, synthetic small molecules and natural products.**Current Medicinal Chemistry**.(2011).doi: 10.2174/092986711796391570