

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Estudo químico e avaliação dos efeitos de *Baccharis trimera* na proliferação e morte de células de glioblastoma

LUCIMARA NARDI COMUNELLO

Porto Alegre, 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Estudo químico e avaliação dos efeitos de *Baccharis trimera* na proliferação e morte de células de glioblastoma

Dissertação apresentada por
Lucimara Nardi Comunello
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Grace Gosmann
Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre, 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21/03/2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Melissa Camassola

Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Aline Rigon Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Comunello, Lucimara Nardi
Estudo químico e avaliação dos efeitos de Baccharis
trimera na proliferação e morte de células de
glioblastoma / Lucimara Nardi Comunello. -- 2014.
93 f.

Orientadora: Grace Gosmann.
Coorientador: Diogo Losch de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Baccharis trimera. 2. terpenos. 3. compostos
fenólicos. 4. glioma. I. Gosmann, Grace, orient. II.
Oliveira, Diogo Losch de, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia e no Laboratório 24 do Departamento de Bioquímica, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES, CNPq e FAPERGS. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcutá)

Dedico este trabalho a todas as pessoas que lutam contra o **CÂNCER**.

Se ele representar uma mísera gota dentro de um oceano de possibilidades e estudos a ainda serem desenvolvidos, então saberei que cumpri meu dever.

AGRADECIMENTOS

“O segredo de um grande sucesso está no trabalho de uma grande equipe”

(Murillo Margarida)

Meus sinceros agradecimentos:

À prof. Dra. Grace Gosmann, por ter me aberto as portas do “mundo da pesquisa” e sempre ter confiado no meu trabalho. Por me permitir arriscar, “tocar ficha” e me tornar a pesquisadora que sou hoje. Pelos ensinamentos, pela paciência, pelos exemplos e pela troca de experiências nesses 6 anos de convívio.

Ao prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira, por ter aceitado a proposta de parceria de trabalho e me permitido conhecer outro mundo dentro do universo da pesquisa científica.

À prof. Dra. Ana Battastini e ao doutorando Fabrício Figueiró, do laboratório 22 do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela parceria nos ensaios de citometria de fluxo. Ao prof. Dr. Fábio Klamt e ao doutorando Leonardo Motta, do laboratório 24, pela parceria nos ensaios com SRB.

Ao prof. Dr. Sérgio Bordignon, pela identificação botânica e coleta da planta.

Ao pessoal do Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica, pelo o que eu nem consigo descrever em palavras. Simplesmente por ter tido a chance da convivência, da amizade, das trocas, de tudo o que vivemos nesses seis anos e de poder levar pessoas tão especiais para o resto da vida no coração. Em especial à minha eterna “chefinha”, Cristiane Oliveira, por todos os ensinamentos e pela confiança que me permitiu “asas para voar”. À minha bolsista de iniciação científica, Carulina Bueno Mesquita, por ter sido meus braços direito e esquerdo.

À Mônica Oliveira Duarte, pela amizade e presença de SEMPRE.

Ao pessoal do Laboratório 24 do Departamento de Bioquímica da UFRGS (os mais divertidos que conheci), por terem me aceitado e acolhido. Em especial à Mery Stéfani Leivas Pereira, por TUDO: pela amizade, por todas as ajudas, conversas,

orientações e principalmente por dividir o material mais organizado do mundo comigo. Às bolsistas de iniciação científica Charini Thome, Mariana Dotto e Scheron Rathke Giubel pelo auxílio nos ensaios biológicos.

Aos meus pais, Luigi e Helena, por terem me dado todas as oportunidades que me fizeram chegar até aqui. Pelo amor incondicional, pelo exemplo, pelo incentivo, pela presença constante. Aos meus irmãos, Lucilene, Luciane, Cristiano, Luciele, Adriano e Luciano, porque sem eles nada faz sentido. Aos meus sobrinhos, Camillo, Carolina, Maria Helena e Isabella, pelo amor mais puro, que me deu força em inúmeros momentos. À Tita, por todas as velas acesas e novenas realizadas. À toda a minha família, pelo companheirismo e paciência.

Ao meu esposo, Pedro Felipe, por ter sempre sonhado os meus sonhos, mantido meus pés no chão e acreditado no meu potencial, pelo olhar de orgulho que me fez querer ir em frente e por segurar na minha mão quando precisei. À minha pequena maravilhosa, Manuela, por virar a minha vida de pernas para o ar. Por existir. Por tudo o que tem me ensinado. Por me fazer querer ir em frente e deixar legados para a vida toda. Pela paciência com a mamãe na fase final do mestrado e por ter me acompanhado na gestação em grande parte dos experimentos realizados. Amo vocês!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

À CAPES, pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto. CNPq e FAPERGS.

Muito obrigada!

RESUMO

Glioblastomas são tumores primários do sistema nervoso central, altamente invasivos e resistentes à quimioterapia. Portanto, são necessários mais esforços para levar ao desenvolvimento racional de novas terapias. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), conhecida no Brasil como "carqueja", é amplamente utilizada na medicina popular e tem como constituintes alguns flavonóides. É relatado que compostos fenólicos como a quercetina exercem atividade antiproliferativa e indutora de apoptose em células de glioma. O objetivo deste trabalho foi a busca de compostos ativos de *B. trimera* contra células de glioma e a elucidação de seu mecanismo de ação. A partir das partes aéreas de *B. trimera* foram obtidos um extrato bruto hidroetanólico, uma fração de compostos fenólicos e uma fração de terpenos. As frações foram quimicamente caracterizadas por cromatografia. As células da linhagem C6 de glioma de rato foram incubadas com as amostras de *B. trimera* nas concentrações de 100 a 1.000 µg/mL. Após 24 e 48 horas de incubação, as células tratadas com as amostras e os controles foram submetidas aos ensaios com MTT e SRB. As amostras (extrato bruto hidroetanólico, fração enriquecida de terpenos e fração enriquecida de compostos fenólicos) apresentaram uma inibição da viabilidade celular concentração e tempo dependente. O ensaio de MTT, após 24 horas, demonstrou que as amostras de *B. trimera* inibiram a viabilidade celular em 50% nas concentrações entre 113 e 796 µg/mL. As frações mais ativas na concentração inibitória 50 (IC₅₀, 24 h) foram investigadas para avaliar os mecanismos de morte celular e os efeitos sobre o ciclo celular. O tratamento com as frações não alterou o ciclo celular. O resultado de células C6 tratadas com a fração enriquecida de compostos fenólicos na IC₅₀ coradas com iodeto de propídio (IP) não foi significativo (8,06%), enquanto que por meio da coloração com anexina V, foi significativo em 30,7% de células. Esses resultados são relevantes para futuras avaliações de vias de sinalização envolvidas na apoptose de linhagem de células C6 tratadas com a fração enriquecida de compostos fenólicos de *B. trimera*. Também a redução da viabilidade de células C6 causada pelo tratamento com a fração enriquecida de terpenos requer uma investigação mais aprofundada do mecanismo de morte celular envolvido.

Palavras-chave: *Baccharis trimera*, terpenos, compostos fenólicos, glioma, células C6

ABSTRACT

CHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF THE EFFECTS OF *Baccharis trimera* IN THE PROLIFERATION AND DEATH OF GLIOBLASTOMA CELLS

Glioblastoma are primary tumors of the central nervous system, highly invasive and resistant to chemotherapy. Therefore, more efforts are needed to lead to a rational development of new therapies. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), known in Brazil as “carqueja”, is widely used in folk medicine, having as constituents some flavonoids. It is reported that compounds like quercetin exert antiproliferative and apoptosis-inducing activity in glioma cells. The aim of this work was to search for active compounds from *B. trimera* against glioma cells and the elucidation of their mechanism of action. From the aerial parts of *B. trimera* were obtained a crude hydroethanolic extract, a fraction of phenolic compounds and a fraction of terpenes. The fractions were chemically characterized by chromatography. The glioma C6 cell line was incubated with the samples of *B. trimera* at 100 to 1.000 µg/mL. After 24 and 48 hours of incubation, cells treated with samples and controls were submitted to MTT and SRB assays. Samples showed an inhibition of cell viability concentration and time dependent. The MTT assay after 24 hours showed that the samples of *B. trimera* inhibited cell viability by 50% at concentrations between 113 and 796 µg/mL. The most active fractions at the IC₅₀ (24 h) were investigated for evaluate mechanisms of cell death and effects on cell cycle. The treatment with fractions didn't alter the cell cycle. The result of C6 cells treated with the IC₅₀ phenolic enriched fraction stained with IP was not significant (8.06%), while staining with annexin V, was significant to 30.7% of cells. These results are relevant for future evaluations of signaling pathways involved in apoptosis of C6 cell line treated with *B. trimera* phenolic fraction. Also, the reduction of C6 cell viability caused by treatment with the terpene enriched fraction requires further investigation of the cell death mechanism involved.

Keywords: *Baccharis trimera*, terpenes, phenolic compounds, glioma, C6 cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

AE = Fração Acetato de Etila

BU = Fração *n*-butanol

CCD = Cromatografia em Camada Delgada

CE₅₀ = concentração efetiva para obter 50% do máximo da atividade estimada

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

DM = Fração Diclorometano

DMEM = Dulbecco's modified Eagle's médium

DMSO = dimetilsulfóxido

DPPH = 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EBH = Extrato Bruto Hidroetanólico

FDA = Food and Drug Administration

GBM = Glioblastoma Multiforme

HBSS = Solução Salina Balanceada de Hank

IC₅₀ = concentração inibitória para obter 50% do máximo da atividade estimada

IP = Iodeto de Propídio

MDA = malondialdeído

MGMT = O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase

MTT = sal tetrazólio {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-difeniltetrazolio]}

OMS = Organização Mundial da Saúde

REA = Relação Estrutura Atividade

SFB = Soro fetal bovino

SNC = Sistema Nervoso Central

SRB = sulforrodamina B

SUS = Sistema único de saúde

TMZ = Temozolomida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Baccharis trimera</i>	30
Figura 2 Lactona diterpênica presente em <i>B. trimera</i>	34
Figura 3 Esqueleto básico de flavonóides.....	35
Figura 4 Distribuição geográfica no Brasil das taxas brutas de incidência por 100 mil homens/mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo unidade de federação (neoplasias do sistema nervoso central).....	37
Figura 5 Apoptose por via extrínseca.....	41
Figura 6 Apoptose intrínseca.....	42
Figura 7. Eventos centrais do ciclo celular de células eucarióticas.....	45
Figura 8 Esqueleto básico de triterpenos. (1) ácido oleanólico e (2) ácido ursólico.....	48
Figura 9 Esquema de obtenção dos extratos e frações a partir das partes aéreas de <i>B. trimera</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 substituintes dos flavonoides relatados para <i>B. trimera</i> . I.....	35
Tabela 2 Mortalidade proporcional (%) no Brasil, segundo grupos de causas 2008.....	36
Tabela 3 Comparação das alterações morfológicas entre morte celular por apoptose e por necrose.....	44
Tabela 4 relatos de atividade de flavonoides frente a diversas linhagens de glioma.	46
Tabela 5 Informações sobre os flavonoides utilizados como padrões de comparação nos testes biológicos de viabilidade e quantificação celular.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	27
3. REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1 A PLANTA: <i>BACCHARIS TRIMERA</i>	29
3.1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	30
3.1.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	31
3.1.3 ATIVIDADE ANTIGENOTÓXICA E ANTIMUTAGÊNICA	32
3.1.4 ATIVIDADE ANTITUMORAL	32
3.1.5 OUTRAS ATIVIDADES E TOXICIDADE	33
3.1.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	34
3.2 CÂNCER	35
3.2.1 CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	36
3.2.1.1 TRATAMENTOS PARA CÂNCER DO SNC	38
3.3 MECANISMOS DE MORTE CELULAR	39
3.4 CICLO CELULAR	44
3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS E GLIOMA	45
3.6 TERPENOS E GLIOMA	47

4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 PARTE QUÍMICA	49
4.1.1 MATERIAL	49
4.1.2 MATERIAL VEGETAL	49
4.1.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>B. TRIMERA</i>	49
4.1.3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO (EBH)	49
4.1.3.2 OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS DE TERPENOS E DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE <i>B. TRIMERA</i>	50
4.1.4 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	51
4.1.4.1 HIDRÓLISE ÁCIDA DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE TERPENOS	51
4.1.4.2 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS 1 E 2	51
4.1.4.3 ISOLAMENTO DO COMPOSTO 3	51
4.1.5 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	51
4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	52
4.2.1 MATERIAIS	52
4.2.2 LINHAGEM E CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR	52
4.2.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS E PREPARO DAS AMOSTRAS	52
4.2.4 VIABILIDADE CELULAR	53
4.2.5 QUANTIFICAÇÃO CELULAR	53
4.2.6 MORFOLOGIA CELULAR	54
4.2.7 CICLO CELULAR	55
4.2.8 MECANISMO DE MORTE CELULAR – APOPTOSE E NECROSE	55
4.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS	59
8. ANEXO	65
ANEXO I: PORTARIA 599 DE 26 DE JUNHO DE 2012. MINISTÉRIO DA SAÚDE.	67
PORTARIA Nº 599, DE 26 DE JUNHO DE 2012	67
HELVÉCIO MIRANDA MAGALHÃES JÚNIOR	67
ANEXO II: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 3 E DA QUERCETINA	75

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o câncer tornou-se um problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que no ano 2030, existam cerca de 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas portadoras da doença (INCA, 2014).

Os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) representam cerca de 2% do total de casos de neoplasias humanas (KUREK, 2005). Dentre esses, os gliomas são os principais representantes (SCHWARTZBAUM, 2006). Gliomas são tumores cerebrais que se originam a partir de células da glia ou de suas progenitoras. Existem diferentes tipos de gliomas, o mais comum, denominado de astrocitoma, desenvolve-se a partir de células gliais chamadas astrócitos. A OMS classifica os astrocitomas em quatro graus, sendo o glioblastoma multiforme o mais severo (grau IV), responsável por 25% dos tumores cerebrais, ocorrendo principalmente em adultos entre 50 e 70 anos de idade (LOUIS *et al.*, 2007). Estes tumores são altamente invasivos, vascularizados, de proliferação rápida e resistentes a quimioterapia (NONES *et al.*, 2010).

A temozolomida (TMZ), comercialmente chamada de TEMODAL (ANVISA, 2014), é usada como um agente alquilante, sendo um quimioterápico para tumores do SNC. Este fármaco está aprovado para uso no Brasil, na Europa e nos Estados Unidos no tratamento de pacientes com glioma maligno, glioblastoma multiforme ou astrocitoma anaplásico (LEONETTI *et al.*, 2012). Além da TMZ, também são usadas

nitrosuréias como a carmustina, comercialmente chamada de BECENUM (ANVISA, 2014).

Apesar dos progressos consideráveis nos estudos acerca das características dos gliomas malignos, o prognóstico destes tumores continua desfavorável, mantendo a sobrevida média dos pacientes em aproximadamente um ano após o diagnóstico. Faz-se necessário, portanto, mais esforços em pesquisa para conduzir ao desenvolvimento racional de novas terapias farmacológicas, as quais possam proporcionar um aumento da sobrevida do paciente aliadas a uma melhor eficácia e reduzidos efeitos colaterais.

A quantidade de estudos utilizando produtos naturais na área da quimioterapia do câncer é vasta, uma vez que 74% dos compostos antitumorais são

originados de produtos naturais ou derivados semissintéticos (NEWMAN e CRAGG, 2007; TAN *et al.*, 2006). Exemplos clássicos de compostos antitumorais originados de plantas medicinais são os alcalóides vincristina e vimblastina, isolados de uma pequena planta conhecida como vinca, a *Catharanthus roseus* (NEWMAN e CRAGG, 2007) e o paclitaxel (extraído das cascas do tronco de *Taxus brevifolia*).

Baccharis trimera (Less.) DC., popularmente conhecida como carqueja, é amplamente empregada na forma de chás pela população no Brasil para problemas hepáticos, digestivos e como anti-inflamatória. Esta planta também está presente em muitos fitoterápicos para distúrbios gastrointestinais na forma de solução oral e cápsulas (GOSMANN *et al.*, 2010; ANVISA, 2014).

Compostos fenólicos, juntamente com terpenos, são os constituintes majoritários encontrados no gênero *Baccharis*. Estes compostos são descritos como bons marcadores químicos para a família ASTERACEAE (VERDI *et al.*, 2005; ABAD & BERMEJO, 2007). A presença de saponinas em *B. trimera* foi o interesse do estudo realizado por GENÉ *et al.* (1996), no qual foi detectada a presença de cinco saponinas nesta espécie sendo que apenas a aglicona da saponina majoritária, obtida através de hidrólise ácida da fração bruta, foi identificada como derivada do ácido equinocístico. Quanto aos compostos fenólicos de *B. trimera*, os flavonóides são os principais constituintes identificados e já foi relatada a presença de eupatorina, cirsimarina, hispidulina, canferol, luteolina, nepetina, quercetina, apigenina e rutina (GIANELLO e GIORDANO, 1984; SOICKE e PESCHLOW, 1987; GENÉ *et al.*, 1996).

Diversos estudos vêm sendo realizados com *B. trimera*, e várias atividades biológicas têm sido descritas, tais como, atividades antimicrobiana, analgésica, antidiabética, antihepatotóxica, antimutagênica e mutagênica (SOICKE & LENG-PESCHLOW, 1987; GENÉ *et al.*, 1996; DE OLIVEIRA *et al.*, 2004). Dentre os estudos encontrados na literatura para esta espécie vegetal, destacam-se os que envolvem as atividades antioxidante e anti-inflamatória.

A atividade anti-inflamatória, assim como a atividade antioxidante, podem estar relacionadas com a atividade antitumoral e quimiopreventiva, uma vez que o estresse oxidativo pode causar dano ao DNA, provocando assim, mutações progressivas que podem contribuir para o desenvolvimento tumoral (GERHÄUSER *et al.*, 2003). Assim, ressalta-se a importância da realização de estudos fitoquímicos

monitorados por ensaios biológicos para descoberta de ativos produzidos por esta espécie vegetal para impulsionar o desenvolvimento de novos medicamentos de uso humano visando sua utilização na terapêutica.

Neste sentido, os flavonóides são uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico. A quercetina, juntamente com outros flavonóides, tem sido estudada nas últimas décadas como agente anticancerígeno, exercendo efeito antiproliferativo e atividade indutora de apoptose seletiva em células cancerosas em quase todas as classes de tumores, inclusive gliomas e também atuando como agente sinérgico às terapias atuais (JAKUBOWICZ-GIL *et al.*, 2010, 2011; PARK & MIN, 2011).

As diversas atividades biológicas já relatadas para *B. trimera*, atestam para o potencial interesse na investigação desta planta e na busca da identificação dos compostos responsáveis por tais atividades, assim como seus mecanismos para tais interferências. Estes compostos, de interesse farmacológico, podem servir de protótipo na descoberta de novos fármacos, contribuindo assim na busca de fármacos que possam auxiliar no tratamento desta patologia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a proliferação e morte celular em cultura de células neoplásicas (gliomas), após tratamento com o extrato bruto hidroetanólico e as frações enriquecidas de terpenos e compostos fenólicos de *B. trimera*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise química através de cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato bruto hidroetanólico e das frações enriquecidas de terpenos e compostos fenólicos de *B. trimera*.
- Fracionar e isolar os compostos das frações mais ativas.
- Avaliar o efeito do extrato bruto hidroetanólico e das frações enriquecidas de terpenos e compostos fenólicos de *B. trimera*, na morte de células neoplásicas de glioma.
- Avaliar o efeito do extrato bruto hidroetanólico e das frações enriquecidas de terpenos e compostos fenólicos de *B. trimera*, nas fases do ciclo celular em células neoplásicas de glioma.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A PLANTA: *Baccharis trimera*

O gênero *Baccharis* (Astereaceae) possui mais de 400 espécies nativas de áreas subtropicais e tropicais da América, sendo encontrado na Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru, Argentina, Paraguai e Uruguai. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Figura 1), conhecida como carqueja, é amplamente utilizada pela medicina popular no Brasil principalmente para problemas hepáticos e digestivos. Ela se encontra na Farmacopeia Brasileira como espécie oficial, sendo utilizada em diversos fitomedicamentos comercializados no Brasil, principalmente na forma de chás e cápsulas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2004). Apesar do uso tradicional das espécies de *Baccharis*, a diferenciação botânica entre estas espécies é complexa, uma vez que há controvérsias em relação à correta nomenclatura, sinônimos e especialmente em relação à morfologia entre elas. Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram a diferenciação química das espécies *Baccharis usterii*, *Baccharis cylindrica*, *Baccharis spicata*, *Baccharis articulata* e *B. trimera* através de cromatografia em camada delgada (CCD) que podem contribuir para a diferenciação entre estas espécies (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além da diferenciação química, elas também possuem diferenças estruturais, que podem auxiliar no momento da identificação. *B. trimera* é classificada botanicamente como um arbusto ramificado, de 1 a 2 metros de altura, com ramos articulados, tri alados, verde acinzentados e membranoso coriáceos (BARROSO E BUENO, 2002). As flores são agrupadas em inflorescências do tipo capítulo, com coloração branca amarelada. As espécies tri aladas do gênero *Baccharis* (*B. trimera*, *B. cylindrica* e *B. usterii*) são muito difíceis de diferenciar na ausência de flores, ressaltando a importância de um profissional habilitado na diferenciação botânica no momento da identificação das mesmas.



FIGURA 1 *Baccharis trimera* coletada em Arroio dos Ratos, Rio Grande do Sul, Brasil (fotos do autor).

Diversas atividades biológicas já foram relatadas para *B. trimera*. O primeiro relato publicado com esta espécie foi o estudo de PAVAN *et al.*, em 1952, que indicou a presença de saponinas através da determinação dos índices de amargor e formação de espuma em extratos preparados por decocção das partes aéreas da planta. Os resultados deste estudo mostraram também que a possível presença de saponinas nesses extratos poderia estar correlacionada com a estimulação gástrica apresentada. A partir desta publicação surgiram diversas outras, relatando atividades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antigenotóxica e antimutagênica.

3.1.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

DE OLIVEIRA *et al.* (2004), avaliaram a atividade antioxidante de extratos brutos e fracionados de *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*, empregando as técnicas do TRAP e TBARS. Os resultados apontaram que os extratos butanólicos de *B. spicata* e *B. trimera* apresentaram maior potencial antioxidante que a substância de referência, Trolox, na concentração de 25 µg/ml. Todos os extratos testados destas espécies inibiram a peroxidação lipídica causando uma diminuição significativa na produção de malondialdeído (MDA) no ensaio de TBARS e também foram capazes de proteger as células contra estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os extratos aquoso, etanólico e hidroetanólico de *B. trimera*, assim como compostos derivados do ácido quínico isolados do extrato aquoso, foram avaliados

para atividade antioxidante por diversas técnicas englobando uma gama de espécies oxidantes e biomarcadores, como o ensaio utilizando o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e a ação contra a peroxidação lipídica. Os resultados obtidos, de concentração variada entre 5 e 245 µg/mL, sugerem que os extratos avaliados apresentam uma significativa atividade antioxidante, sequestrando radicais livres e protegendo biomoléculas da oxidação (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005; PÁDUA *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2011). Estudos mais recentes realizados em nosso laboratório demonstraram que as frações das partes aéreas de *B. trimera*, apresentam atividade antioxidante semelhante à vitamina C, quercetina e luteolina. O extrato bruto hidroetanólico e algumas frações de *B. trimera* foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante através do consumo de DPPH. Dentre os resultados obtidos, destacam-se as CE₅₀ das frações de fenólicos (7,75 µg/mL) e acetato de etila (11,07 µg/mL) que apresentaram uma atividade antioxidante similar às substâncias de referência quercetina (11,07 µg/mL) e luteolina (10,27 µg/mL) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

3.1.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Já os estudos que avaliaram a atividade anti-inflamatória de *B. trimera*, mostram que o extrato aquoso (100 mg/kg, via intraperitoneal) e o extrato butanólico (40 e 80 mg/kg, via intraperitoneal) de *B. trimera* produziram resultados dose dependentes no edema induzido por carragenina em modelo de pleurisia, evidenciado no aumento da inibição do edema com o aumento da dose do extrato (GENÉ *et al.* 1996). Ainda no mesmo trabalho, a fração de saponinas isolada do extrato butanólico produziu um efeito inibitório do edema na dose de 3,5 mg/kg via intraperitoneal de 48,3%. As frações das partes aéreas de *B. trimera*, apresentaram atividade anti-inflamatória semelhante à quercetina e luteolina, assim como com o controle positivo dexametasona. Todas as frações de *B. trimera* apresentaram potente atividade anti-inflamatória nos parâmetros avaliados através do modelo da pleurisia induzida por carragenina em ratos quando comparadas aos grupos controle. As frações de saponinas e fenólicos apresentaram resultados significantes nas doses de 30 e 15 mg/kg, via intraperitoneal, respectivamente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

3.1.3 ATIVIDADE ANTIGENOTÓXICA E ANTIMUTAGÊNICA

O extrato metanólico de *B. trimera* reduziu fortemente a mutagenicidade de *Salmonella typhimurium* Trp-P-2 com baixa toxicidade, através de um teste Ames modificado (0,5 mg/lâmina). Neste extrato, foram identificados os flavonoides genkwanina, cirsimaritina, hispidulina e apigenina, que se mostraram ativos no mesmo teste. Neste trabalho, pode-se concluir que o grupamento hidroxila das flavonas apresentou atividade antimutagênica mais acentuada do que quando foram substituídos por grupos metoxila (NAKASUGI & KOMAI, 1998). No estudo de RODRIGUES *et al.* (2009), foram avaliadas as atividades genotóxica e antigenotóxica *in vivo*, assim como o potencial mutagênico do extrato aquoso de *B. trimera*, nas concentrações 500, 1.000 e 2.000 mg/kg, administrados por gavagem em camundongos fêmeas adultas, por três dias consecutivos. Independente da dose, nenhum efeito genotóxico foi observado em amostras de sangue e fígado analisadas por ensaio cometa. Foi mostrado um efeito antigenotóxico no sangue dos camundongos tratados, protegendo assim as células contra danos oxidativos do DNA induzidos pelo tratamento *ex vivo* com peróxido de hidrogênio e esta atividade provavelmente está diretamente relacionada com o potencial antioxidante apresentado por este extrato neste mesmo trabalho. Efeitos mutagênicos cromossomais foram mostrados pela presença de micronúcleos na medula óssea dos camundongos tratados.

3.1.4 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Frações de terpenos e fenólicos foram avaliadas para atividade antitumoral em células de cólo de útero (SiHa) e apresentaram inibições de viabilidade (IC₅₀, 24 h) nas concentrações de 482 e 456 µg/mL, respectivamente, através do teste utilizando MTT. O tratamento com estas frações mostrou um aumento nos níveis de lactato desidrogenase no meio de cultura, o que indica perda da integridade da membrana celular. Na avaliação do tipo de morte celular com cada uma das frações, foi possível observar que o tratamento com fenólicos promoveu morte celular por necrose, enquanto o tratamento com terpenos induziu apoptose (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

3.1.5 OUTRAS ATIVIDADES E TOXICIDADE

A ação hepatoprotetora do extrato acetato de etila obtido a partir das partes aéreas de *B. trimera*, assim como dos flavonóides quercetina, luteolina, nepetina, apigenina e hispidulina, isolados do mesmo, nas doses de 10 e 50 mg/kg, foi identificada em ratos intoxicados com 3,4 mg/kg de faloidina intraperitoneal. Os resultados obtidos mostraram que o extrato é capaz de aumentar a sobrevivência dos animais e que o composto isolado mais ativo foi a hispidulina, aumentando o índice de sobrevivência para 80% (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987).

O trabalho de GRANCE *et al.*, (2008) avaliou o efeito do extrato hidroetanólico de *B. trimera* (8,4 mg/kg) administrado oralmente em ratas grávidas. Nenhum sinal clínico de toxicidade materna e nenhuma mudança nos parâmetros hematológicos foram observados, mas os níveis de ureia e o aumento do fígado, assim como a presença de alterações histopatológicas nesses órgãos, foram encontrados nos grupos tratados com este extrato. Tais alterações foram reversíveis após a descontinuação do tratamento.

Para avaliar possíveis efeitos toxicológicos do extrato aquoso e frações de *B. trimera*, o trabalho de NOGUEIRA *et al.*, (2011) utilizou ensaios *in vitro* e *in vivo*. O crescimento e a toxicidade de células de hepatoma de ratos (HTC) e de células epiteliais de rim embrionário humano (HEK) foram avaliados através dos ensaios de coloração de proteínas e redução do sal tetrazólio (MTT). Para avaliação toxicológica *in vivo* camundongos machos foram tratados diariamente por gavagem com o extrato/frações nas concentrações 4,2 mg/kg ou 42 mg/kg durante 15 dias. Após tratamento, as células do fígado ou dos rins foram submetidas ao ensaio cometa para determinação do dano ao DNA. O crescimento de células de rim (HEK) foi inibido pelo extrato aquoso (IC₅₀ 182,6 µg/mL), pela fração etanólica (IC₅₀ 78,1 µg/mL) e pela fração aquosa sedimentada (IC₅₀ 86,2 µg/mL), com baixos efeitos nas células HTC. Somente a fração aquosa (IC₅₀ 372,5 µg/mL) apresentou citotoxicidade sobre células HEK, pelo ensaio com MTT. Nenhuma fração e nem o extrato apresentaram efeito sobre o outro tipo celular. Camundongos tratados com a concentração de 42 mg/kg por 15 dias apresentaram os rins relativamente aumentados.

3.1.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Quanto aos constituintes químicos presentes em *B. trimera*, sabe-se que os flavonoides, juntamente com os terpenos são os constituintes majoritários encontrados no gênero *Baccharis* e são descritos como bons marcadores químicos para a família ASTERACEAE (VERDI *et al.*, 2005; ABAD & BERMEJO, 2007). Os terpenos mais comumente encontrados nesta espécie são os diterpenos (Figura 2) (VERDI *et al.*, 2005; HERZ *et al.*, 1977; ZDERÒ *et al.*, 1989; JANUÁRIO *et al.*, 2004). Triterpenos e saponinas também são descritos para *B. trimera* e foram alvo de interesse do estudo de GENÉ *et al.*, (1996). Neste estudo, foi detectada a presença de cinco saponinas desta espécie sendo que apenas a aglicona da saponina majoritária, obtida através de hidrólise ácida da fração bruta, foi identificada como derivada do ácido equinocístico.

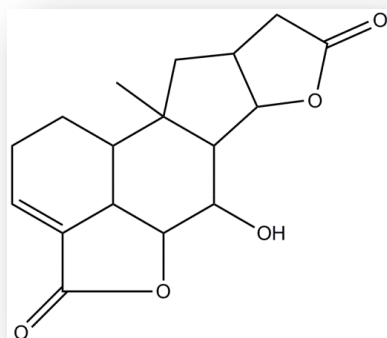


FIGURA 2 Lactona diterpênica presente em *B. trimera* (ZDERO *et al.*, 1989).

Os compostos fenólicos mais abundantes nesta espécie são os flavonoides e entre eles destaca-se a presença de eupatorina, cirsimarina, hispidulina, canferol, luteolina, nepetina, quercetina, apigenina e rutina (Figura 3 e Tabela 1) (HERZ *et al.*, 1977; SOICKE & PESCHLOW, 1987; GENÉ *et al.*, 1996). Além dos flavonoides também está descrita a presença de fenólicos originados do ácido quínico em diversos estudos: ácidos 5-O-[*E*]-cafeoilquinico, 4,5-O-[*E*]-di-cafeoilquinico, 3,4-O-[*E*]-di-cafeoilquinico e 3,5-O-[*E*]-di-cafeoilquinico e ácido tricafeoilquinico (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005).

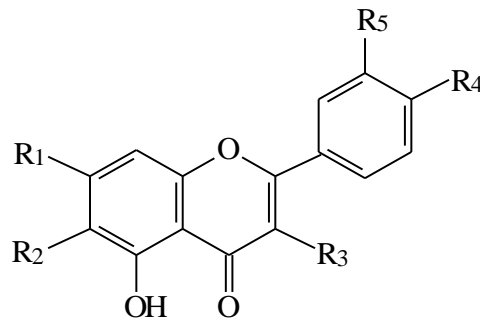


FIGURA 3 Esqueleto básico de flavonóides.

TABELA 1 Substituintes dos flavonoides relatados para *B. trimera*, levando em consideração as posições da FIGURA 3 (GIANELLO & GIORDANO, 1984; SOICKE & PESCHLOW, 1987; GENÉ *et al.*, 1996, VERDI *et al.*, 2005).

Espécie	Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
	Quercetina	OH	H	OH	OH	OH
	Luteolina	OH	H	H	OH	OH
<i>B. trimera</i>	Nepetina	OH	OCH ₃	H	OH	OH
	Apigenina	OH	H	H	OH	H
	Hispidulina	OH	OCH ₃	H	OH	H
	Rutina	OH	H	O-Gli	OH	OH
	Eupatorina	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OH
	Canferol	OH	H	OH	OH	H

3.2 CÂNCER

Câncer é um termo geral associado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm como característica comum o crescimento desordenado de células a partir de mutações genéticas que tendem a ser agressivas e incontroláveis, levando a formação de tumores (neoplasias malignas). O que diferencia os inúmeros tipos de câncer são os vários tipos de células do corpo que podem originar células cancerosas, a velocidade de multiplicação destas e sua capacidade de invadir outros tecidos e órgãos (metástase). As causas que levam ao desenvolvimento de tumores

podem ser internas (como fatores genéticos) e/ou externas (como fatores ambientais e hábitos).

Nas últimas décadas, o câncer converteu-se em um problema de saúde pública mundial. Segundo estimativas da OMS para o ano de 2030, existirão 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2011b). No Brasil o câncer também tem se destacado com um importante papel dentro da transição epidemiológica que vem ocorrendo, já que está entre as doenças não transmissíveis responsáveis pela mudança no perfil de adoecimento da população brasileira (Tabela 2). A prevenção e o controle da doença são, por esse motivo, prioridades do Ministério da Saúde e das políticas do Sistema Único de Saúde (SUS).

TABELA 2 Mortalidade proporcional (%) no Brasil, segundo grupos de causas 2008 (INCA, 2011)

Grupo de Causas	Total
Doença do aparelho circulatório	29,51%
Neoplasias (tumores)	15,57%
Causas externas de morbidade e mortalidade	12,62%
Doenças do aparelho respiratório	9,75%
Doenças endócrinas nutricionais e metabólicas	6,00%
Doenças do aparelho digestivo	5,13%
Algumas doenças infecciosas e parasitárias	4,39%
Algumas afecções originadas no período perinatal	2,42%
Demais causas definidas	14,61%
Total	100,00%

3.2.1 CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

O Câncer do SNC representa, na população mundial, aproximadamente 2% de todas as neoplasias malignas. Mesmo não sendo muito frequente, este câncer contribui significativamente para a morbidade global, principalmente pela dificuldade de tratamento. As taxas de incidência não apresentam grandes variações geográficas e são ligeiramente mais altas no sexo masculino (Figura 4).

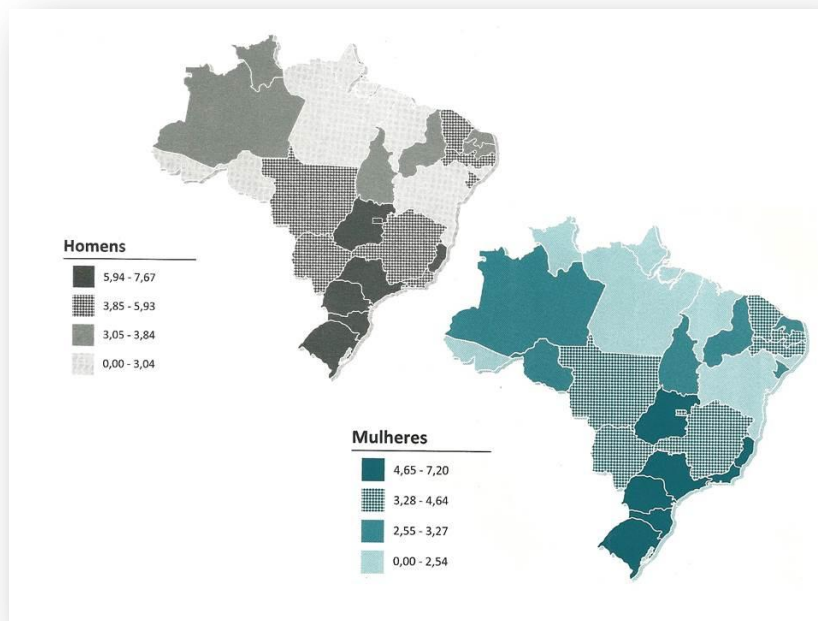


FIGURA 4 Distribuição geográfica no Brasil das taxas brutas de incidência por 100 mil homens/mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo unidade de federação (neoplasias do sistema nervoso central) (INCA, 2011b).

Gliomas são os tumores do SNC de maior ocorrência (77% dos tumores malignos do SNC) e são classificados de acordo com três parâmetros: o tipo celular, o grau de malignidade e a localização tumoral (OMS, 2007). A classificação baseada no tipo celular é feita a partir das células gliais que dão origem ao tumor: astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais, classificando os tumores em Astrocitomas, Oligodendrogliomas e Ependimomas, respectivamente. A classificação baseada na malignidade tumoral é feita através de uma escala de I a IV. Tumores de grau I e II (Astrocitoma difuso, Astrocitoma pilocítico, Oligodendroglioma, Ganglioglioma e Gliomas mistos) representam baixa proliferação e possibilidade de cura após ressecção cirúrgica. A designação grau III (Astrocitoma anaplásico) apresenta alta proliferação e evidências histológicas de malignidade, incluindo atipia nuclear e atividade mitótica pronunciada. Tumores de grau IV (Glioblastoma multiforme – GBM) é o tipo mais comum e mais agressivo de astrocitoma. São neoplasias citologicamente malignas com alta atividade mitótica e presença de necrose, as quais estão associadas a uma rápida evolução da doença pré- e pós-operatória levando, geralmente, ao óbito (OMS, 2007). Quanto à localização do tumor, os

gliomas são classificados como supratentoriais, que se desenvolvem no cérebro, e infratentoriais, que se desenvolvem no cerebelo.

Neste trabalho será dada uma maior ênfase ao astrocitoma de grau IV, GBM, devido à sua alta incidência e relevância clínica com dificuldade de tratamento e prognóstico deficiente com sobrevida média de pacientes de 4 a 7 meses.

Existem duas teorias sobre a origem dos gliomas (e glioblastomas, conseqüentemente). A primeira sugere que os gliomas são originados a partir de células gliais adultas (astrócitos ou oligodendrócitos) que sofrem uma desdiferenciação celular em razão de mutações envolvendo oncogenes e genes supressores tumorais, que levam ao desenvolvimento do tumor. A segunda, e mais aceita teoria, é a de que os tumores se originam a partir de células progenitoras que passam por transformações oncogênicas durante o seu desenvolvimento e passam a ser iniciadoras de tumor.

3.2.1.1 TRATAMENTOS PARA CÂNCER DO SNC

As principais metas do tratamento do câncer são a cura da doença, o prolongamento considerável da vida útil e o aumento da qualidade de vida. Existem três formas principais para o tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade, variando apenas quanto à suscetibilidade dos tumores a cada uma das modalidades terapêuticas.

No Brasil, a Portaria 599 de 26 de Junho de 2012 elaborada pelo Ministério da Saúde, aprova as diretrizes diagnósticas e terapêuticas do tumor cerebral no adulto. Ela abrange critérios de diagnóstico, tratamento e mecanismos de regulação, controle e avaliação e que os mesmos são de caráter nacional e devem ser utilizados pelas Secretarias de Saúde dos Estados e dos Municípios (Anexo I).

Glioblastomas multiformes são tumores extremamente agressivos e resistentes a terapias convencionalmente utilizadas contra outros tipos celulares. Estes tumores se proliferam de maneira rápida e não apresentam um crescimento localizado (as células tumorais se espalham pelo tecido saudável, dificultando assim a retirada das mesmas por cirurgia e gerando diversos sintomas). Além disso, estas células também apresentam resistência à radiação, de modo que esta terapia não

tem muito sucesso em induzir regressão tumoral. Além das características intrínsecas das células de glioblastoma, existem outros fatores que dificultam a possibilidade de um bom prognóstico ao paciente. Dependendo do local onde o tumor se encontra instalado, dificilmente se pode usar abordagens cirúrgicas. Algumas alternativas quimioterápicas também se encontram inviabilizadas já que são também tóxicas para as células neuronais saudáveis. Somando a isto, existe a presença da barreira hematoencefálica, que dificulta o acesso de fármacos ao tecido tumoral. A terapia primária aconselhada para o tratamento de glioblastoma recém-diagnosticado é cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia. O quimioterápico de escolha para o tratamento de GBM é a temozolomida (TMZ), que aumenta a sobrevida média de pacientes em apenas 2 a 4 meses. A TMZ (Temodal) é um derivado imidazotetrazina que foi desenvolvido no final da década de 80 pelo UK Cancer Research, em 1999 foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) como terapia contra astrocitoma infiltrativo e em 2005 contra GBM, já que é efetivo através de via oral e causa menos efeitos adversos que outros quimioterápicos clássicos. TMZ é um agente alquilante de DNA e atua por mais de um mecanismo de inibição de proliferação ou morte celular: induz apoptose, morte autofágica, senescência e catástrofe mitótica. A resistência ao TMZ está principalmente relacionada com a presença da enzima O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), responsável por reparar o DNA após alquilação com TMZ. A sensibilização dessas células resistentes através da inibição desta enzima é possível e pode ser usada como terapia adjuvante ao agente alquilante. Porém a eficiência de TMZ é moderada e faltam bases técnicas e científicas que permitam considerar a TMZ um tratamento padrão para os tumores cerebrais como GBM, fazendo necessária a busca por novos compostos ativos que possam vir a aumentar o arsenal terapêutico para esta patologia, buscando assim um aumento na sobrevida desses pacientes e até mesmo a cura.

3.3 MECANISMOS DE MORTE CELULAR

Existem diversos mecanismos de controle da proliferação e morte celular envolvidos na manutenção da homeostase do organismo. Os principais mecanismos de controle homeostático são a divisão celular, reparo de danos ao DNA, controle do ciclo celular, mecanismos de morte celular e bloqueio da proliferação como

apoptose, necrose, autofagia e morte celular autofágica, senescência, catástrofe mitótica. O Comitê de Nomenclatura em Morte Celular propôs em 2012 uma classificação funcional de morte celular, envolvendo os seguintes processos: apoptose extrínseca, apoptose intrínseca (caspase dependente ou independente), necrose regulada, morte celular autofágica e catástrofe mitótica (GALLUZZI *et al.*, 2012). Estes mecanismos são controlados por proteínas específicas e qualquer desbalanço pode levar a uma patologia, como o câncer. Neste trabalho, o foco será dado aos processos envolvendo **apoptose, necrose e controle do ciclo celular**, já que foram estes os mecanismos avaliados.

Apoptose é o mecanismo conhecido como morte celular programada, 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 por células fagocíticas (Tabela 3, página 44). É importante salientar que apoptose e morte celular programada não são sinônimos, visto que a morte celular desencadeada por estímulos fisiológicos pode apresentar características não apoptóticas. A maior parte desses processos é executada por proteínas caspases (proteases cisteíno-aspárticas), ativadas em uma cascata coordenada de clivagens das formas pré-ativas para formas ativadas. O processo apoptótico pode ser disparado por duas vias, intrínseca (caspase dependente ou independente) ou extrínseca. Na **via extrínseca** (ou de receptores de morte celular) (Figura 5), os processos apoptóticos são induzidos pelos sinais de estresse extracelulares que são sentidos e propagados por receptores transmembrana específicos. As moléculas sinalizadoras de estresse extracelulares que se destacam são FasL (ligante de Fas), TRAIL (ligante de indutor de apoptose relacionado ao TNF) e TNF (fator de necrose tumoral) que se ligam a receptores de morte celular da superfície celular, desencadeando a clivagem e ativação da proteína caspase 8 que, por sua vez, induz a clivagem e ativação de caspases efetoras do processo apoptótico. A apoptose extrínseca pode se dar através da ativação de três cascatas de sinalização de morte celular: (1) a sinalização do receptor de morte e a ativação da caspase 8 (ou 10) → cascata da caspase 3; (2) sinalização do receptor de morte e ativação da caspase 8 → tBID → MOMP → caspase 9 → via caspase 3; ou (3) ligação a

receptores de sinalização de dependência (que transmitem sinais letais na ausência do seu ligante netrina-1) - induzida seguido pela ativação da caspase 9 (direta ou MOMP-dependente) → cascata de caspase 3 (GALLUZZI *et al.*, 2012).

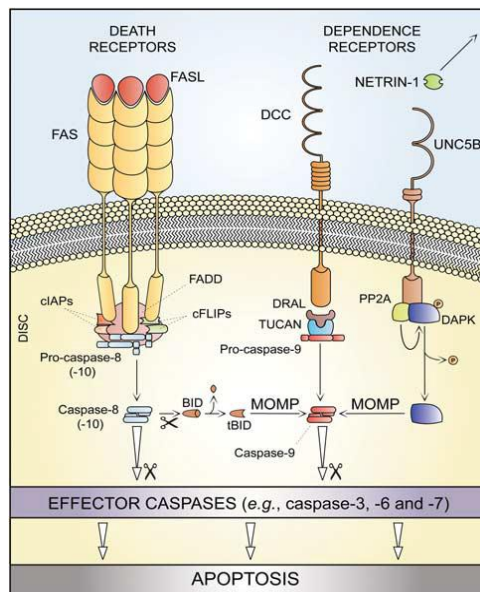


FIGURA 5 Apoptose por via extrínseca (GALUZZI *et al.*, 2012).

A **via intrínseca** (ou mitocondrial) da apoptose (Figura 6), é desencadeada quando a célula sinaliza uma grande variedade de condições de estresses intracelulares, incluindo danos ao DNA, o estresse oxidativo, sobrecarga Ca^{2+} citosólico, entre outros. Ela é modulada por uma família de proteínas, a família Bcl-2, cujos membros apresentam em sua estrutura um ou múltiplos domínios homólogos de Bcl-2 (domínio BH3). A família Bcl-2 é dividida em dois grupos de proteínas, as anti-apoptóticas (tendo como principais componentes Bcl-2 – o primeiro membro descrito e que deu origem ao nome da família de proteínas, além de Bcl- x_L , Bcl-W, MCL-1 e BFL-1) e as pró-apoptóticas (as quais se dividem em 2 subgrupos: proteínas *BH3-only*, que possuem apenas um domínio BH3, que inclui as proteínas Bik, BNIP-3, Bim-L, Bad, Bid, PUMA, NOXA; e proteínas multidomínio, cujas principais representantes são as proteínas Bax e Bak). Todas estas proteínas têm como principal função modular a permeabilidade da membrana mitocondrial: os membros anti-apoptóticos interagem com os membros pró-apoptóticos, impedindo que estes formem complexos na superfície da mitocôndria e, assim, a liberação de moléculas mitocondriais. Quando um sinal de ativação da via intrínseca (caspase

dependente) é disparado na célula, há a dissociação destas interações e ocorre um desbalanço entre as proteínas anti- e pró-apoptóticas no sentido destas últimas, levando à formação de poros na membrana da mitocôndria e à liberação de moléculas do interior da mesma para o citoplasma celular, entre as quais a mais conhecida é o citocromo C. A liberação dos componentes intra mitocondriais para o espaço citosólico ativa a proteína citosólica Apaf-1, formando o apoptossomo, que cliva e ativa a caspase 9, que por sua vez ativa as caspases 3, 6 e 7, executoras do processo apoptótico. Dois tipos de caspases atuam nas vias de sinalização para apoptose e são denominadas de iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7). Na apoptose caspase independente, o fator de indução de apoptose (IAF) e a endonuclease G (ENDOG) migram para o núcleo, onde promovem em larga escala fragmentação de DNA independentemente da ativação das caspases. SMAC/DIABLO e HTRA2 inibem a função antiapoptótica de vários membros da família das IAPs, assim inibindo a ativação das caspases. Além disso, a serina protease HTRA2 também contribui para a apoptose independente de caspase, exercendo efeitos pró-apoptóticos através da clivagem de substratos celulares (GALLUZZI *et al.*, 2012).

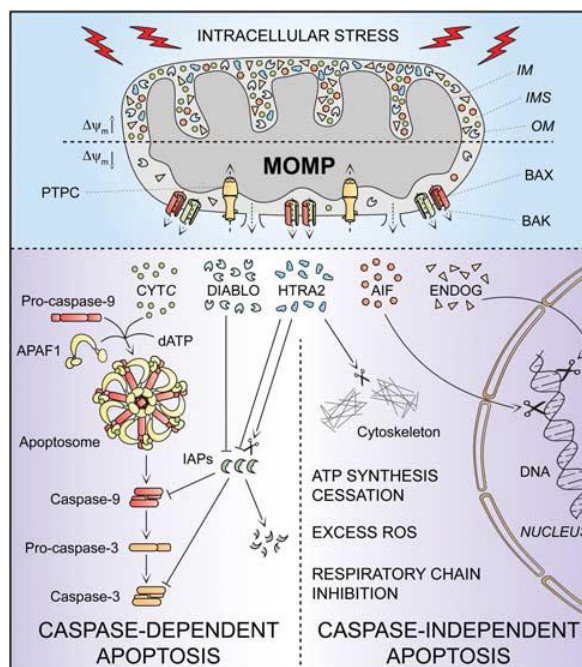


FIGURA 6 Apoptose intrínseca (GALUZZI *et al.*, 2012).

Necrose é um mecanismo de morte celular mais agressivo, normalmente causado por estímulos patológicos, onde ocorre a ruptura da membrana celular e extravasamento de componentes intracelulares, gerando assim uma resposta inflamatória a este processo (Tabela 3). Porém, sabe-se hoje que a necrose também pode ocorrer de forma programada, envolvendo uma sequência precisa de sinais. Esta necrose programada é chamada de necroptose e se inicia pela ligação ao receptor de morte TNFR1 e que pode ser inibida pela proteína RIP1-alvo químico necrostatina-1. Visto que a recomendação do Comitê de Nomenclatura de Morte Celular é de se utilizar a nomenclatura geral (e não a específica), utilizaremos neste trabalho o termo “necrose” para todos os eventos que consistem nas características citadas a seguir, sem levar em consideração as peculiaridades da regulação da necroptose. Como principais características da necrose em geral, observam-se um aumento do volume celular, a dilatação das mitocôndrias e do retículo endoplasmático rugoso, a condensação da cromatina e a desagregação dos ribossomos (BRAS *et al.*, 2005). Ocorrem alterações na permeabilidade da membrana plasmática por diminuição nos níveis de ATP, que tem como consequência comprometimento da bomba de Na⁺/K⁺ e de outros fenômenos que são ATP-dependentes. Isso resulta no rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local (BOUJRAD *et al.*, 2007; KROEMER, *et al.*, 2009). Ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos. Não há evidência de remodelamento de cromatina durante a necrose, e a célula entra em citólise imediata, com digestão aleatória do DNA, cariólise e perda da integridade da membrana plasmática. A citólise é o estágio final da decadência celular evidente no processo de necrose (HAIL *et al.*, 2006).

TABELA 3 Comparação das alterações morfológicas entre morte celular por apoptose e por necrose (RICCI e ZONG, 2006; GALUZZI *et al.*, 2012).

Característica	APOPTOSE	NECROSE
Quantidade de células afetadas	Uma célula ou um pequeno grupo	Em geral muitas células contíguas
Morfologia geral da célula	Encolhimento celular e convulsão	Turgescência celular
Alterações nucleares	Picnose e carionexis	Cariólise, picnose e cariorexis
Alterações da membrana	Membrana celular intacta	Ruptura da membrana celular
Alterações no citoplasma	Retenção do citoplasma em corpos apoptóticos	Vacuolização e degeneração organelar, seguido de liberação do citoplasma no meio extracelular
Resposta imune	Sem resposta inflamatória	Resposta inflamatória
Gasto energético	Com gasto de energia	Sem gasto de energia

3.4 CICLO CELULAR

Em células eucarióticas, o ciclo celular é dividido em dois períodos definidos: o período de interfase, durante o qual a célula cresce e acumula nutrientes necessários para a mitose e divide o seu material genético; e o período da mitose (fase M) propriamente dita, durante a qual ocorre a segregação do material genético duplicado para os pólos celulares, seguido da divisão da célula (citocinese) em duas células filhas idênticas. A interfase é dividida em três fases principais: G1 (*Gap 1*, quando a célula aumenta de tamanho e sintetiza proteínas necessárias para a síntese de DNA), S (de síntese de DNA) e G2 (*Gap 2*, crescimento celular, síntese

proteica e duplicação das organelas celulares), além do estágio G0 (G zero), no qual a célula se mantém metabolicamente ativa, mas interrompe seu crescimento, permanecendo em um estado de quiescência celular (Figura 7) (MORGAN, 2007).

Um ciclo celular bem controlado e sem erros em nenhuma das etapas leva a geração de duas células filhas idênticas e saudáveis. Porém podem ocorrer danos ao DNA durante os processos de replicação e uma proliferação descontrolada, ambas as características comuns de cânceres, que normalmente sofrem mutações em proteínas de controle do ciclo celular.

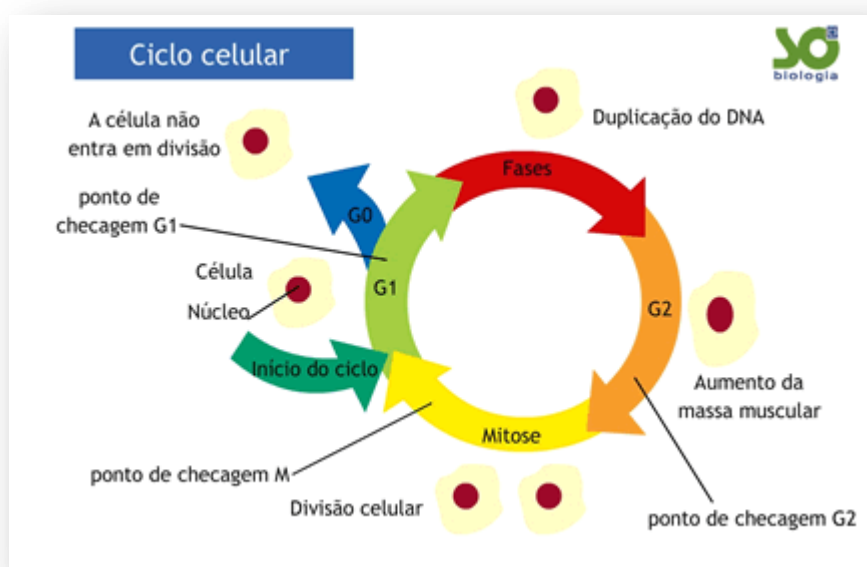


FIGURA 7. Eventos centrais do ciclo celular de células eucarióticas (SÓ BIOLOGIA, 2014).

3.5 COMPOSTOS FENÓLICOS E GLIOMA

Compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, têm sido amplamente investigados quanto ao seu papel nos efeitos envolvendo proliferação e morte celular de diversos tipos de células tumorais. Este grande interesse se deve em parte pela sua abundância nos componentes da dieta humana e outra em razão de suas atividades já conhecidas como antioxidante e protetores contra o estresse oxidativo. Dentro desta investida neste grupo de compostos, tem se demonstrado

que eles, em sua maioria, têm capacidade de reduzir a viabilidade celular e levar à morte por diversos mecanismos já relatados (Tabela 4).

TABELA 4 Relatos de atividade de flavonoides frente a diversas linhagens de glioma.

Composto	Células cancerosas (linhagens)	Efeito observado (concentração)	Mecanismo sugerido	Referência
Apigenina	Glioma de rato (C6)	Citotoxicidade (5-20 μ M)	não determinado	SEIBERT <i>et al.</i> , 2011.
Apigenina	Glioma humano (U87-MG)	Efeito antiproliferativo e apoptose (100 μ M)	Acúmulo de células na fase G2 do ciclo celular	PARAJULI, <i>et al.</i> , 2009.
Luteolina	Glioma de rato (C6)	Citotoxicidade (5-20 μ M)	não determinado	SEIBERT <i>et al.</i> , 2011.
Luteolina	Células tronco tumorais de glioma humano (U251)	Diminuição dos agregados de células (40 μ M)	não determinado	FENG <i>et al.</i> , 2012.
Quercetina	Glioma de rato (C6)	Citotoxicidade (30 - 100 μ M)	não determinado	ZIELINSKA <i>et al.</i> , 2003.
Quercetina	Glioma humano (U251)	Apoptose e desregulação do ciclo celular em G2/M	não determinado	REN <i>et al.</i> , 2010.
Quercetina	Astrocitoma humano de grau III (MOGGCCM)	Necrose (30 μ M)	Aumento da expressão da proteína pró-necrótica Bcl2L12.	JAKUBOWICZ-GIL <i>et al.</i> , 2010.
Quercetina	Glioma humano (U373MG)	Apoptose (50 μ M)	Ativação de caspase 3 e 9	KIM <i>et al.</i> , 2013.
Quercetina	Glioma humano (U87-MG)	Diminuição da viabilidade celular (50 μ M)	não determinado	YUAN <i>et al.</i> , 2013.
Quercetina	Glioma humano (A172)	Redução da viabilidade e apoptose (50 μ M)	Redução da fosforilação de ERK e Akt. Ativação da caspase 3.	KIM <i>et al.</i> , 2008.
Quercetina	Glioma humano (U87-MG, U251, A172 e LN229)	Aumento da apoptose induzida por TRAIL (200 μ M)	Ativação de via intrínseca e extrínseca (caspase 7, 8 e 9)	SIEGELIN <i>et al.</i> , 2009.

Quercetina	Glioma de rato (C6)	Citotoxicidade (20-50 μM)	não determinado	SEIBERT <i>et al.</i> , 2011.
Quercetina (QUE) + Temozolamida (TMZ)	Astrocitoma humano de grau III (MOGGCCM)	Efeito sinérgico levando à morte programada por autofagia (100 μM TMZ + 5 μM QUE) e posterior apoptose (100 μM TMZ + 30 μM QUE)	Expressão de LC3 (pró-autofágica) e de proteínas pró-apoptóticas da via mitocondrial (citocromo C e caspase 3)	JAKUBOWICZ-GIL <i>et al.</i> , 2010.
Resveratrol (RSV) + Quercetina (QUE)	Glioma de rato (C6)	Apoptose (10 μM RSV + 25 μM QUE)	Ativação de caspase 3 e 7	ZAMIN <i>et al.</i> , 2009
Rutina	Glioma de rato (C6)	Citotoxicidade (100 μM)	não determinado	ZIELINSKA <i>et al.</i> , 2003.
Rutina	Glioma humano (GL-15)	Efeito antiproliferativo (50-100 μM), pró-apoptótico (100 μM) e morfogênico (50-100 μM)	Redução da fosforilação de ERK 1 e 2 e acúmulo de células na fase G2 do ciclo celular	SANTOS <i>et al.</i> , 2011.

3.6 TERPENOS E GLIOMA

Os terpenos, assim como os flavonoides, são encontrados em abundância na dieta humana, e possuem papel de destaque no interesse por suas atividades biológicas. Saponinas e triterpenos têm sido relatados por suas propriedades antitumorais e começaram mais recentemente a ser investigadas quanto aos seus efeitos sobre linhagens de glioma. Os mecanismos de ação já relatados para estes compostos químicos, responsáveis pela morte celular apresentada, estão relacionados com inibição de enzimas metabólicas do DNA, indução da apoptose, interferência com o p53, vias de sinalização PI3K/Akt e MAPK e interferência com o fator de transcrição NF- κ B (VECHIA *et al.*, 2009). Com relação à estrutura atividade (REA), resultados mostram que o grupamento amina em C-3 (configuração beta) ou no anel A gera um aumento de atividade, assim como grupamentos aminoalquila no C-28. Quanto maior a hidroxilação da estrutura, maior a atividade (Figura 8) (VECHIA *et al.*, 2009).

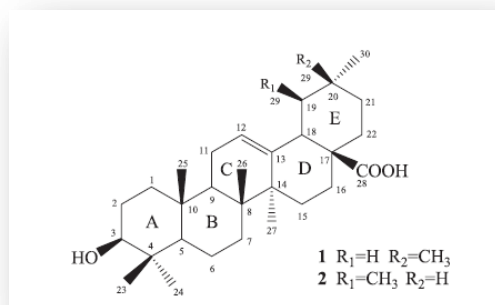


FIGURA 8 Esqueleto básico de triterpenos. (1) ácido oleanólico e (2) ácido ursólico.

Modificações estruturais em esqueletos triterpênicos tem levado à um aumento significativo da atividade antitumoral dos mesmos. No estudo de RAVANAN *et al.* (2011), modificações no anel A do ácido boswélico resultaram em um composto com elevada atividade antitumoral, chamado “cyano enone of methyl boswellates” (CEMB). Este composto apresentou ótimos resultados para várias linhagens tumorais e IC₅₀ de 0,34 µM em linhagem de glioma de rato (C6) (teste de MTT após 72 horas de tratamento). Três triterpenos isolados do extrato etanólico de *Dysoxylum hainanense*, também se mostraram significativamente citotóxicos frente à linhagem de glioma humano U251 (CAO *et al.*, 2013). Uma fração de saponinas mostrou reduzir a migração celular e induzir apoptose por via intrínseca dependente de caspase de células de glioma humano da linhagem SNB19 (ativação das caspases 3 e 9 e estimulação do citocromo C) (YANAMANDRA *et al.*, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARTE QUÍMICA

4.1.1 MATERIAL

Os solventes utilizados nas extrações foram todos de grau p.a., das marcas Próton Química[®] (diclorometano e acetato de etila), Vetec[®] (butanol), Nuclear[®] (etanol) e água destilada obtida por sistema Milli-Q[®] Plus Millipore. Os compostos comerciais estão indicados na Tabela 5.

TABELA 5 Informações sobre os flavonoides utilizados como padrões de comparação nos testes biológicos de viabilidade e quantificação celular. NI: não informada.

Substância	Pureza	Marca comercial	Lote
Quercetina	> 98 %	Sigma	060M1196V
Rutina	NI	Riedel	30853
Luteolina	NI	Sigma	070M4058
Apigenina	> 95 %	Sigma	E445301/1V

4.1.2 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *B. trimera* foram coletadas em área privada na cidade de Arroio dos Ratos, Rio Grande do Sul, Brasil, e identificadas pelo botânico Prof. Dr. Sérgio Bordignon (Unilasalle). O material testemunho foi depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN: 190357).

Após secagem em estufa de ar circulante em temperatura não superior a 40°C, as partes aéreas de *B. trimera* foram moídas e este material foi então utilizado para obtenção dos extratos utilizados neste trabalho.

4.1.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *B. trimera*

4.1.3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO (EBH)

Foram macerados 70 g das partes aéreas frescas e rasuradas de *B. trimera* em 2 L de etanol 70%, durante 15 dias, com agitações periódicas. Uma segunda

maceração foi realizada após filtração do primeiro macerado, com a mesma quantidade de etanol 70% e por mais 15 dias. Após evaporação do etanol em rota evaporador, a água restante no extrato bruto hidroetanólico foi eliminada através de liofilização e o armazenamento deste extrato em pó foi feito em dessecador.

4.1.3.2 OBTENÇÃO DE FRAÇÕES ENRIQUECIDAS DE TERPENOS E DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE *B. trimera*

As partes aéreas secas e moídas de *B. trimera* foram extraídas através de aparelho Soxhlet com solventes de polaridade crescente, diclorometano (DM), acetato de etila (AE) e *n*-butanol (BU) por 24 h cada, até o esgotamento da extração. Os solventes foram totalmente evaporados em rota evaporador e os extratos resultantes foram armazenados em dessecador. A partir de 1 g da fração resultante da união das frações acetato de etila (500 mg) + *n*-butanol (500 mg) foram realizados sucessivos fracionamentos através de cromatografia em coluna de exclusão molecular, empregando-se como fase estacionária sephadex LH-20 e fase móvel etanol absoluto para obtenção de duas novas frações: uma fração enriquecida de terpenos e uma fração enriquecida de compostos fenólicos (Figura 9).

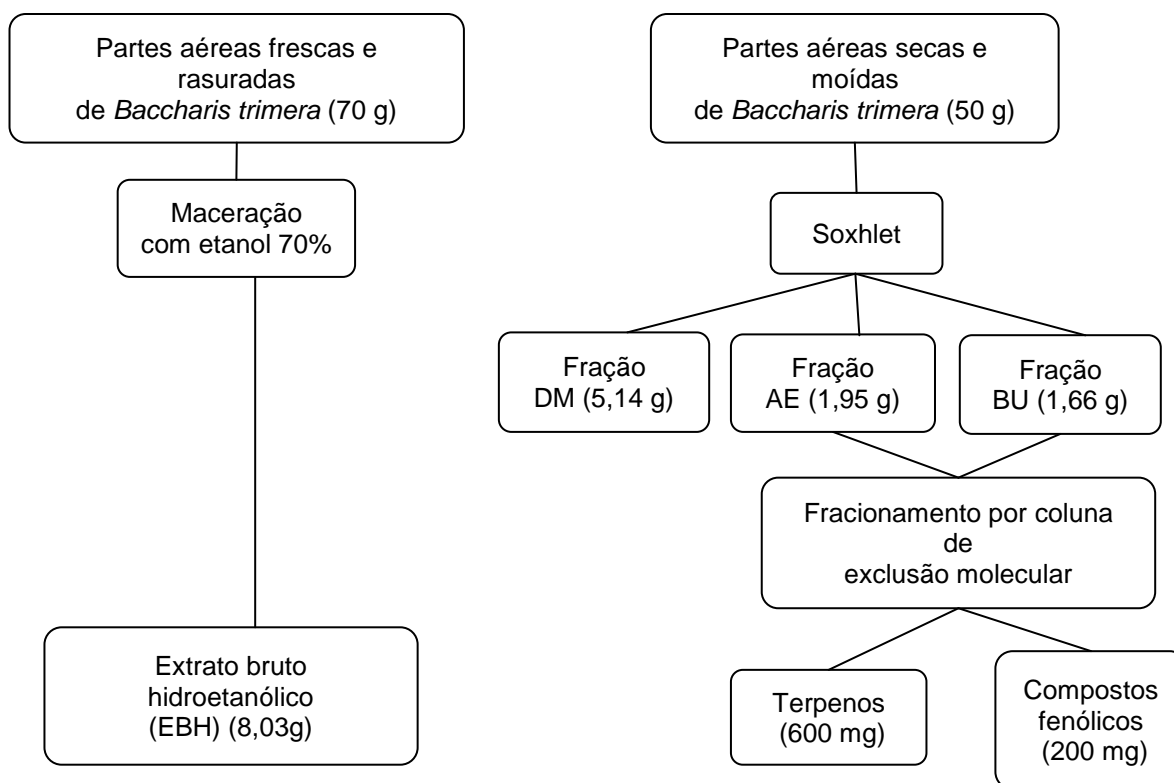


FIGURA 9 Esquema de obtenção dos extratos e frações a partir das partes aéreas de *B. trimera* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

4.1.4 ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

4.1.4.1 HIDRÓLISE ÁCIDA DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA DE TERPENOS

Para a realização da mesma foram utilizados 130 mg da fração totalmente solubilizados em 100 mL de água destilada. Após adição de 15 mL de solução ácida HCl 37%, deixou-se a mistura sob refluxo por 2 horas, a 70°C. Após, foram realizadas quatro extrações da fase aquosa utilizando 25 mL de diclorometano e posterior evaporação do solvente em evaporador rotatório.

4.1.4.2 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS 1 E 2

Foi realizado um fracionamento através de coluna, utilizando gel de sílica (50 g). Para esta coluna foram utilizados 170 mg da fração *n*-butanol e como fase móvel foi utilizado um gradiente de cicloexano e acetato de etila. As frações foram coletadas e monitoradas através de cromatografia em camada delgada.

4.1.4.3 ISOLAMENTO DO COMPOSTO 3

A técnica de cromatografia preparativa foi utilizada na busca pela separação e isolamento de compostos da fração enriquecida de compostos fenólicos. Foram utilizadas 50 mg da fração e como fase móvel cicloexano:acetato de etila (4:6, v/v). Após a raspagem da banda de interesse, o composto isolado foi extraído do adsorvente.

4.1.5 ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Todos os extratos e frações de *B. trimera* foram analisados quimicamente por CCD. Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio GF₂₅₄. Os cromatogramas foram observados sob luz UV₂₅₄ e UV₃₆₆ nm e borrifados com o agente cromogênico anisalaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 100°C até o máximo desenvolvimento de coloração, para detecção de terpenos, e com o reagente natural (Difenilborilometilamina 1% em metanol) para revelação de compostos fenólicos, como os flavonoides (STAHL, 1969).

Foram empregados diferentes sistemas eluentes para *B. trimera*, dependendo do que se gostaria de visualizar: clorofórmio:etanol:ácido acético (100:40:6, v/v/v),

cicloexano:acetato de etila (9:1, v/v) e BAW butanol:ácido acético:água (50:10:40, v/v/v) para terpenos e saponinas; e cicloexano:acetato de etila (6:4, v/v) para compostos fenólicos e flavonoides (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 MATERIAIS

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), SFB (soro fetal bovino), fungizona, solução de tripsina em EDTA 0,5% foram adquiridos da Gibco. Solução Penicilina/estreptomicina, Iodeto de propídio/anexina V, dimetil sulfóxido (DMSO), {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-difeniltetrazolio]} (MTT) e sulforrodamina B (SRB) foram adquiridos da Sigma. Todas as outras substâncias químicas e solventes utilizados foram de grau analítico.

4.2.2 LINHAGEM E CONDIÇÕES DE CULTIVO CELULAR

As células de glioma de rato da linhagem C6 foram adquiridas da ATCC - American Type Culture Collection. Estas células, em 5-20 passagens, foram mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 5% de SFB e contendo 0,5 U/mL dos antibióticos penicilina/estreptomicina e 2,5 mg/mL de fungizona. As culturas celulares foram mantidas em incubadora a 37°C com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂.

4.2.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS E PREPARO DAS AMOSTRAS

O EBH e as frações enriquecidas de terpenos e compostos fenólicos foram preparados em 100% de DMSO na concentração de 100 mg/mL, obtendo-se uma concentração final máxima de DMSO de 1% por poço, durante os tratamentos. As concentrações testadas foram de 100 a 1.000 µg/ml por períodos de 24 e 48 h. O flavonoide quercetina foi utilizado como padrão de comparação nos ensaios de viabilidade, em uma concentração considerada baixa e outra alta conforme dados já presentes na literatura (10 e 100 µg/ml) (Tabela 4, página 45). Além disso, foram realizados dois controles: o controle contendo somente o meio de cultura e o controle veículo (DMSO 1% em meio de cultura).

4.2.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células da linhagem C6 foi avaliada pelo método do MTT. Este método baseia-se na redução do sal tetrazólio MTT (de coloração amarela) em um produto pigmentado chamado formasan (lilás), principalmente por atividade de desidrogenases mitocondriais (mas também por ação de desidrogenases presentes no citoplasma celular) (BERRIDGE *et al.*, 1996). As células foram cultivadas em placas de 96 poços (4×10^3 células/poço) em um volume final de 100 μ L e, após atingirem semiconfluência (48 h), foram tratadas com os extratos e frações de *B. trimera*, conforme descrito no item 4.2.3. Após o período de tratamento (24 e 48 h), o meio de cultura e os tratamentos foram descartados, foi realizada uma lavagem com Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS) para retirar todo o meio residual que possa interferir no ensaio e, por último, foi adicionado 100 μ L de MTT 0,5 mg/mL diluído em HBSS. As culturas foram incubadas por 1 h, sob placa de aquecimento a 37°C e ao abrigo da luz. Após este período e retirada do MTT, o produto corado foi solubilizado com 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO), sob agitação por 15 minutos e então a absorbância foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 560 e 650 nm.

Foram realizados de 4 a 9 experimentos independentes (n= 4-9). Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle veículo (DMSO 1%), representando a viabilidade de cada tratamento.

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Tratamento}}{\text{Absorbância do Controle Veículo}} \times 100$$

4.2.5 QUANTIFICAÇÃO CELULAR

Como método complementar ao ensaio de viabilidade celular foi utilizado o teste de quantificação celular SRB (VICHAI e KIRTIKARA, 2006). A sulforrodamina B (SRB) é um corante arroxeadado que, em condições moderadamente ácidas, se liga a aminoácidos básicos da proteína celular de forma estequiométrica. Após as células serem coradas por esta técnica, a quantidade de corante extraído será diretamente proporcional ao total de proteína, o que, portanto, pode ser correlacionado com o número de células aderidas.

Primeiramente foi realizado um experimento para se obter uma curva da concentração de células, mostrando a relação entre o número de células aderidas e a absorvância gerada pela coloração com SRB lida em 490 nm. Para isto foram plaqueadas diferentes concentrações de células (250 a 10.000 por poço), sem os tratamentos, analisadas pelo ensaio com SRB em 24, 48 e 72 horas nas mesmas condições experimentais descritas a seguir.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços (4×10^3 células/poço) em um volume final de 100 μ L e, após atingirem semi-confluência (48 h), foram tratadas com os extratos e frações de *B. trimera*, conforme descrito no item 4.2.3. Após o período de tratamento (24 e 48 h), o meio de cultura e os tratamentos foram descartados e as células foram fixadas com 200 μ L/poço de TCA 10% por 1 hora a 4°C. Após feita a fixação, foram realizadas cinco lavagens cuidadosas das células com água destilada e secagem das placas. As células foram marcadas com 100 μ L/poço de SRB 0,2% (em solução de ácido acético 1%, v/v) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem com solução de ácido acético 1% para retirada do resíduo do corante, a coloração formada foi solubilizada com 200 μ L/poço de Tris 10 mM (pH 10,5), sob agitação por 30 minutos. Os valores de absorvância foram lidos em espectrofotômetro a 490 nm.

Foram realizados de 4 a 9 experimentos independentes (n= 4-9). Os resultados foram expressos em número de células percentual em relação ao controle veículo (DMSO 1%), representando a quantificação celular de cada tratamento.

$$\text{Número de células (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Tratamento}}{\text{Absorbância do Controle Veículo}} \times 100$$

4.2.6 MORFOLOGIA CELULAR

As células dos experimentos descritos nos itens 4.2.7 e 4.2.8 também tiveram suas morfologias observadas para detecção de possíveis alterações. Para isto, as células foram observadas em microscópio de fase invertido (aumento de 200 e 400x).

4.2.7 CICLO CELULAR

Para avaliação do efeito das frações enriquecidas de terpenos e compostos fenólicos (as que se mostraram mais ativas nos ensaios descritos nos itens 4.2.4 e 4.2.5) de *B. trimera* sob o ciclo celular, foram utilizadas as concentrações responsáveis por inibir 50 % da viabilidade pelo teste de MTT, após 24 horas de tratamento (IC_{50} , 24 h). As células foram cultivadas em placas de 6 poços (120×10^3 células/poço) em um volume final de 2 mL e, após atingirem semi-confluência (24 h), foram tratadas com os extratos e frações de *B. trimera*. Transcorridas 24 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.200 RPM por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,4), centrifugadas e ressuspensas em 500 μ L de solução de marcação (3,5 mM de citratotrisódico; 0,5 mM de Tris-HCl (pH 7,6); NP 40 0,1% (v/v); RNase 100 μ g/mL; PI 50 μ g/mL) na concentração de 10^6 células/mL. Após 30 minutos, os dados foram coletados usando citometria de fluxo (sistema de citometria FACSCalibur, BD Bioscience). Os dados obtidos foram analisados por software FLOWJO[®] (FIGUEIRÓ *et al.*, 2013).

4.2.8 MECANISMO DE MORTE CELULAR – APOPTOSE E NECROSE

Para avaliação do mecanismo de morte celular provocado pelas frações enriquecidas de terpenos e compostos fenólicos (as que se mostraram mais ativas nos ensaios descritos nos itens 4.2.4 e 4.2.5) de *B. trimera*, foram utilizadas as concentrações responsáveis por inibir 50 % da viabilidade pelo teste de MTT, após 24 horas de tratamento (IC_{50} , 24 h). Células em apoptose e necrose foram quantificadas usando marcação dupla com o kit Anexina V FITC-Iodeto de propídio (IP), segundo instruções do fornecedor (BD Biosciences). As células foram cultivadas em placas de 6 poços (120×10^3 células/poço) em um volume final de 2 mL e, após atingirem semi confluência (24h), foram tratadas com os extratos e frações de *B. trimera*. Transcorridas 24 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugada a 1.200 RPM por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes em PBS gelado (pH 7,4) e contadas. Após, 10^5 células foram suspendidas em tampão de ligação contendo Anexina V-FITC e IP. As amostras foram agitadas e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Células em apoptose e/ou necrose foram quantificadas usando uma técnica de

citometria de fluxo “dual-color” em um sistema de citometria FACSCalibur (a leitura da marcação com anexina V foi feita no canal FL1 e da marcação com iodeto de propídio no canal FL3). Os dados obtidos foram analisados no software FLOWJO®. Células foram classificadas como segue: células viáveis (Anexina negativas-/IP negativas-); em apoptose (Anexina positivas+/IP negativas-); em apoptose tardia (Anexina positivas+/IP positivas+) e em necrose (Anexina negativas-/IP positivas+) (FIGUEIRÓ *et al.*, 2013).

4.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados estatisticamente por Análise da Variância (ANOVA) de 1 via, seguidos de *post test* Tukey. $P < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostram que os tratamentos com as frações enriquecidas de terpenos e compostos fenólicos obtidas das partes aéreas de *B. trimera* reduzem a viabilidade e a quantidade das células tratadas nas condições citadas e que este efeito está relacionado a efeitos apoptóticos e sem alterações do ciclo celular. Essas duas frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e suas diferenças em composição química foram avaliadas para a obtenção dos compostos isolados que ainda estão sendo elucidados.

Este trabalho foi uma continuidade dos estudos que já vêm sendo realizados com esta planta pelo nosso grupo de pesquisa, abrangendo os aspectos fitoquímicos e, principalmente, as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003, 2004, 2006; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012, 2013).

Os resultados apresentados aprofundaram os conhecimentos químicos e biológicos desse vegetal e corroboram o grande interesse que já existe nesta espécie como fonte de compostos com potencial terapêutico, visto que o mesmo descreve um efeito nunca antes descrito da fração enriquecida de fenólicos de *B. trimera* sobre células tumorais do SNC.

Entretanto ainda são necessários estudos mais aprofundados de mecanismos de ação e a descoberta dos compostos ativos presentes nestas frações que possam servir como protótipos para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral.

7. REFERÊNCIAS

ABAD M.J. and BARMEJO, M. *Baccharis* (Compositae): a review update, *Arkivoc*, 76-96, **2007**.

ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Ministério da Saúde, Brazil. www.anvisa.gov.br (acessado em fevereiro de 2014).

BARROSO G.M. e BUENO O.L. Compostas – subtribo Baccharidinae. *Flora Illustrada Catarinense*. **2002**.

BERRIDGE M.V., TAN A.S., MCCOY K.D., WANG R. The Biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4: 14-19. **1996**.

BOUJRAD H., GUBKINA O., ROBERT N., KRANTIC S., SUSIN S.A. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle*, v. 6 (21), p. 2612-2619, **2007**.

BRAS M., QUEENAN B., SUSIN S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v.70, p. 231-239, **2005**.

CAO P., LIANG G., GAO X., WANG X., LI Z. Three new nor-dammarane triterpenoids from *Dysoxylum hainanense* with particular cytotoxicity against glioma cell line. *Arch. Pharm. Res.*, 36: 322-326. **2013**.

DE OLIVEIRA C.B., COMUNELLO L.N., LUNARDELLI A., AMARAL R.H., PIRES M.G.S., SILVA G.L., da, MANFREDINI V., VARGAS C.R., GNOATTO S.C.B., OLIVEIRA J.R. de, GOSMANN G. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. *Molecules*, 17: 1113-1123, **2012**.

DE OLIVEIRA C.B., COMUNELLO L.N., MACIEL E., GIUBEL S.R., BRUNO A., CHIELA E., LENZ G., GNOATTO S.C.B., BUFFON A., GOSMANN G. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in SiHa Cells: Differences in their activity and mechanism of action. *Molecules*, 18: 11022-11032, **2013**.

DE OLIVEIRA S.Q., BARBON G., GOSMANN G. Differentiation of South Brazilian *Baccharis* Species by TLC, *Journal of liquid Chromatography & Related Technologies*, 29, 2603-2609, **2006**.

DE OLIVEIRA S.Q., DAL-PIZZOL F., MOREIRA J.C.F., SCHENKEL E.P., GOSMANN G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, 23 (3), 365-368, **2004**.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 4ª edição. Atheneu: São Paulo, 2004.

FENG X., ZHOU Q., LIU C., TAO M-L. Drug screening study using glioma stem-like cells. *Molecular medicine reports*, 6: 1117-1120. **2012**.

FIGUEIRÓ F., BERNARDI A., FROZZA R.L., TERROSO T., ZANOTTO-FILHO A., JANDREY E.H.F., MOREIRA J.C.F., SALBEGO C.G., EDELWEISS M.I., POHLMANN A.R., GUTERRES S.S., BATTASTINI A.M.O. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces *in vitro* and *in vivo* glioma growth. *Journal of Medical Nanotechnology*, 9: 516-526. **2013**.

GALLUZZI L., VITALE I., ABRAMS J.M., ALNEMRI E.S., BAEHRECKE E.H., BLAGOSKLONNY M.V., DAWSON T.M., DAWSON V.L., EL-DEIRY W.S., FULDA S., GOTTLIEB E., GREEN D.R., HENGARTNER M.O., KEPP O., KNIGHT R.A., KUMAR S., LIPTON S.A., LU X., MADEO F., MALORNI W., MEHLEN P., NUÑEZ G., PETER M.E., PIACENTINI M., RUBINSZTEIN D.C., SHI Y., SIMON H-U., VANDENABEELE P., WHITE E., YUAN Y., ZHIVOTOVSKY B., MELINO G. AND KROEMER G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19: 107-120. **2012**.

GENÉ R. M., CARTAÑÁ C., ADZET T., MARIN E., PARELLA T., CAÑIGUERAL S. Antiinflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of active constituents. *Planta Medica*, 62, 232–335, **1996**.

GERHÄUSER C., KLIMO K., HEISS E., NEUMANN I., ELDEEN A.G., KNAUFT J., LIU G.Y., SITTHIMONCHAI S., FRANK N. Mechanism-based *in vitro* screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutation Research*, 163 (72), 523-524, **2003**.

GIANELLO J.C. and GIORDANO O.S. Examen químico en seis especies del genero *Baccharis*. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 15 (2), 84-86, **1984**.

GILABERT-ORIOU R., MERGEL K., THAKUR M., von MALLINCKRODT B., MELZIG M.F., FUCHS H., WENG A. Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins. *Bioorg. Med. Chem.*, 21 (8): 2387-2395. **2013**.

GOSMANN, G.; OLIVEIRA, C.B. DE, COMUNELLO, L.N. *Baccharis trimera* (Less.) DC. Carqueja. In: Amani S. Awaad; J.N.Govil; V.K.Singh. (Org.). *Recent Progress in Medicinal Plants, Ethnomedicine - Source & Mechanism-II*. New Delhi: Studium Press, 28, 107-120, **2010**.

GRANCE S.R.M., TEIXEIRA M.A., LEITE R.S., GUIMARÃES E.B., SIQUEIRA J.M. DE, FILIU W.F. DE O., VASCONCELOS S.B. DE S., VIEIRA M., DO C. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117(1), p. 28-33, **2008**.

HAIL N.Jr., KIM H.J., LOTAN R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis*, v. 11, p. 1677-1694, **2006**.

HERZ W., PILOTTI A., SÖDERHOLM A.C., SHUHAMA I.K., VICHNEWSKI W. New ent-clerodane type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 50, p. 3913-3916, **1977**.

INCA, **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL)**. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro:128p., 2011.

INCA, **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL)**. www.inca.gov.br (acessado em Janeiro de 2014).

INCA, **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA**, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro : 118 P., 2011b.

JAKUBOWICZ-GIL J., LANGNER E., RZESKI W. Kinetic studies of the effects of Temodal and quercetin on astrocytoma cells. *Pharmacological Reports*, 63: 403-416. **2011**.

JAKUBOWICZ-GIL J., LANGNER E., WERTEL I., PIERSIAK T., RZESKI W. Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 188: 190-203. **2010**.

JANUÁRIO A.H., SANTOS S.L., MARCUSSI S., MAZZI M.V., PIETRO R.C.L.R., SATO D.N., ELLENA J., SAMPAIO S.V., FRANÇA S.C., SOARES A.M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties, *Chemico-Biological Interactions*, v. 150, p. 243-251, **2004**.

KEEPERS Y.P., PIZAO P.E., PETERS G.J., ARK-OTTE J. von, WINOGRAD B., PINEDO H.M. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27 (7): 897-900. **1991**.

KIM E.J., CHOI C.H., PARK J.Y., KANG S.K., KIM Y.K. Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells. *Neurochem. Res.*, 33: 971-979. **2008**.

KIM H., MOON J.Y., AHN K.S., CHO S.K. Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**. (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/596496>).

KROEMER G., GALLUZZI L., VANDENABEELE P., ABRAMS J., ALNEMRI E. S., BAEHRECKE E.H., BLAGOSKLONNY M.V., EL-DEIRY W.S., GOLSTEIN P., GREEN D.R., HENGARTNER M., KNIGHT R.A., KUMAR S., LIPTON S.A., MALORNI W., NUÑEZ G., PETER M.E., TSCHOPP J., YUAN J., PIACENTINI M., ZHIVOTOVSKY B., MELINO G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, v. 16 (1), p. 3-11, **2009**.

KUREK, A.G. **Efeito do agente antiproliferativo de origem marinha ET- 743 sobre o ciclo celular, apoptose e conteúdo de proteína Hsp70 em células de glioma humano.** Porto Alegre, 2005. Dissertação de Mestrado em Bioquímica – Curso de Pós-Graduação em ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LEONETTI C., BIROCCIO A., GRAZIANI G., TENTORI L. Targeted therapy for brain tumors: role of PARP inhibitors. *Curr Cancer Drugs Targets*, 12:218-236. **2012.**

LOUIS D.N., OHGAKI H., WIESTLER O.D., CAVENEE W.K., BURGER P.C., MORGAN, D.O. The Cell Cycle: Principles of control. *New Science Press Ltd. London, UK.* **2007.**

NAKASUGI T. and KOMAI K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 2560–2564, **1998.**

NEWMAN D.J. and CRAGG G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-477, **2007.**

NOGUEIRA N.P.A., REIS P.A., LARANJA G.A.T., PINTO A.C., AIUB C.A.F., FELZENSZWALB I., PAES M.C., BASTOS F.F., BASTOS V.L.F.C., SABINO K.C.C., COELHO M.G.P. *In vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 138, p. 513– 522, **2011.**

NONES J., STIPURSKY J., COSTA S.L., GOMES F.C.A. Flavonoids and astrocytes crosstalking: Implications for brain development and pathology. *Neurochem Res* 35:955-966 DOI 10.1007/s11064-010-0144-0, **2010.**

PÁDUA B.C., SILVA L.D., JÚNIOR J.V.R., HUMBERTO J.L., CHAVES M.M., SILVA M.E., PEDROSA M.L., COSTA D.C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 129, p. 381–386, **2010.**

PARAJULI P., JOSHEE N., RIMANDO A.M., MITTAL S., YADAV A.K. *In vitro* antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta Med.*, 75: 41-48. **2009.**

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

PAVAN, A. *Baccharis trimera* Less. (Carqueja Amarga) Uma Planta da Medicina Popular Brasileira. *Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade Federal de São Paulo*, v.10, p. 205-214, **1952.**

RAVANAN P., SINGH S.K., RAO G.S., KONDAIAH P. Growth inhibitory, apoptotic and anti-inflammatory activities displayed by a novel modified triterpenoid, cyano enone of methyl boswelletes. *J. Biosci.*, 36: 297-307. **2011.**

REN S.C., SUO Q.F., DU W.T., PAN H., YANG M.M., WANG R.H., LIU J. Permeabilidade da quercetina através da barreira sangue-cérebro e do seu efeito sobre a viabilidade de células U251. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 41 (5): 751-4. **2010**.

RICCI M.S. and ZONG W-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The oncologist*, 11: 342-357. **2006**.

RODRIGUES C.R.F., DIAS J.H., DE MELLO R.N., RICHTER M.F., PICADA J.N., FERRAZ A.B.F. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, p. 97–101, **2009**.

SANTOS B.L., SILVA A.R., PITANGA B.P.S., SOUSA C.S., GRANGEIRO M.S., FRAGOMENI B.O., COELHO P.L.C., OLIVEIRA M.N., MENEZES-FILHO N.J., COSTA M.F.D., EL-BACHÁ R.S., VELOZO E.S., SAMPAIO G.P., FREIRE S.M., TARDY M., COSTA S.L. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. *Food Chemistry*, 127: 404-411, **2011**.

SCHWARTZBAUM J. A. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature clinical practice neurology*, 2(9), **2006**.

SEIBERT H., MASER E., SCHWEDA K., SEIBERT S., GÜLDEN M. Cytoprotective activity against peroxide-induced oxidative damage and cytotoxicity of flavonoids in C6 rat glioma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2398-2407. **2011**.

SIEGELIN M.D., REUSS D.E., HABEL A., RAMI A., DEIMLING A. Quercetin promotes degradation of surviving and thereby enhances death-receptor-mediated apoptosis in glioma cells. *Neuro-oncology*, 11: 122-131. **2009**.

SIMÕES-PIRES C.A., QUEIROZ E.F., HENRIQUES A.T., HOSTETTMANN K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. *Phytochemical Analyses*, v. 16, p. 307-314, **2005**.

SO BIOLOGIA www.sobiologia.com.br (acessado em fevereiro de 2014).

SOICKE H. and LENG-PESCHLOW E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica*, 53, 37-39, **1987**.

STAHL E. Thin-layer chromatography a laboratory handbook. 2 ed. New York Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1041 p., **1969**.

TAN G., GYLLENHAAL C., SOEJARTO D.D. Biodiversity as a source of anticancer drug. *Current Drug Targets*, 7, 265-277, **2006**.

VECHIA L.D., GNOATTO S.C.B., GOSMANN G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova*, 32 (5): 1245-1252. **2009**.

VERDI L.G., BRIGHENTE I.M.C., PIZZOLATTI M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos, *Química Nova*, 28 (1), 85-94, **2005**.

VICHAJ V. and KIRTIKARA K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, 1 (3): 1112-1116. **2006**.

VIEIRA T.O., SEIFRIZ I., CHARÃO C.C.T., DE OLIVEIRA, S.Q., CRECZYNSKI-PASA T.B. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21(4), p. 601-607, **2011**.

YAMANANDRA N., BERHOW M.A., KONDURI S., DINH D.H., OLIVERO W.C., NICOLSON G.L., RAO J.S. Triterpenoids from *Glycine max* decrease invasiveness and induce caspase-mediated cell death in human SNB19 glioma cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 20(4): 375-383. **2003**.

YUAN Z., HU Z., ZHANG L., YAN X., WANG H., WU B. Effect of quercetin on invasion, migration, proliferation and cell cycle of glioma U87 cells. *J South Med Univ*, 33(2): 207-211. **2013**.

ZAMIN L.L., FILIPPI-CHIELA E.C., DILLENBURG-PILLA P., HORN F., SALBEGO C., LENZ G. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Science*, 100 (9): 1655-1662. **2009**.

ZDERÒ C., BOHLMANN F., SOLOMON J.C., KING R.M., ROBINSON H. Ent-clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* species, *Phytochemistry*, v. 28 (2), p. 531-542, **1989**.

ZIELINSKA M., GÜLDEN M., SEIBERT H. Effects of quercetin and quercetin-3-O-glycosides on oxidative damage in rat C6 glioma cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 47-53. **2003**.

8. ANEXO

Anexo I: Portaria 599 de 26 de Junho de 2012. Ministério da Saúde.

Anexo II: Espectros de infravermelho do composto 3 e da quercetina

ANEXO I: PORTARIA 599 DE 26 DE JUNHO DE 2012. MINISTÉRIO DA SAÚDE.



Ministério da Saúde
Secretaria de Atenção à Saúde

PORTARIA Nº 599, DE 26 DE JUNHO DE 2012

***Aprova as Diretrizes
Diagnósticas e Terapêuticas do
Tumor Cerebral no Adulto.***

O Secretário de Atenção à Saúde, no uso das suas atribuições, Considerando a necessidade de se estabelecerem parâmetros sobre o tumor cerebral em adultos no Brasil e de diretrizes nacionais para diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos indivíduos com esta doença;

Considerando que as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas (DDT) são resultado de consenso técnico-científico e são formulados dentro de rigorosos parâmetros de qualidade e precisão de indicação;

Considerando as sugestões dadas à Consulta Pública SAS Nº 30, de 25 de agosto de 2010; e

Considerando a avaliação do Departamento de Atenção Especializada - Secretaria de Atenção à Saúde, resolve:

Art. 1º Ficam aprovadas, na forma do Anexo desta Portaria, as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas - Tumor Cerebral no Adulto.

§ 1º - As Diretrizes objeto deste Artigo, que contêm o conceito geral do tumor cerebral no adulto, critérios de diagnóstico, tratamento e mecanismos de regulação, controle e avaliação, são de caráter nacional e devem ser utilizadas pelas Secretarias de Saúde dos Estados e dos Municípios na regulação do acesso assistencial, autorização, registro e ressarcimento dos procedimentos correspondentes.

§ 2º - É obrigatória a cientificação ao paciente, ou ao seu responsável legal, dos potenciais riscos e efeitos colaterais relacionados ao uso de procedimento ou medicamento preconizado para o tratamento do tumor cerebral no adulto.

§ 3º - Os gestores estaduais e municipais do SUS, conforme a sua competência e pactuações, deverão estruturar a rede assistencial, definir os serviços referenciais e estabelecer os fluxos para o atendimento dos indivíduos com a doença em todas as etapas descritas no Anexo desta Portaria.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

HELVÉCIO MIRANDA MAGALHÃES JÚNIOR

ANEXO

DIRETRIZES DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS EM ONCOLOGIA CÂNCER CEREBRAL NO ADULTO

1. METODOLOGIA DE BUSCA E AVALIAÇÃO DA LITERATURA

Foi realizada em 29/12/2011 uma busca na base eletrônica Medline, acessada via PubMed, utilizando os descritores de interesse para câncer cerebral no adulto ("glioma"[MeSH Terms] OR "glioma"[All Fields]) AND ("adult"[MeSH Terms] OR "adult"[All Fields]), filtrados por interesse clínico ((randomized controlled trial[Publication Type] OR (randomized[Title/Abstract] AND controlled[Title/Abstract] AND trial[Title/Abstract])) e revisões sistemáticas ((systematic review [ti] OR meta-analysis [pt] OR meta-analysis [ti] OR systematic literature review [ti] OR (systematic review [tiab] AND review [pt]) OR consensus development conference [pt] OR practice guideline [pt] OR cochrane database syst rev [ta] OR acp journal club [ta] OR health technol assess [ta] OR evid rep technol assess summ [ta]) OR ((evidence based[ti] OR evidence-based medicine [mh] OR best practice* [ti] OR evidence synthesis [tiab]) AND (review [pt] OR diseases category[mh] OR behavior and behavior mechanisms [mh] OR therapeutics [mh] OR evaluation studies[pt] OR validation studies[pt] OR guideline [pt])) OR ((systematic [tw] OR systematically [tw] OR critical [tiab] OR (study selection [tw]) OR (predetermined [tw] OR inclusion [tw] AND criteri* [tw]) OR exclusion criteri* [tw] OR main outcome measures [tw] OR standard of care [tw] OR standards of care [tw]) AND (survey [tiab] OR surveys [tiab] OR overview* [tw] OR review [tiab] OR reviews [tiab] OR search* [tw] OR handsearch [tw] OR analysis [tiab] OR critique [tiab] OR appraisal [tw] OR (reduction [tw] AND (risk [mh] OR risk [tw]) AND (death OR recurrence))) AND (literature [tiab] OR articles [tiab] OR publications [tiab] OR publication [tiab] OR bibliography [tiab] OR bibliographies [tiab] OR published [tiab] OR unpublished [tw] OR citation [tw] OR citations [tw] OR database [tiab] OR internet [tiab] OR textbooks [tiab] OR references [tw] OR scales [tw] OR papers [tw] OR datasets [tw] OR trials [tiab] OR meta-analy* [tw] OR (clinical [tiab] AND studies [tiab]) OR treatment outcome [mh] OR treatment outcome [tw])) NOT (letter [pt] OR newspaper article [pt] OR comment [pt]).

Usando o filtro de ensaios clínicos e revisões sistemáticas foram selecionadas, respectivamente, 304 e 144 referências bibliográficas; após exclusão de informações duplicadas, estudos retrospectivos, ensaios clínicos iniciais (em fase I ou II), resultados interinos de estudos fase 3, estudos com medicamentos ou produtos para a saúde não registrados na ANVISA e estudos sobre outras neoplasias cerebrais, 28 artigos completos foram recuperados para análise.

Na biblioteca Cochrane, a busca foi realizada no dia 05/01/2012, utilizando-se a expressão "adult glioma" e foram localizadas oito revisões sistemáticas sobre o assunto, sendo duas pertinentes ao diagnóstico e tratamento de doentes com gliomas malignos.

2. INTRODUÇÃO

Os tumores cerebrais primários são um conjunto de neoplasias malignas originárias de células de sustentação do tecido nervoso. São tumores raros, correspondendo a 2% dos todos os cânceres conhecidos, porém com elevada mortalidade em adultos – status pouco modificada pelo emprego das modalidades terapêuticas disponíveis[1-3].

Estas Diretrizes compreendem a conduta terapêutica geral para os tumores neuroepiteliais do cérebro mais comuns no adulto, os gliomas[4,5], não se aplicando aos tumores com elementos embrionários (meduloepitelioma, tumor neuroectodérmico primitivo, meduloblastoma, neuroblastoma, retinoblastoma e ependimoblastoma), tumores da região selar (adenoma hipofisário, carcinoma hipofisário e craniofaringeoma), tumores de origem hematopoética (linfomas, plasmocitoma e sarcoma granulocítico), tumores de células germinativas (germinoma, carcinoma embrionário, tumor do seio endodérmico, coriocarcinoma, teratoma e tumores germinativos mistos), tumores das meninges (meningeoma, sarcomas e tumores melanocíticos), tumores dos nervos cranianos e espinhais (neurofibroma, neurinoma e Schwannoma manigno) e metástases cerebrais.

Os hospitais credenciados para atendimento em oncologia devem, por sua responsabilidade, dispor de protocolo clínico institucional complementar, adequado a estas Diretrizes, destinado a orientar a tomada de decisão por doentes e médicos, avaliar e garantir qualidade na assistência, orientar a destinação de recursos na assistência à saúde e fornecer elementos de boa prática médica [6].

3. CLASSIFICAÇÃO ESTATÍSTICA INTERNACIONAL DE DOENÇAS E PROBLEMAS RELACIONADOS À SAÚDE (CID)

C71.0 Neoplasia maligna do cérebro, exceto lobos e ventrículos (neoplasia maligna supratentorial SOE);

C71.1 Neoplasia maligna do lobo frontal;

C71.2 Neoplasia maligna do lobo temporal;

C71.3 Neoplasia maligna do lobo parietal;

C71.4 Neoplasia maligna do lobo occipital;

C71.5 Neoplasia maligna do ventrículo cerebral (exclui quarto ventrículo, C71.7);

C71.6 Neoplasia maligna do cerebelo;

C71.7 Neoplasia maligna do tronco cerebral (neoplasia maligna infratentorial SOE);

C71.8 Neoplasia maligna do encéfalo com lesão invasiva (neoplasia maligna que comprometa dois ou mais locais contíguos dentro desta categoria de três algarismos, e cujo local de origem não possa ser determinado);

C71.9 Neoplasia maligna do encéfalo, não especificado.

4. DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

A avaliação inicial do doente compreende o exame clínico neurológico detalhado e exames de neuroimagem. A extensão da doença é diagnosticada minimamente por tomografia computadorizada contrastada (TC), complementada por ressonância magnética (RM) e espectroscopia, quando disponível; radiografia de crânio, arteriografia cerebral e mielografia são exames adicionais indicados ocasionalmente com base na avaliação médica individual[7,8].

O diagnóstico definitivo é firmado pelo estudo histopatológico de espécime tumoral obtido por biópsia estereotática ou a céu aberto, sendo essencial para o planejamento terapêutico. Recomenda-se que o patologista seja sempre informado sobre o quadro clínico do doente e os achados ao exame de neuroimagem. A gradação dos tumores é baseada em aspectos histopatológicos (critérios de St. Anne-Mayo), quais sejam: atipias nucleares, índice mitótico, proliferação endotelial e grau de necrose[5,9,10].

De acordo com o número de achados histopatológicos, os gliomas são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em[5]:

OMS grau I: lesões não infiltrativas, com baixo potencial proliferativo, sem atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose;

OMS grau II: lesões em geral infiltrativas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose;

OMS grau III: lesões infiltrativas, com dois critérios presentes, em geral atipias nucleares e alto índice mitótico;

OMS grau IV: lesões infiltrativas, com três ou quatro critérios presentes.

A biópsia ou cirurgia não são procedimentos necessários ou recomendáveis rotineiramente para o diagnóstico de gliomas tectais ou pontíneos difusos fora do contexto de estudos clínicos, sendo suficiente para este fim a avaliação por ressonância magnética[11,12].

5. OPÇÕES TERAPÊUTICAS

A seleção do tratamento deverá ser adequada ao tipo histológico e gradação do tumor segundo a classificação da OMS dos tumores do sistema nervoso, localização do tumor, capacidade funcional (escala ECOG/Zubrod), condições clínicas e preferência do doente.

CIRURGIA

A ressecção cirúrgica é o tratamento recomendado na maioria dos casos de tumor cerebral, com objetivo de remover amplamente a neoplasia com a máxima preservação das funções neurológicas. Eventualmente, a localização do tumor em área eloquente permite apenas citorredução ou biópsia da lesão[13].

Doentes com hidrocefalia podem necessitar ventriculostomia ou derivação ventriculoperitoneal para palição de sintomas. Gastrostomia está indicada quase sempre que houver comprometimento da deglutição ou do reflexo da tosse.

RADIOTERAPIA

A radioterapia desempenha um papel central no tratamento paliativo do tumor cerebral, na doença inicialmente inoperável ou recorrente. A irradiação focal por meio de técnicas convencionais permite estabilizar ou melhorar a condição funcional de muitos doentes.

A dose empregada situa-se entre 54-60 Gy, podendo atingir 72 Gy com hiperfracionamento; o campo irradiado deve incluir a área de realce visível à TC com margens de 2-3 cm ou margem de 1-2 cm em torno da imagens de RM ponderadas em T2. Doentes com lesão pequena (até 4 cm) e contra-indicação para cirurgia podem se beneficiar de radioterapia focal estereotáctica[14,15].

QUIMIOTERAPIA

A quimioterapia antineoplásica é pouco ativa para o câncer cerebral, produzindo benefício clínico temporário para alguns doentes[3,16]. A necessidade de uso concomitante de medicamentos anticonvulsivantes para muitos doentes parece estar associada a melhor prognóstico, em particular com o ácido valproico, a despeito de toxicidade variável[17-19]. Esquemas terapêuticos, quimioterápicos, contendo nitrosureias (carmustina ou lomustina), alquilantes (procarbazona, dacarbazina ou temozolomida), derivados da platina (cisplatina ou carboplatina), vincristina, teniposídeo, hidroxiureia, cloroquina, bevacizumabe e irinotecano se mostraram úteis no tratamento paliativo de gliomas cerebrais grau III ou IV, muitos deles administrados concomitantemente à radioterapia[3,16,20-25].

A temozolomida é um medicamento oral relacionado a um antineoplásico clássico, a dacarbazina; enquanto a dacarbazina requer metabolização hepática para produção do agente antineoplásico clinicamente ativo (monometiltriazenoimidazol carboxamida, MTIC), a temozolomida é convertida em MTIC no plasma[26]. Em dois estudos clínicos randomizados sobre temozolomida em associação à radioterapia para gliomas de alto grau, este tratamento mostrou ser ativo quando comparado com placebo[27,28]; outros estudos demonstraram eficácia comparável da temozolomida e do esquema PCV (procarbazona, lomustina e vincristina) para doentes com gliomas de alto grau[29] ou com astrocitoma anaplásico[30]. Inexiste demonstração de que a temozolomida seja mais segura ou eficaz que outra terapia antineoplásica associada à radioterapia para doentes com gliomas malignos.

PLANO TERAPÊUTICO

GLIOMA GRAU I OMS (astrocitoma pilocítico, astrocitoma de células gigantes subependimais, xantastrocitoma pleomórfico e subependimoma), tumor endimário e do plexo coroide:

Cirurgia apenas, se completamente ressecável.

Cirurgia seguida por radioterapia, se houver confirmação ou suspeita de tumor residual.

GLIOMAS GRAU II OMS (astrocitoma difuso, oligodendroglioma, endimoma e oligoastrocitoma misto), tumor pineal e glioneural:

Cirurgia apenas, se completamente ressecável.

Cirurgia seguida por radioterapia, se houver confirmação ou suspeita de tumor residual.

GLIOMA GRAU III OMS (astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico, endimoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico):

Cirurgia seguida por radioterapia.

Cirurgia seguida por radioterapia associada à quimioterapia.

GLIOMA GRAU IV OMS (glioblastoma multiforme, espongiblastoma polar, astroblastoma e gliomatose cerebral):

Cirurgia seguida por radioterapia.

Cirurgia seguida por radioterapia associada à quimioterapia.

Radioterapia associada à quimioterapia.

Radioterapia paliativa.

Quimioterapia paliativa.

GLIOMA DO TRONCO CEREBRAL

Radioterapia exclusiva primária.

Observação clínica e radioterapia quando houver progressão clínica.

6. MONITORIZAÇÃO DO TRATAMENTO

Exames laboratoriais prévios à quimioterapia: hemograma, creatinina sérica, aminotransferases/transaminases (ALT/TGP e AST/TGO), gama-glutamilttransferase (gamaGT) e glicemia.

Exames laboratoriais durante a radioquimioterapia: hemograma semanal.

Exames de neuroimagem: pré-tratamento, 45-90 dias após a radioquimioterapia e ao término da quimioterapia pós-operatória.

6.1. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA

A avaliação da resposta ao tratamento antineoplásico paliativo é baseada na observação clínica e não pode ser feita exclusivamente por critérios radiológicos[31].

6.2. CRITÉRIOS DE INTERRUPÇÃO DO TRATAMENTO

A quimioterapia deve ser suspensa, temporária ou definitivamente, na ocorrência de: Toxicidade clínica graus 3 e 4, conforme os parâmetros propostos pelo National Cancer Institute (EUA), de uso internacional.

Redução da capacidade funcional do doente para os níveis 3 ou 4 da escala de Zubrod.

Após seis ciclos de quimioterapia, nos doentes que recebem tratamento pós-operatório e não apresentam lesão residual.

A qualquer tempo, na evidência clínico-neurológica de progressão de doença.

Falta de aderência ao tratamento.

Manifestação voluntária do doente, após esclarecimento dos riscos envolvidos.

7. ACOMPANHAMENTO PÓS-TRATAMENTO

Exame clínico ambulatorial no mínimo a cada três meses no primeiro ano, quadrimestral no segundo ano, semestral no terceiro ano e anual após, por toda a vida do doente.

Exames laboratoriais e de neuroimagem devem ser solicitados em bases individuais, de acordo com sintomas e sinais notados durante o acompanhamento.

8. REGULAÇÃO/CONTROLE/AVALIAÇÃO PELO GESTOR

Doentes adultos com diagnóstico de neoplasia maligna cerebral devem ser preferencialmente atendidos em hospitais habilitados em oncologia com serviço de radioterapia e minimamente naqueles com porte tecnológico suficiente para diagnosticar, tratar e realizar o seu monitoramento clínico.

Além da familiaridade que esses hospitais guardam com o estadiamento, o tratamento, o manejo das doses e o controle dos efeitos adversos, eles têm toda a estrutura ambulatorial, de internação, de terapia intensiva, de hemoterapia, de suporte multiprofissional e de laboratórios necessária para o adequado atendimento e obtenção dos resultados terapêuticos esperados.

A regulação do acesso é um componente essencial da gestão para a organização da rede assistencial e garantia do atendimento dos doentes, e muito facilita as ações de controle e avaliação. Ações de controle e avaliação incluem, entre outras: a manutenção atualizada do Cadastro Nacional dos Estabelecimentos de Saúde (CNES); a autorização prévia dos procedimentos; o monitoramento da produção dos procedimentos (por exemplo, frequência apresentada versus autorizada, valores apresentados versus autorizados versus ressarcidos); a verificação dos percentuais das frequências dos procedimentos quimioterápicos em suas diferentes linhas (cuja ordem descendente - primeira maior do que segunda maior do que terceira - sinaliza a efetividade terapêutica). Ações de auditoria devem verificar in loco, por exemplo, a existência e a observância da conduta ou protocolo adotados no hospital; regulação do acesso assistencial; qualidade da autorização; a conformidade da prescrição e da dispensação e administração dos medicamentos (tipos e doses); compatibilidade do procedimento codificado com o diagnóstico e capacidade funcional (escala de Zubrod); a compatibilidade da cobrança com os serviços executados; a abrangência e a integralidade assistenciais; e o grau de satisfação dos doentes.

Exceto pela Talidomida para o tratamento de Mieloma Múltiplo e pelo Mesilato de Imatinibe para a quimioterapia do Tumor do Estroma Gastrointestinal (GIST), da Leucemia Mieloide Crônica e Leucemia Linfoblástica Aguda cromossoma Philadelphia positivo, o Ministério da Saúde e as Secretarias de Saúde não padronizam nem fornecem medicamentos antineoplásicos diretamente aos hospitais ou aos usuários do SUS. Os procedimentos quimioterápicos da tabela do SUS não fazem referência a qualquer medicamento e são aplicáveis às situações clínicas específicas para as quais terapias antineoplásicas medicamentosas são indicadas. Ou seja, os hospitais credenciados no SUS e habilitados em Oncologia são os responsáveis pelo fornecimento de medicamentos oncológicos que eles, livremente, padronizam, adquirem e fornecem, cabendo-lhes codificar e registrar conforme o respectivo procedimento. Assim, a partir do momento em que um hospital é habilitado para prestar assistência oncológica pelo SUS, a responsabilidade pelo fornecimento do medicamento

antineoplásico é desse hospital, seja ele público ou privado, com ou sem fins lucrativos. Os procedimentos radioterápicos (Grupo 03, Subgrupo 01) e cirúrgicos (Grupo 04, Subgrupo 03) da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS podem ser acessados, por código do procedimento ou nome do procedimento e por código da CID – Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – para a respectiva neoplasia maligna, no SIGTAP- Sistema de Gerenciamento dessa Tabela (<http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/inicio.jsp>), com versão mensalmente disponibilizada.

É o seguinte o procedimento da tabela do SUS para a quimioterapia de tumor cerebral em adulto, associada ou não à radioterapia:

QUIMIOTERAPIA PALIATIVA – ADULTO

03.04.02.032-0 – Quimioterapia de tumor do sistema nervoso central avançado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Blomgren H. Brain tumors. *Acta oncologica* (Stockholm, Sweden). 1996;35 Suppl 7:16-21.
- 2 - Gutin PH, Posner JB. Neuro-oncology: diagnosis and management of cerebral gliomas--past, present, and future. *Neurosurgery*. 2000 Jul;47(1):1-8.
- 3 - Lesley S, Burdett S. Chemotherapy for high-grade glioma. *Cochrane database of systematic reviews* (Online). 2002(4):CD003913.
- 4 - Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland). 1993 Jul;3(3):255-68.
- 5 - Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2002 Mar;61(3):215-25; discussion 26-9.
- 6 - BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Bases Técnicas da Oncologia – SIA/SUS - Sistema de Informações Ambulatoriais. 13 ed. Brasília: MS/SAS/DRAC/CGSI, 2011. 110p.
- 7 - Hutter A, Schweteye KE, Bierhals AJ, McKinstry RC. Brain neoplasms: epidemiology, diagnosis, and prospects for cost-effective imaging. *Neuroimaging clinics of North America*. 2003 May;13(2):237-50, x-xi.
- 8 - Ferraz-Filho JR, Santana-Netto PV, Rocha-Filho JA, Sgnolf A, Mauad F, Sanches RA. Application of magnetic resonance spectroscopy in the differentiation of high-grade brain neoplasm and inflammatory brain lesions. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 2009 Jun;67(2A):250-3.
- 9 - Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*. 1988 Nov 15;62(10):2152-65.
- 10 - Pitella JEH. Biópsia estereotáxica no diagnóstico de tumores cerebrais e lesões não-neoplásicas: indicações, acurácia e dificuldades diagnósticas. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44(5):343-54.
- 11 - Salmaggi A, Fariselli L, Milanesi I, Lamperti E, Silvani A, Bizzi A, et al. Natural history and management of brainstem gliomas in adults. A retrospective Italian study. *Journal of neurology*. 2008 Feb;255(2):171-7.
- 12 - Wilkinson R, Harris J. Moral and legal reasons for altruism in the case of brainstem biopsy in diffuse glioma. *British journal of neurosurgery*. 2008 Oct;22(5):617-8.
- 13 - Tsitlakidis A, Foroglou N, Venetis CA, Patsalas I, Hatzisotiriou A, Selviaridis P. Biopsy versus resection in the management of malignant gliomas: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neurosurgery*. 2010 May;112(5):1020-32.
- 14 - Tsao MN, Mehta MP, Whelan TJ, Morris DE, Hayman JA, Flickinger JC, et al. The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2005 Sep 1;63(1):47-55.
- 15 - Bleehen NM, Stenning SP. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *British journal of cancer*. 1991 Oct;64(4):769-74.
- 16 - Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. Multi-drug versus single agent chemotherapy for high grade astrocytoma; results of a meta-analysis. *Anticancer research*. 1998 Nov-Dec;18(6B):4693-7.
- 17 - Yap KY, Chui WK, Chan A. Drug interactions between chemotherapeutic esquemas and antiepileptics. *Clinical therapeutics*. 2008 Aug;30(8):1385-407.
- 18 - Jaeckle KA, Ballman K, Furth A, Buckner JC. Correlation of enzyme-inducing anticonvulsant use with outcome of patients with glioblastoma. *Neurology*. 2009 Oct 13;73(15):1207-13.
- 19 - Weller M, Gorlia T, Cairncross JG, van den Bent MJ, Mason W, Belanger K, et al. Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma. *Neurology*. 2011 Sep 20;77(12):1156-64.
- 20 - Levin VA, Wara WM, Davis RL, Vestnys P, Resser KJ, Yatsko K, et al. Phase III comparison of

BCNU and the combination of procarbazine, CCNU, and vincristine administered after radiotherapy with hydroxyurea for malignant gliomas. *Journal of neurosurgery*. 1985 Aug;63(2):218-23.

21 - Nelson DF, Diener-West M, Horton J, Chang CH, Schoenfeld D, Nelson JS. Combined modality approach to treatment of malignant gliomas--re-evaluation of RTOG 7401/ECOG 1374 with long-term follow-up: a joint study of the Radiation Therapy Oncology Group and the Eastern Cooperative Oncology Group. *NCI Monogr*. 1988(6):279-84.

22 - Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Jr., Selker RG, VanGilder JC, et al. Randomized trial of three chemotherapy esquemas and two radiotherapy esquemas and two radiotherapy esquemas in postoperative treatment of malignant glioma. *Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001*. *Journal of neurosurgery*. 1989 Jul;71(1):1-9.

23 - Levin VA, Silver P, Hannigan J, Wara WM, Gutin PH, Davis RL, et al. Superiority of post-radiotherapy adjuvant chemotherapy with CCNU, procarbazine, and vincristine (PCV) over BCNU for anaplastic gliomas: NCOG 6G61 final report. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1990 Feb;18(2):321-4.

24 - Sotelo J, Briceno E, Lopez-Gonzalez MA. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of internal medicine*. 2006 Mar 7;144(5):337-43.

25 - Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4733-40.

26 - Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer treatment reviews*. 1997 Jan;23(1):35-61.

27 - Hart MG, Grant R, Garside R, Rogers G, Somerville M, Stein K. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2008(4):CD007415.

28 - Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. 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 EORTC-NCIC trial. *The lancet oncology*. 2009 May;10(5):459-66.

29 - Brada M, Stenning S, Gabe R, Thompson LC, Levy D, Rampling R, et al. Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 20;28(30):4601-8.

30 - Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5874-80.

31 - Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, Sykora R, Castillo R, Ballman KV, et al. Validation of neuroradiologic response assessment in gliomas: measurement by RECIST, two-dimensional, computer-assisted tumor area, and computer-assisted tumor volume methods. *Neuro-oncology*. 2006 Apr;8(2):156-65.

ANEXO II: ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 3 E DA QUERCETINA

