

Josiane Mann

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA LECTINA
DE *Canavalia grandiflora* (ConGF) EM CULTURAS DE CÉLULAS
DE GLIOMA DA LINHAGEM C6**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mann, Josiane

Avaliação do potencial antitumoral da lectina de
Canavalia grandiflora (ConGF) em culturas de
células de glioma da linhagem C6 / Josiane Mann ;
orientador, Rodrigo Bainy Leal, SC, 2018.
103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, SC, 2018.

Inclui referências.


1. Neurociências. 2. Glioblastoma. 3. Lectina.
4. Autofagia. I. Leal, Rodrigo Bainy. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

"Avaliação do potencial antitumoral da lectina de *Canavalia grandiflora* (ConGF) em culturas de células de glioma da linhagem C6"


Por

Josiane Mann

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (016/2018/PGN) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Banca examinadora:


Dr.(a) Rodrigo Bány Leal (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr.(a) Evelise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Andriara Espíndola de Freitas (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 07 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida concedida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal pela constante orientação e por me conceder a oportunidade para desenvolver o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFSC.

Aos meus companheiros de laboratório, especialmente as minhas colaboradoras: Ingrid e Ana Paula. Muito obrigada pelas colaborações e ensinamentos. A Isabella pela contribuição do blot para esse trabalho e pela amizade, muito obrigada! Aos demais colegas: Priscilla, Igor, Leandra, Lilian e Tainara. Muito obrigada.

À querida Andiara pelas sugestões, disposição em ajudar a qualquer momento e aos bons momentos de convivência. Muito obrigada.

Aos professores membros da banca de qualificação do mestrado: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez, Prof. Dr. Marcelo Farina e Dr. Mark William Lopes, pelas suas sugestões e contribuições neste trabalho.

Aos colegas da sala de cultura celular do departamento de bioquímica: Tet, Caio, Anderson, Naiara, Roberta, Bernardo e Glorister. Muito obrigada por ajudar nas horas da cultura e principalmente pela paciência nos tempos alongados do uso dos fluxos.

Ao Corpo Técnico do LAMEB, pela disponibilidade e apoio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFSC pelos ensinamentos e pelas aulas ministradas.

Ao amigo Nivaldo pela ajuda e disponibilidade.

Ao Professor Benildo Sousa Cavada e seus alunos do Laboratório de Biologia Molecular, pela disponibilização das lectinas purificadas.

Aos colegas da Pós-Graduação pela amizade e troca de conhecimento no dia-a-dia e nas aulas. Em especial a querida Ana Cristina, minha amiga na Neuro, agradeço pela força e amizade.

Às agências financiadoras brasileiras de fomento à pesquisa e de bolsas de pós-graduação – CNPq e CAPES – bem como aos funcionários do Departamento de Bioquímica e de Neurociências da UFSC.

Aos “antigos” amigos da Bio, Prof. Luiz Fernando, Ana Franken, Bruninha, Bruna Estefany Lemos de Souza, Renzo, Gustavo, Maria Eduarda Garcia, Lohana, pela amizade e experiências compartilhadas.

Aos meus amigos do Paz, Mariana, Argos, Emily, Henrique, André, Adriane, Ernesto, Vi, Felipe, Leonardo, Gi, Isis, Bruno, Lívia, Paula, Ias, Caprici, Otávio, Bruno Pava, Artur, Luiza, Karine, e aos novos integrantes, agradeço pela amizade, pela diversão e pela companhia.

À Marcielly, pela amizade sincera em todos os momentos de nossa convivência.

A minha grande amiga Brunna Heine, pela amizade, conversas, trabalhos em conjunto, etc.

A minha querida amiga Marile, muito obrigada por toda força e amizade. Você é nota dez!

À família Mann, pelos momentos de descontração, ensinamentos e apoio prestados em todos os momentos. Em especial a minha avó Nadir, por toda a educação e o amor.

A minha mãe Joseli, pelo amor, dedicação e apoio incondicional e por sempre ter acreditado em mim.

Ao meu irmão Thiago, por toda amizade, companheirismo, suporte técnico e correções. Muito obrigada por toda sua ajuda.

À Cristiane e à Eduarda, amigas, irmãs fontes de toda força. Minha gratidão incondicional, pelos esforços e todo apoio que durante essa etapa vocês fizeram por mim. “Somos como ramos de uma árvore, crescemos em direções diferentes, mas nossa raiz é uma só e assim a vida de cada uma sempre será uma parte essencial da vida da outra.”

À Maryane, minha filha que é o amor que transborda em mim. Obrigada pelas mais lindas experiências e por tudo que tem despertado em mim.

Quero deixar aqui um agradecimento especial ao meu “Bem”, que ao meu lado sempre me fez mais feliz e principalmente durante essa jornada fez de tudo para me ajudar a alcançar essa conquista, incluindo as diversas vezes em que me perguntou: “já finalizou a escrita da introdução?” Obrigada por ter a paciência, a disciplina, e o amor que nos ajudam a melhorar aqui na Terra. Eu te amo!

A todos que, de algum modo, influenciaram positivamente nesta caminhada, toda admiração e reconhecimento.

“A vida é como andar de bicicleta. Para ter equilíbrio você tem que se manter em movimento.”
(Albert Einstein, 1930)

RESUMO

Glioblastomas (GBMs) são tumores malignos altamente agressivos, de ocorrência no sistema nervoso central. O prognóstico dos pacientes com GBM é desfavorável, principalmente por ser um câncer muito resistente às terapias atuais; além de sua natureza invasiva. Uma característica que tem sido associada à transformação maligna e progressão do tumor é a presença de alterações no padrão de glicosilação celular. Lectinas são proteínas de reconhecimento e ligação a carboidratos presentes em glicoconjugados, podendo regular numerosos processos celulares em eventos fisiológicos e patológicos. ConA, por exemplo, é uma lectina com afinidade por glicose/manose que demonstrou ter atividade antitumoral, sendo capaz de desencadear uma sinalização pró-apoptótica e autofágica. ConGF é uma lectina isolada das sementes de *Canavalia grandiflora*, que de maneira similar à ConA possui afinidade por glicose/manose. Apesar de ter a mesma afinidade e semelhança estrutural a ConA, nenhum estudo prévio avaliou o efeito de ConGF sobre GBMs. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial antitumoral de ConGF sobre a linhagem C6, bem como os mecanismos de morte celular implicados. Nossos resultados mostraram que ConGF (30-100 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a viabilidade celular (avaliada pelo ensaio de MTT) e induziu alterações morfológicas (avaliadas por microscopia de luz e de fluorescência) nas células da linhagem C6. Adicionalmente, ConGF foi efetiva em inibir a taxa de proliferação das células C6, além de afetar o potencial transmembrana mitocondrial, um processo que pode estar associado com a indução de apoptose. Ensaios de bloqueio do domínio de interação com carboidratos (CRD) demonstraram que a ação de ConGF foi dependente do CRD; uma vez que a ConGF não teve efeito biológico após sua pré-incubação com α -metil-D-manosídeo (um bloqueador do CRD). A análise de migração celular mostrou que o tratamento com ConGF, em baixas concentrações (25 ou 30 $\mu\text{g/mL}$) foi efetivo em promover a inibição da migração celular. Além disso, o tratamento com ConGF foi capaz de induzir o processo de autofagia na linhagem C6, avaliado através da coloração com laranja de acridina (LA) e pela avaliação da expressão da proteína recrutada durante a autofagia (LC3AB-II) nas células tratadas com ConGF (30 $\mu\text{g/mL}$). Dessa forma, podemos concluir que ConGF apresentou uma potente atividade antitumoral *in vitro* e este efeito pode estar relacionado com a indução do processo de autofagia. O presente estudo indica pela primeira vez o potencial antitumoral de ConGF e aponta a importância de estudos adicionais para detalhar o mecanismo de ação desta lectina.

Palavras-chave: Glioblastoma. Lectina. ConGF. Autofagia. C6.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) are malignant tumors considered as the most aggressive occurring in the central nervous system. The prognosis of patients with GBM is poor, mainly because it is a very resistant cancer to currently used therapies; beyond their invasive nature. One characteristic that has been associated with the malignant transformation and tumor progression is the presence of changes in the pattern of cellular glycosylation. Lectins are carbohydrate recognition and binding proteins present in glycoconjugates, being able to regulate numerous cellular processes in physiological and pathological events. ConA, for example, is a lectin with mannose/glucose-binding specificity that showed antitumor activity; being able to trigger pro-apoptotic and autophagic signalings. In turn, ConGF is a mannose/glucose-binding lectin isolated from *Canavalia grandiflora* seeds which, likewise ConA, display mannose/glucose-binding affinity. Despite such similarities, no previous study evaluated the effect of ConGF on GBM. Therefore, the present study aimed to investigate the antitumor capacity of ConGF on C6 cell line, as well as evaluate possible mechanisms implicated in this effect. Our results showed that ConGF (30-100 μ g/mL) reduced cell viability (measured by the MTT assay) and induced morphological changes (assessed by optic and fluorescence microscopy) on C6 cells. Additionally, ConGF was effective in inhibiting the proliferation rate of C6 cells, and also affected the mitochondrial membrane potential, which might be associated with apoptosis induction. Moreover, assay that blocked the carbohydrate recognition domain (CRD) demonstrated that ConGF-induced cell death was dependent on CRD; since ConGF had no biological effect after its preincubation with α -methyl-D-mannoside (a CRD blocker). Cell migration assay showed that the treatment with ConGF at low concentrations (25 or 30 μ g/mL) was effective in promoting the inhibition of cell migration. In addition, ConGF treatment was able to induce autophagic process, evaluated by the acridine orange (AO) stain, as well as by measurement of LC3AB-II expression, a protein recruited and activated during autophagy. Thus, we can conclude that ConGF showed potent antitumor activity *in vitro*, and this effect may be related to the induction of the autophagic process. The present study indicates for the first time the antitumor capability of ConGF and indicates the importance of further studies addressing the mechanism triggered by ConGF for this action.

Keywords: Glioblastoma. Lectin. ConGF. Autophagy. C6.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frequência relativa dos tumores primários do cérebro e do SNC.....	27
Figura 2 - Algoritmo simplificado para a classificação dos gliomas difusos com base em características histológicas e genéticas.	30
Figura 3 – A via da apoptose intrínseca.....	36
Figura 4 - Apoptose extrínseca.....	38
Figura 5 – Etapas da autofagia.....	43
Figura 6 – Flor (painel A) e sementes (painel B) de <i>Canavalia grandiflora</i>	48
Figura 7 – Estrutura geral da lectina ConGF.....	49
Figura 8 – Efeito de ConGF sobre a viabilidade de células de glioma C6.....	62
Figura 9 – Alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com ConGF em células de glioma C6.....	63
Figura 10 – Efeito de ConGF sobre a proliferação celular em células de glioma C6.....	65
Figura 11 – Efeito de ConGF na migração celular sobre células de glioma C6.....	67
Figura 12 – Efeito de ConGF nativa e bloqueada sobre a viabilidade celular de células de glioma C6.....	68
Figura 13 – Efeito do tratamento com ConGF sobre o potencial de membrana mitocondrial das células de glioma C6.....	70
Figura 14 – Avaliação da presença de AVOs em células de glioma C6 após o tratamento com ConGF.....	72
Figura 15 – Expressão de LC3-I/II após o tratamento com ConGF em células de glioma C6.....	74
Figura 16 – Avaliação da indução de necrose medida através da razão IP/Hoechst em células de glioma C6 após o tratamento com ConGF...	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos gliomas segundo a OMS	28
Tabela 2 - Anticorpos utilizados para <i>western blotting</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMP – Adenosina monofosfato
AMPK – Proteína cinase dependente de AMP
APAF-1 - Fator de Ativação de Protease Associada a Apoptose 1
APPL-1 - Proteína Adaptadora Endossomal 1
ATP – Adenosina trifosfato
Bak - Proteína Destruidora de Antagonistas de Bcl2, do inglês: *Bcl2-Antagonist/Killer 1*
Bax - Proteína X Associada a Bcl-2, do inglês: *Bcl-2 Associated X Protein*
ConA - Concanavalina A
ConGF – Lectina da *Canavalia grandiflora*
CRD - Domínio de reconhecimento de carboidratos
DCC – Receptor de Netrin
DISC - Complexo Sinalizador Indutor de Morte
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade Ótica
DR - Receptor de Morte
EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
EGFRvIII - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Constitutivamente Ativo
FADD - Proteína com Domínio de Morte Associado ao Faz
FASL - Ligante da proteína FAZ
FCCP – Carbonil cianeto de p-trifluorometoxifenilhidrazona
FHL2 – Proteína 2 de domínio quatro e meio LIM
GBM – Glioblastoma
IAPs - Proteínas inibidoras de apoptose
IP - Iodeto de Propídio
JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianeto.
LC3-I - Cadeia leve 3 da Proteína 1 associada a Microtúbulos forma I
LC3-II - Cadeia leve 3 da Proteína 1 associada a Microtúbulos forma II
MOMP - Permeabilização da membrana mitocondrial externa
mTOR – Proteína alvo da rapamicina de mamíferos
MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Tampão fosfato-salino
PI3K - Fosfoinositol-3-cinase
PTEN - Fosfatase Homóloga a Tensina
RAIDD - Proteína associada à RIP com domínio de morte
RCD - Morte celular regulada

SFB - Soro fetal bovino

SMAC - Segundo ativador mitocondrial de caspase

SNC - Sistema Nervoso Central

SNARE - Proteínas receptoras de ligação ao fator solúvel sensível N-etilmaleimida

STX17 – Syntaxina-17

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFR - Receptor do fator de necrose tumoral

TRADD - Domínio de morte associado ao receptor de TNF

TMRE - Tetrametilrodamina-etil-éster

TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

UVRAG - Gene associado à resistência à radiação ultravioleta

XIAP - Proteína inibidora de apoptose ligada ao X (*X-Linked inhibitor of apoptosis protein*)

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
L	Litros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Célsius
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	GLIOMAS	27
1.1.1	Glioblastoma.....	30
1.1.2	Linhagem de glioma C6.....	32
1.2	MORTE CELULAR	33
1.2.1	Apoptose.....	33
1.2.1.1	Definição de apoptose intrínseca	35
1.2.1.2	Definição de apoptose extrínseca.....	38
1.2.2	Morte celular dependente de autofagia.....	40
1.3	GLICOSILAÇÃO	44
1.4	LECTINAS	44
1.4.1	Lectinas de leguminosas	46
1.4.2	ConGF	47
2	JUSTIFICATIVA.....	49
3	OBJETIVOS.....	50
3.1	OBJETIVO GERAL	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
4	METODOLOGIA	53
4.1	CULTURA CELULAR DE GLIOBLASTOMA C6 DE RATO 53	
4.2	PURIFICAÇÃO DA LECTINA ConGF.....	53
4.3	DILUIÇÃO E BLOQUEIO DE ConGF.....	53
4.4	TRATAMENTO CELULAR.....	54
4.5	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	54
4.6	ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA	55
4.7	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO.....	55
4.8	ENSAIO DE MIGRAÇÃO	55

4.9	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$) COM OS INDICADORES FLUORESCENTES JC-1 E TMRE.....	56
4.9.1	Ensaio de JC-1.....	56
4.9.2	Ensaio de TMRE.....	57
4.10	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	58
4.10.1	Ensaio com Laranja de acridina.....	58
4.10.2	Ensaio de detecção de necrose	58
4.11	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LC3.....	59
4.11.1	Preparação dos extratos celulares	59
4.11.2	Western Blot.....	60
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5	RESULTADOS	61
5.1	EFEITO CITOTÓXICO DE ConGF EM CÉLULAS DE GLIOMA61	
5.2	ConGF PROVOCA ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS C6.....	62
5.3	AVALIAÇÃO DE ConGF NA REDUÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DAS CÉLULAS DE GLIOMA	63
5.4	EFEITOS DE ConGF SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS DE GLIOMA	65
5.5	O EFEITO DE ConGF É DEPENDENTE DO SÍTIO DE LIGAÇÃO A CARBOIDRATOS (CRD).....	67
5.6	EFEITO DE ConGF SOBRE O POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL	69
5.7	EFEITO DE ConGF SOBRE A AUTOFAGIA EM CÉLULAS DE GLIOMA	70
5.8	O TRATAMENTO COM ConGF INDUZIU ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DA LC3	73
5.9	EFEITOS DE ConGF SOBRE OS NÍVEIS DE NECROSE EM CÉLULAS DE GLIOMA C6.....	74
6	DISCUSSÃO	77
7	PERSPECTIVAS	81

8	CONCLUSÃO	81
9	REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS

Gliomas e meningiomas são os tipos mais comuns de tumor cerebral primário (Figura 1) (WELLER *et al.*, 2015; OSTROM *et al.*, 2017). De acordo com o relatório do Registro Central do Tumor Cerebral de 2017 dos Estados Unidos (CBTRUS), a maioria dos gliomas ocorre nos lobos frontal, temporal, parietal e occipital (60,8%) e apenas uma proporção muito pequena de gliomas ocorre fora do encéfalo (OSTROM *et al.*, 2017). Os gliomas, de forma geral, representam aproximadamente 30% de todos os tumores cerebrais primários e 80% de todos os tumores malignos do sistema nervoso central (SNC) (OSTROM *et al.*, 2017).

A incidência de todos os tumores primários é estimada em 22,64 casos a cada 100.000 indivíduos, por ano, e a idade média de diagnóstico dos pacientes sendo 59 anos (OSTROM *et al.*, 2017).

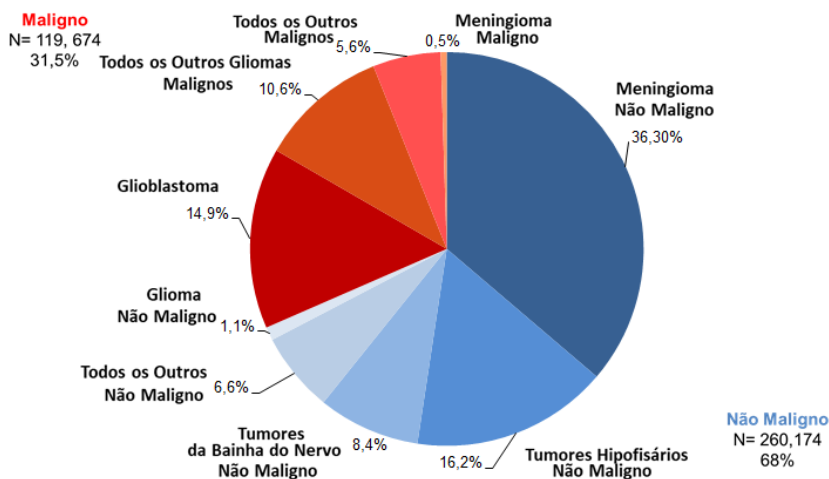


Figura 1 - Frequência relativa dos tumores primários do SNC. A figura mostra a incidência de tumores cerebrais primários e de outros tumores do SNC. Durante o período de 2010-2014, o Registro Central do Tumor Cerebral dos Estados Unidos (CBTRUS) diagnosticou 379.848 tumores cerebrais primários e outros

tumores do SNC, sendo 119.674 malignos e 260.174 não malignos. Adaptado de Ostrom *et al.* (2017).

Os gliomas constituem o conjunto de cânceres intracranianos originados de células gliais ou precursoras, e são classificados com base em semelhanças morfológicas com os tipos de células gliais encontradas no cérebro normal. Neste sentido, os gliomas são classificados em astrocitoma (incluindo glioblastoma), oligodendroglioma, ependimoma, oligoastrocitoma (glioma misto) (LIMA *et al.*, 2012; WELLER *et al.*, 2015). No entanto, o diagnóstico, sob o ponto de vista morfológico, está desaparecendo, uma vez que, nos dias de hoje, os testes moleculares geralmente fornecem um diagnóstico inequívoco de tumor astrocítico ou oligodendroglial (LOUIS *et al.*, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) possui um sistema de classificação para os gliomas, proposto em 2007 a quarta edição, com o objetivo de classificar os tumores humanos e garantir critérios de diagnóstico histopatológicos uniformes e utilizados em todo o mundo (LOUIS *et al.*, 2007; WEN & HUSE, 2017). A classificação proposta, divide os gliomas segundo três critérios principais: a) histopatológicos; b) grau de malignidade variando de I à IV - quanto maior o grau, maior a malignidade (tal graduação resulta do reconhecimento de indicadores de anaplasia, a saber: atipia nuclear, pleomorfismo, atividade mitótica, hiperplasia endotelial e necrose); e c) considerando a localização do tumor no cérebro - conforme listado na **Tabela 1** (LOUIS *et al.*, 2007; WEN & KESARI, 2008; HUSE *et al.*, 2011, LIMA *et al.*, 2012; REIFENBERGER *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Classificação dos gliomas segundo a OMS

OMS - Sistema de Classificação para Gliomas	
Grau	Características
Tumor Grau I (astrocitoma pilocítico, astrocitoma de célula gigante subependimal, subependimoma, ependimoma mixopapilar)	Benigno, de crescimento lento; geralmente é associado à sobrevivência em longo prazo; recorrência menos provável.
Tumor Grau II (astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma)	Hiper celularidade aumentada, sem mitose; sem proliferação vascular; sem necrose; possível recorrência como tumor de grau mais elevado.
Tumor Grau III (astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma)	Alta taxa de hiper celularidade; alta taxa de mitose; sem proliferação vascular; sem necrose; alta taxa de recorrência tumoral.

Tumor Grau IV (glioblastoma)

Taxa elevada de hiper celularidade; taxa elevada de mitose; presença de proliferação vascular; presença de necrose.

Fonte: Adaptado de Eckley & Wargo (2010) e de Louis *et al.* (2016).

A partir de 2016, pela primeira vez, a classificação da OMS de tumores do SNC passou a utilizar parâmetros moleculares além da histologia para definir muito dos tumores (LOUIS *et al.*, 2016). Na atualização da quarta edição de 2007, a classificação de tumores do SNC foi reestruturada e representa o consenso de 117 colaboradores de 20 países, onde incorporou biomarcadores moleculares juntamente com as características histológicas clássicas em um diagnóstico integrado, garantindo assim, maior precisão e universalidade para a definição dos gliomas (LOUIS *et al.*, 2016; REIFENBERGER, *et al.*, 2017; WEN & HUSE, 2017; WIRSCHING & WELLER, 2016).

Uma melhoria importante na classificação de gliomas de 2016 da OMS, em comparação com a classificação anterior de 2007, é a distinção de diferentes tipos de glioma de acordo com o estado da mutação da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) (Figura 2). O conhecimento do status da IDH separa claramente os tumores oligodendrogliais de tumores como o neurocitoma central, ependimoma, e tumor neuroepitelial disembrionoplástico (DNT), todos caracterizados pela ausência de mutações no gene *IDH1* (VON DEIMLING *et al.*, 2010; REIFENBERGER *et al.*, 2017). Adicionalmente, as mutações no gene *IDH1* são um marcador molecular altamente seletivo de glioblastomas secundários que complementa critérios clínicos para distingui-los de glioblastomas primários (NOBUSAWA *et al.*, 2009).

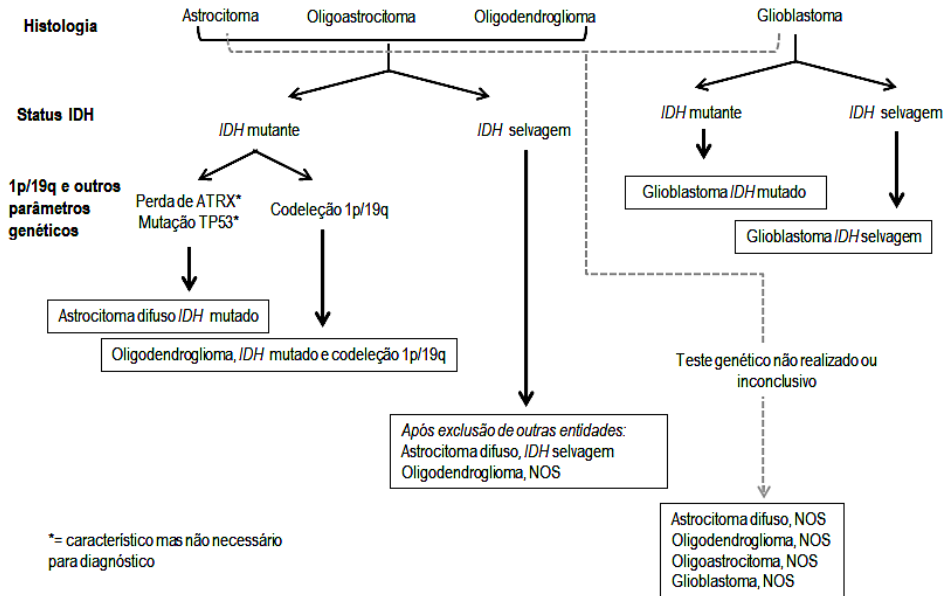


Figura 2 - Algoritmo simplificado para a classificação dos gliomas difusos com base em características histológicas e genéticas. NOS: não especificado. Adaptado de Louis *et al.* (2016).

1.1.1 Glioblastoma

Como visto anteriormente, o glioblastoma (GBM) é um subtipo de glioma. O GBM foi identificado pela primeira vez em 1863 pelo Dr. Rudolf Virchow como um tumor com células de origem glial (DAVIS, 1928; AGNIHOTRI *et al.*, 2013). Em 1926, o neuropatologista, Dr. Percival Bailey, e o neurocirurgião, Dr. Harvey Cushing, mudaram o nome de spongioblastoma multiforme para glioblastoma multiforme (LOUIS *et al.*, 2001; AGNIHOTRI *et al.*, 2013).

Cerca de metade de todos os gliomas recém-diagnosticados são classificados como GBM. A taxa média de incidência anual, ajustada pela idade, de GBM é de 3,20 casos por 100.000 indivíduos. Comparativamente a outros tipos de câncer, o GBM apresenta uma baixa incidência na população, no entanto, causa um número desproporcional de óbitos relacionados a câncer por causa de sua alta letalidade (OGAWA *et al.*, 2006; ARBAB *et al.*, 2017; OSTROM *et al.*, 2017). GBM afeta pacientes de todas as idades, porém a taxa de incidência é significativamente alta em pacientes idosos (THAKKAR *et al.*, 2014).

Histologicamente, eles são caracterizados por atipia nuclear, pleomorfismo celular, atividade mitótica, trombose vascular, proliferação microvascular e necrose (LOUIS *et al.*, 2007; OHGAKI & KLEIHUES, 2013). Na classificação de 2016 da OMS, os GBMs (grau IV da OMS) são divididos em GBM com o gene IDH-tipo selvagem; GBM IDH-mutado; e GBM NOS. O GBM IDH selvagem é responsável por aproximadamente 90% dos GBMs e corresponde aos GBMs primários que podem surgir em indivíduos de qualquer idade, mas ocorrem predominantemente em pacientes após os 55 anos de idade (LOUIS *et al.*, 2016; OHGAKI & KLEIHUES, 2013). O GBM IDH-mutado representa cerca de 10% dos casos e geralmente ocorre em pacientes mais jovens. Eles correspondem a GBMs secundários que surgem de gliomas de grau inferior preexistente e geralmente são associados a um melhor prognóstico do que os GBMs IDH do tipo selvagem (LOUIS *et al.*, 2016; OHGAKI & KLEIHUES 2013; YAN *et al.*, 2009). No diagnóstico de GBMs, o termo NOS é utilizado para indicar os tumores que não passaram por avaliação de IDH (WEN & HUSE, 2017; WIRSCHING & WELLER, 2016).

Sob o ponto de vista fisiopatológico, as alterações genéticas encontradas com mais frequência nos GBMs são as mutações de perda de função ou silenciamento das proteínas p53, p16, Rb e PTEN e mutações de ganho de função como a amplificação do gene EGFR (FULCI *et al.*, 2000; HOLLAND, 2001; OHGAKI & KLEIHUES, 2007; PUROW & SCHIFF, 2009; REIFENBERGER *et al.*, 2017). De maneira importante, evidências indicam que tais alterações resultam em desregulação de vias de sinalização intracelular que acabam levando a um aumento da proliferação celular, sobrevivência celular, invasão e angiogênese tecidual (FURNARI *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2013; WIRSCHING & WELLER, 2016; LENTING *et al.*, 2017).

Os sintomas clínicos associados a esse tipo de câncer podem incluir dores de cabeça progressivas, déficits neurológicos focais e convulsões (HOLLAND, 2001; WEN & KESARI, 2008). O diagnóstico, por sua vez, é feito a partir da suspeita clínica da existência de um tumor cerebral acompanhada por exames complementares como a ressonância magnética, método pelo qual é possível definir as características da massa tumoral, tais como a localização, o tamanho e o grau de edema (WEN & KESARI, 2008). Na ausência da ressonância magnética, o exame que pode ser feito para avaliação da lesão é a tomografia computadorizada. Por fim, o diagnóstico deve ser confirmado por exame histopatológico de uma amostra do tumor (BEHIN *et al.*, 2003).

Apesar de todos os avanços terapêuticos, os pacientes com GBM exibem uma sobrevida de aproximadamente 14 meses (GILBERT *et al.*, 2013; GILBERT *et al.*, 2014; CHINOT *et al.*, 2014). Geralmente, os pacientes são submetidos à remoção cirúrgica do tumor seguido por tratamentos de radioterapia e quimioterapia através do uso de temozolomida, um agente alquilante da classe dos triazenos que atua causando dano citotóxico às células em todas as fases do ciclo celular (HUSE *et al.*, 2013; ARBAB *et al.*, 2017; SANAI & BERGER, 2017; WANG *et al.*, 2017). No entanto, os GBMs desenvolvem resistência durante o tratamento, o que induz recorrência do tumor, e mais fatalmente, implica em morte do paciente (YIP *et al.*, 2009; HIDDINGH *et al.*, 2014; DU *et al.*, 2017; SANAI & BERGER, 2017).

1.1.2 Linhagem de glioma C6

No final da década 60, Benda *et al.* (1968) desenvolveram a linhagem C6, a qual é morfológicamente similar ao GBM quando injetado no cérebro de ratos neonatos (SCHMIDEK *et al.*, 1971; AUER *et al.*, 1981; GROBBEN *et al.*, 2002; JACOBS *et al.*, 2011). Benda e colaboradores verificaram que administrando semanalmente N-nitrosometiluréia a ratos Wistar, durante um período de aproximadamente 8 meses, induzia o desenvolvimento de tumor cerebral nestes animais (SCHMIDEK *et al.*, 1971). Os tumores cerebrais primários induzidos através dessa técnica foram detectados e passaram a ser cultivados em cultura primária (BENDA *et al.*, 1971). As células tumorais foram mantidas em cultura, posteriormente clonadas, e a partir do sexto clone foram designadas como C6, originando-se assim a linhagem (BENDA *et al.*, 1971; BARTH & KAUR, 2009).

A linhagem C6 compartilha várias características das quais são relatadas no GBM humano (JACOBS *et al.*, 2011). Os tumores de glioma C6 apresentam invasão focal em tecido cerebral quando implantadas em ratos Wistar, semelhante à infiltração padrão difusa observada no GBM humano (CHICOINE & SILBERGELD, 1995). Em termos genéticos, a linhagem C6 apresenta altas taxas de mutação no gene supressor do tumor p16, esta alteração genética também é comumente observada em GBMs (SCHLEGEL *et al.*, 1999). Além disso, a nível celular, tumores C6 apresentam necrose, polimorfismo nuclear e taxas de mitose elevadas (AUER *et al.*, 1981). Cabe destacar, que a expressão da proteína glial S100B atesta o seu caráter astrocitário (BENDA *et al.*, 1971; LABOURDETTE & MARKS, 1975; ZIMMER & VAN ELDIK, 1989).

1.2 MORTE CELULAR

Uma das estratégias terapêuticas promissoras para o câncer humano, inclusive o GBM, é a indução de morte celular (FULDA, 2018). A morte celular é um processo pelo qual a capacidade vital de uma célula é encerrada (GALLUZZI *et al.*, 2018).

Embora a morte celular possa ocorrer como morte celular acidental (ACD, *Accidental Cell Death*) - resultado da exposição da célula a graves insultos físicos (pressões elevadas e temperaturas ou forças osmóticas), químicos (variações extremas de pH) ou mecânicos (forças de cisalhamento) e não envolve nenhuma maquinaria molecular, a maioria das mortes celulares em animais ocorre como morte celular regulada (RCD, *Regulated Cell Death*). A RCD, por sua vez, depende de uma maquinaria molecular específica, o que indica que pode ser modulada (ou seja, atrasada ou acelerada) por intervenções farmacológicas ou genéticas (GREEN & LLAMBI, 2015; GALLUZZI *et al.*, 2018).

Desde a década de 60, procura-se caracterizar os mecanismos de morte celular, já que inicialmente, a definição das modalidades de morte celular foi descrita baseando-se em critérios puramente morfológicos observados em microscópio (KROEMER *et al.*, 2005; GALLUZZI, *et al.*, 2012; FUCHS & STELLER, 2015).

O progresso bioquímico e genético na exploração dos mecanismos de morte celular, permitiu que em 2018, o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (NCCD, *Nomenclature Committee on Cell Death*) propusesse uma classificação atualizada das modalidades de morte celular centrada nos aspectos moleculares e essenciais do processo (GALLUZZI *et al.*, 2018). Segundo a última definição proposta pelo NCCD, a morte celular pode ser classificada em apoptose intrínseca; apoptose extrínseca; necrose dirigida por transição de permeabilidade mitocondrial (MPT); necroptose; ferroptose; piroptose; parthanatos; morte celular entótica; morte celular NETótica; morte celular dependente do lisossoma; morte celular dependente de autofagia; e morte celular imunogênica (FUCHS *et al.*, 2007; IZZO *et al.*, 2016; GALLUZZI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). Neste sentido, considerando o foco deste trabalho, será a seguir aprofundada a descrição dos processos de apoptose e autofagia.

1.2.1 Apoptose

A apoptose, um processo ativo de alterações morfológicas e fisiológicas, desempenha um papel essencial na regulação do desenvolvimento, da homeostase e da defesa imune ao eliminar células

desnecessárias ou anormais em tecidos (WEI *et al.*, 2008). Este fenômeno é induzido por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. O termo apoptose foi proposto em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie para descrever um mecanismo controlado de remoção celular onde as células compartilhavam características morfológicas distintas das características observadas na morte celular por necrose (KERR *et al.*, 1972).

Na descrição morfológica, a apoptose é caracterizada pela presença de alterações nucleares como a condensação e fragmentação da cromatina, redução do volume celular, desprendimento do substrato e formação de corpos apoptóticos (HU & KAVANAGH, 2003; KROEMER *et al.*, 2005; KEPP *et al.*, 2011). Os corpos apoptóticos, carregam materiais citoplasmáticos envolvidos por membrana plasmática, os quais são prontamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos e células vizinhas, de modo que as células que morrem por apoptose são eficientemente removidas dos tecidos (ELMORE, 2007; CZABOTAR *et al.*, 2014).

Os efetores centrais da apoptose são representados por uma família de proteases denominadas caspases (NUNEZ *et al.*, 1998; THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; HASSAN *et al.*, 2014). As caspases, proteases com resíduos de cisteína no sítio catalítico, são capazes de reconhecer e clivar resíduos de aspartato em proteínas, e podem ser agrupadas em dois subgrupos com base nas suas funções. As iniciadoras possuem pró-domínios longos que contém um dos dois domínios: domínio efetor de morte DED (caspases-8 e -10) e o domínio de recrutamento de caspases CARD (caspases-1,-2,-4,-5,-9,-11 e -12). As efetoras apresentam pró-domínios curtos (caspases-3, -6 e -7) (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; DEGTEREV *et al.*, 2003; HU & KAVANAGH, 2003; ELMORE, 2007; LAVRIK *et al.*, 2005; FERNALD *et al.*, 2013; PROKHOROVA *et al.*, 2015).

As caspases são sintetizadas como zimogênios, e uma vez ativadas, podem ativar outras pró-caspases, permitindo a iniciação e regulação da cascata proteolítica (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997; DEGTEREV *et al.*, 2003; LAVRIK *et al.*, 2005). A ativação das caspases pode ser desencadeada através de duas vias principais: a via intrínseca (mediada por mitocôndria) e a via extrínseca (mediada pelo receptor da morte celular) (HU & KAVANAGH, 2003; FULDA & DEBATIN, 2006; ELMORE, 2007).

1.2.1.1 Definição de apoptose intrínseca

A apoptose intrínseca é uma forma de RCD que é iniciada por uma variedade de sinais, incluindo dano ao DNA, privação de fatores de crescimento, estresse do retículo endoplasmático e sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre outros estímulos (BRUMATTI *et al.*, 2010; GALLUZZI & KEPP, 2016; LABI & ERLACHER, 2016; GALLUZZI *et al.*, 2018). Em resposta ao estresse celular provocado por esses sinais, uma mudança de equilíbrio favorece as proteínas pró-apoptóticas sobre as anti-apoptóticas levando à ativação de fatores pró-apoptóticos, como Bax e Bak, que formam poros na membrana externa mitocondrial e, portanto, compromete a integridade mitocondrial pelo processo denominado de permeabilização da membrana mitocondrial externa ou MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) (LOWE *et al.*, 2004; PROKHOROVA *et al.*, 2015; FOUAD & AANEI, 2017; GALLUZZI *et al.*, 2018; MARTIN-SANCHEZ *et al.*, 2018). A Figura 3 detalha a iniciação da apoptose intrínseca.

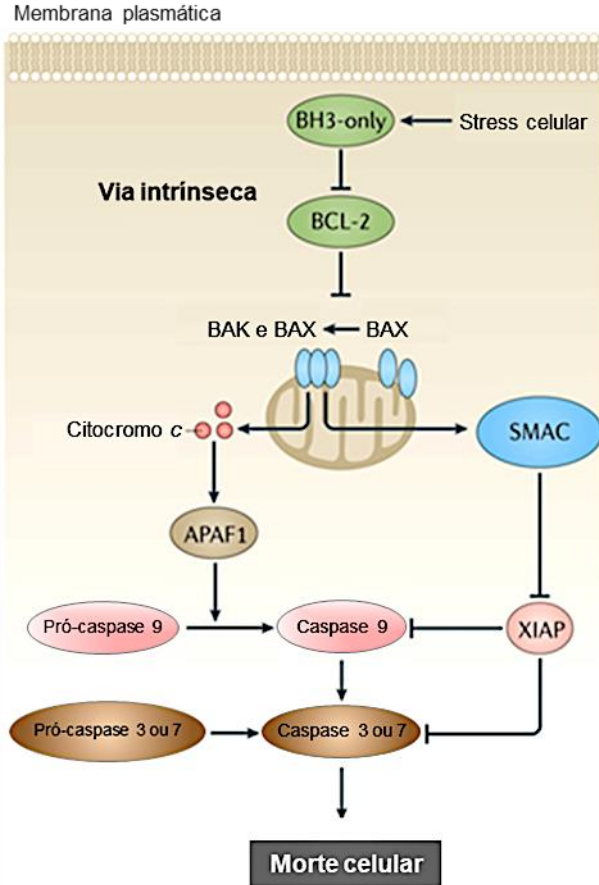


Figura 3 – A via da apoptose intrínseca. Após a ativação da via intrínseca pelo estresse celular, as proteínas pró-apoptóticas *BH3-only* inibem as anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-XL. A subsequente ativação e oligomerização das proteínas proapoptóticas Bak e Bax induzem a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP). Resultando na liberação do citocromo *c* e do SMAC (segundo ativador mitocondrial de caspase) das mitocôndrias. O citocromo *c* livre no citosol se associa à APAF1 (fator ativador de proteases – 1) e à pró-caspase-9, o que leva à ativação da caspase-9. A caspase-9, então, ativa a pró-caspase-3 e a pró-caspase-7, resultando em morte celular. As proteínas SMAC inibem o fator de inibição de apoptose (XIAP), o qual inibe a atividade enzimática da caspase tanto na fase de iniciação (caspase-9) como na fase de execução (caspase-3 e caspase-7). Adaptado de Ashkenazi e colaboradores (2017).

O controle do MOMP é regulado pelas proteínas da família Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*), com atividade pró (como é o caso de Bax e Bak) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL) (DEWSON, 2001; CZABOTAR *et al.*, 2014; GALLUZZI *et al.*, 2015). A ativação Bak e Bax ocorre através de interações com os chamados ativadores diretos, proteínas *BH3-only*, ou por efeitos físico-químicos de detergentes, calor leve ou pH elevado (LUNA-VARGAS & CHIPUK, 2016; ASHKENAZI, *et al.*, 2017).

As membranas externas mitocondriais permeabilizadas liberam proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo *c*, SMAC/DIABLO e outros fatores da mitocôndria ao citoplasma (GILLIES & KUWANA, 2014; BRUMATTI *et al.*, 2010; LOPEZ & TAIT, 2015). Após a sua libertação das mitocôndrias, o citocromo *c* se liga a proteína pró-apoptótica APAF1 (fator ativador de proteases – 1), induzindo sua mudança conformacional e levando à formação do complexo ativador de caspase-9, denominado apoptossoma (FULDA & DEBATIN, 2006; RIEDL & SALVESEN, 2007; TAIT & GREEN, 2010; REDZA-DUTORDOIR & AVERILL-BATES, 2016; MONTERO & LETAI, 2018). A proteína SMAC citosólica promove um aumento na ativação de caspases, mediado por sua interação com as proteínas inibidoras do processo apoptótico (IAPs), incluindo a proteína inibidora de apoptose ligada ao cromossomo-X (XIAP), um inibidor potente de caspase (DEVERAUX *et al.*, 1997; FERNALD & KUROKAWA, 2013; GALLUZZI *et al.*, 2018).

O apoptossoma pode recrutar e ativar a pró-caspase-9, que por sua vez, ativa as caspases executoras como a caspase-3 e caspase-7 (FULDA & DEBATIN, 2006; LOPEZ & TAIT, 2015; REDZA-DUTORDOIR & AVERILL-BATES, 2016; GALLUZZI *et al.*, 2018). Neste contexto, as caspase-3 e -7, as executoras da apoptose, clivam mais de 1000 proteínas diferentes, levando a sua degradação ou ativação. Tal evento, afeta processos fisiológicos, incluindo a remodelação da cromatina, a manipulação das vias de sinalização, a deformação do citoesqueleto e a exposição de sinais para fagocitose (KALKAVAN & GREEN, 2018; MONTERO & LETAI, 2018). Além disso, a atividade catalítica das caspases executoras conduz ao desaparecimento celular e é responsável por muitos dos correlatos morfológicos e bioquímicos de uma célula em apoptose em estágio final, incluindo a fragmentação do DNA, a exposição de fosfatidilserina (PS) e a formação de corpos apoptóticos (MARTIN *et al.*, 1996; COLEMAN *et al.*, 2001; NAGATA, 2001; GALLUZZI *et al.*, 2018).

1.2.1.2 Definição de apoptose extrínseca

Marcada pela ativação por sinais de estresse externos à célula, a apoptose extrínseca, um tipo de RCD, é mediada por receptores de membrana celular que detectam esses sinais e o propagam para o citoplasma (ASHKENAZI, 2008; STRASSER *et al.*, 2009; FLUSBERG & SORGER, 2015). A apoptose extrínseca (Figura 4) é conduzida principalmente por dois tipos de receptores de membrana: (i) receptores de morte, cuja ativação é através da interação de ligantes específicos, e (ii) receptores de dependência, onde a ativação ocorre quando os níveis de seus ligantes específicos se situam em níveis críticos (LOCKSLEY & KILLEEN, 2001; ASHKENAZI, 2008; MEHLEN & TAUSZIG-DELAMASURE, 2014; GIBERT & MEHLEN, 2015).

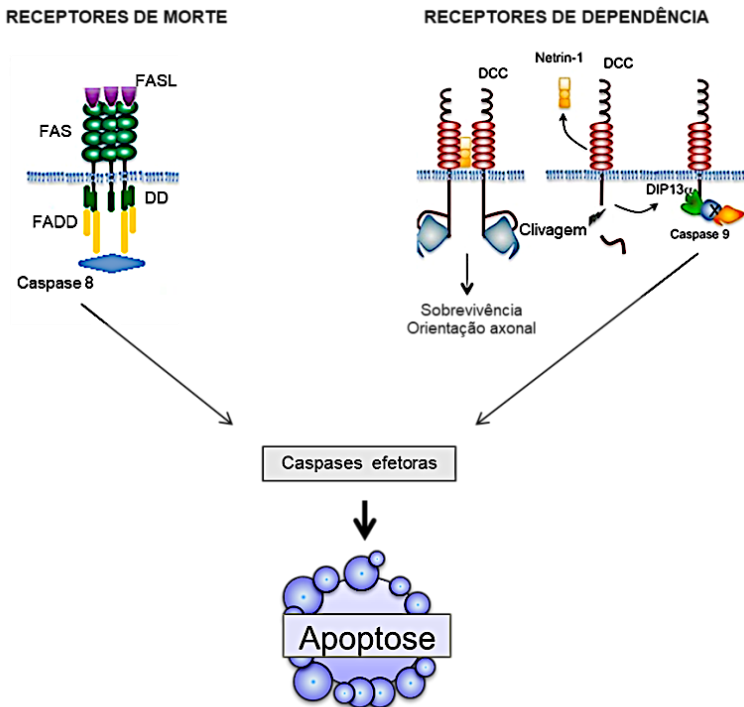


Figura 4 - Apoptose extrínseca. Na sinalização do receptor de morte, a ligação do ligante FasL ao receptor de morte celular, presente na superfície celular, leva à ativação do receptor FAS, o qual recruta proteínas adaptadoras (FADD). Essas proteínas recrutam a pró-caspase-8, formando o complexo de sinalização indutor

de morte. A apoptose extrínseca também pode ser desencadeada pelos receptores de dependência como o DCC. Na presença de netrin-1, DCC dimeriza e interage com a pró-caspase-3. Porém, na ausência do ligante, DCC é monomérico e clivado pela caspase-3 ou por outra protease. Essa clivagem permite a interação com DIP13 α e a caspase-9. Essa interação ativa a caspase-9, que por sua vez, ativa a caspase-3. Adaptado de Galluzzi *et al.* (2012); Mehlen & Tauszig-Delamasure (2014) e Czabotar *et al.* (2014).

Os receptores de morte (*death receptors*-DR) são membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) e são caracterizados por apresentar domínios extracelulares ricos em cisteína e possuir um domínio citoplasmático denominado domínio de morte (*Death Domain* - DD), o qual é essencial para a transdução intracelular do sinal de morte (ASHKENAZI & DIXIT, 1998; IDRIS & NAISMITH, 2000; LOCKSLEY & ILLEEN, 2001; HU & KAVANAGH, 2003; ELMORE, 2007). Entre os DRs mais estudados, podemos citar o FasR, TRAIL-R1, TRAIL-R2 e TNFR1. Nesses receptores, atuam os respectivos ligantes: FASL/CD95L; TRAIL/Apo2L e TNF- α (ZHANG *et al.*, 2005; ARYA *et al.*, 2007; MAHMOOD & SHUKLA, 2010; SUN *et al.*, 2011; FLUSBERG & SORGER, 2015). Após a associação do ligante com o DR, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras (FADD, TRADD ou RAIDD) que se ligam ao DD presente na porção intracelular do receptor, resultando na formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC) (HU & KAVANAGH, 2003; GALLUZZI *et al.*, 2018). O complexo DISC, formado pelo ligante, receptor e adaptador, funciona como plataforma molecular que pode regular a ativação e funções da caspase-8, que por sua vez, cliva as pró-caspases efetoras conduzindo à morte celular (HU & KAVANAGH, 2003; LOWE, *et al.*, 2004; GALLUZZI *et al.*, 2018).

Os receptores de dependência são conhecidos por induzirem uma sinalização positiva (sobrevivência, proliferação, diferenciação) na presença do seu ligante. Entretanto, estudos vêm demonstrando que na ausência de seus ligantes eles não permanecem inativados, em vez disso, provocam um sinal apoptótico (MEHLEN *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 1999; BREDESEN *et al.*, 2005; MILLE *et al.*, 2009; DELLOYE-BOURGEOIS *et al.*, 2013). Atualmente, 20 desses receptores foram identificados incluindo: os receptores de netrin-1 como o DCC e UNC5H (UNC5A, UNC5B, UNC5C); o receptor do fator de crescimento nervoso p75 NTR; os receptores das neurotrofinas TrkA e TrkC e os receptores Sonic Hedgehog Patch (Ptc) (RABIZADEH *et al.*, 1993; BERNET *et al.*, 2007; GOLDSCHNEIDER & MEHLEN, 2010; DELLOYE-

BOURGEOIS *et al.*, 2013; GIBERT & MEHLEN, 2015). Assim, na ausência de seus respectivos ligantes, podem ocorrer os seguintes eventos: (i) DCC é clivado pela caspase-3 e isso promove sua associação com a proteína adaptadora APPL1/DIP13 α e com a caspase-9, resultando na cascata de ativação de caspase-9 - caspase-3 (FORCET *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2002); ou (ii) PTCH1, desencadeia a apoptose através da formação de um complexo ativador de caspase-9, constituído por um adaptador citosólico denominado FHL2/DRAL, um recrutador de caspases (CARD) contendo proteínas TUCAN e por caspase-9 (MILLE *et al.*, 2009; FOMBONNE *et al.*, 2012; LUCHINO *et al.*, 2013).

1.2.2 Morte celular dependente de autofagia

Autofagia é um termo geral para o processo celular que resulta na degradação do material citoplasmático dentro do lisossomo (LEVINE & KROEMER, 2008; LIN & BAEHRECKE, 2015; GOMES *et al.*, 2017). Durante a autofagia, uma gama diversificada de biomoléculas (proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos), organelas e até patógenos intracelulares podem ser degradados (RABINOWITZ & WHITE, 2010; WILEMAN, 2013; KAUR & DEBNATH, 2015). Os produtos resultantes da degradação são liberados no citoplasma e ocorre sua reutilização no metabolismo celular (RABINOWITZ & WHITE, 2010; ESKELINEN, 2011; KAUR & DEBNATH, 2015).

Com base na forma de entregar uma carga citoplasmática ao lisossomo, a autofagia é classificada em macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (GOMES *et al.*, 2017). A macroautofagia (posteriormente mencionada como autofagia) é caracterizada pela entrega dentro de vesículas de membrana dupla denominada autofagossomos (ZHANG & BAEHRECKE, 2015). Na microautofagia, o processo de entrega de carga a ser degradada ocorre diretamente pelo rearranjo local da membrana lisossomal (OKU *et al.*, 2017). Na autofagia mediada por chaperona, as proteínas substratos são identificadas e transportadas por complexos de chaperonas presentes na membrana do lisossomo (ORENSTEIN & CUERVO, 2010; KAUSHIK & CUERVO, 2012; LIN & BAEHRECKE, 2015; BOYA *et al.*, 2013; OKU *et al.*, 2017).

A autofagia desempenha importantes papéis fisiológicos na saúde humana e também na doença (MIZUSHIMA *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2017). O nível basal e constitutivo da autofagia contribui com a homeostase celular através da eliminação de organelas danificadas/envelhecidas, mantendo assim, o controle de qualidade dos

componentes celulares essenciais (ESKELINEN, 2011). Entretanto, quando as células enfrentam alguma forma de estresse ambiental, como a inanição de nutrientes, a hipóxia, o estresse oxidativo, a infecção por patógenos, a radiação ou o tratamento anticâncer, os níveis autofágicos aumentam, resultando em adaptação e sobrevivência da célula; no entanto, a autofagia induzida insuficientemente ou de forma excessiva pode levar à morte celular (YANG & KLIONSKY, 2010; ESKELINEN, 2011; SHEN & CODOGNO, 2011; FRANKEL *et al.*, 2012).

Estudos em leveduras identificaram mais de 30 proteínas relacionadas à autofagia (Atgs), seguido da identificação de homólogos em eucariotos superiores (HE & KLIONSKY, 2009; NAKATOGAWA, Hitoshi *et al.*, 2009; YANG & KLIONSKY, 2010; KAUR & DEBNATH, 2015). Estas proteínas participam de uma série de rearranjos dinâmicos da membrana controlando o processo de autofagia, além de serem essenciais na biogênese do autofagossomo (XIE & KLIONSKY, 2007; ESKELINEN, 2011; BOYA *et al.*, 2013; KAUR & DEBNATH, 2015). Em leveduras, todos os autofagossomos surgem a partir de uma estrutura específica denominada estrutura preautofagossomal (PAS). Em eucariotas superiores, não há evidências da estrutura PAS e as membranas de isolamento podem ser geradas simultaneamente em diferentes locais (ZHANG & BAEHRECKE, 2015).

Já é conhecido que Atg1 desempenha um papel essencial na indução de autofagia (CHAN & TOOZE, 2009; CHANG & NEUFELD, 2009). Além disso, a autofagia é promovida pela proteína cinase ativada por AMP (AMPK), a qual atua como um sensor energético, regulando o metabolismo celular de acordo com as variações na disponibilidade de nutrientes (KIM *et al.*, 2011; HARDIE *et al.*, 2012). Por outro lado, a autofagia é inibida pela proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), um regulador central de crescimento celular que integra fator de crescimento e sinais de nutrientes (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2011).

A mTOR faz parte do núcleo catalítico de dois complexos proteicos distintos denominados mTORC1 (contendo mTOR, GβL, PRAS40 e raptor) e mTORC2 (formado por mTOR, GβL, mSin1, rictor). No entanto, apenas o complexo mTORC1 é capaz de regular negativamente a autofagia (BENJAMIN *et al.*, 2011). Quando ativado por sinalização do fator de crescimento, altos níveis de nutrientes ou de energia, mTORC1 inibe a autofagia por fosforilação da Atg1, chamada ULK1 em mamíferos. Por outro lado, a mTORC1 está inativa quando o nível de energia é baixo, os nutrientes não estão disponíveis, ou a sinalização do fator de crescimento é reduzida, resultando na degradação

de componentes citoplasmáticos via indução do processo autofágico (ESKELINEN, 2011; BOYA *et al.*, 2013). Estes distúrbios metabólicos são geralmente detectados por AMPK, que responde a um aumento na relação AMP/ATP, por meio da fosforilação direta da ULK1 e, indiretamente, pela inibição da mTOR (PIETROCOLA *et al.*, 2013).

Conforme ilustrado na Figura 5, as etapas no processo autofágico incluem: iniciação; nucleação de vesículas; alongamentos vesiculares; maturação ou fusão de vesículas; e degradação dos componentes autofagocitados (YANG & KLIONSKY, 2010; ZHANG *et al.*, 2013). A iniciação requer ativação do complexo ULK1/Atg1, formado por ULK1/ULK2 associada à Atg13, FIP200 e Atg101. A nucleação de vesículas é mediada pelo complexo PI3K classe III, composto pelas proteínas VPS34, ATG14, UVRAG e AMBRA1 regulada por BECN1, todos os quais são encapsulados por um supressor de tumor, Beclin-1. O complexo Atg5-Atg12 se liga à Atg16 formando o complexo Atg5-Atg12-Atg16 o qual permite o alongamento da membrana do autofagossomo e a proteína LC3 é conjugada ao fosfatidiletanolamina (PE) e recrutados para a membrana. Pela ação da Atg4B, em conjunto com Atg7, a LC3I é conjugada ao PE resultando na LC3II. Em seguida, na etapa de maturação, a proteína SNARE STX17 (syntaxina-17) facilita a fusão do autofagossomo com o lisossomo, resultando em um autofagolisossomo. Em última análise, na etapa de degradação, o baixo pH do lisossomo resulta na degradação do conteúdo dos autofagossomos e os precursores macromoleculares são reciclados ou usados em rotas metabólicas. A proteína LC3II é degradada juntamente com outras proteínas de carga e podem ser usadas como medida do fluxo autofágico (LIANG *et al.*, 1999; RABINOWITZ & WHITE, 2010; RUSSELL *et al.*, 2013; DIAO *et al.*, 2015; LEVY *et al.*, 2017).

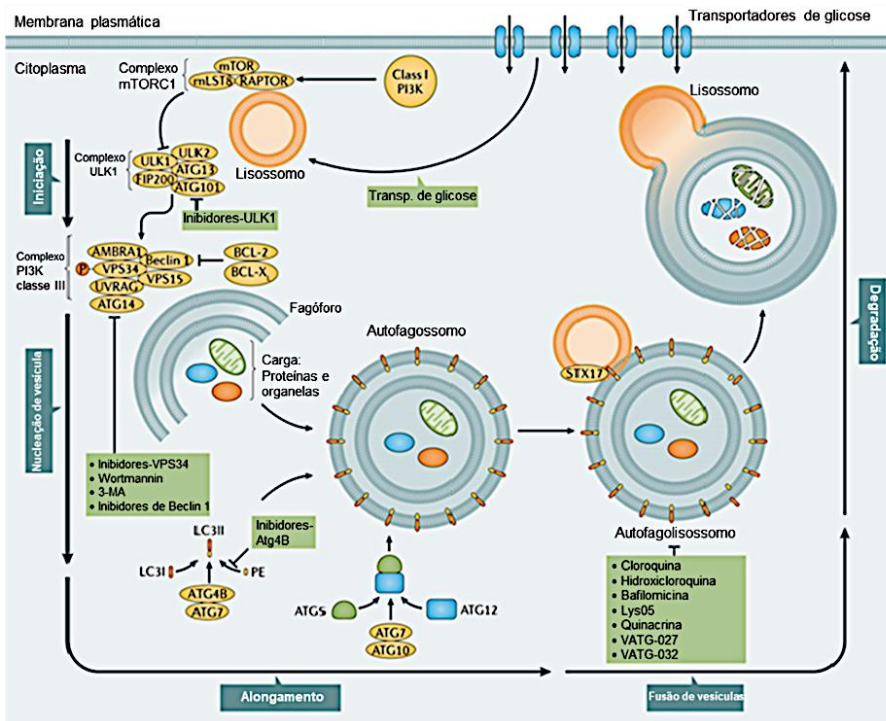


Figura 5 – Etapas da autofagia. Em condições de privações nutricionais, uma diminuição no transporte de glicose impede a ativação de mTOR e assim, sua ação inibitória sobre o complexo ULK1 deixa de atuar. ULK1 ativado, fosforila a Beclin 1, a qual funciona como um andaime para o complexo PI3K, resultando na ativação VPS34 levando a nucleação da vesícula. A interação de BCL-2 e BCL-X com a Beclin 1 reduz sua atividade pró-autofágica, interrompendo a formação do complexo Beclin 1-VPS34 além de diminuir a interação de Beclin 1 com a proteína UVRAG. Em contraste, o complexo PI3K pode ser estabilizado pela ligação de AMBRA1 a Beclin 1. A interação de Beclin 1-VPS34 também pode ser promovida pela ligação de Atg14 e UVRAG a Beclin 1, promovendo a formação do fagóforo. O VPS15 reforça a função VPS34 melhorando a interação de VPS34 com Beclin 1. A membrana dupla sofre alongamento para eventualmente formar o autofagossomo, sendo tal processo dependente de dois sistemas de conjugação. O primeiro sistema envolve a conjugação LC3I citoplasmática com PE gerando a forma lipídica, LC3II, que é facilitada pela protease Atg4B e pela enzima de tipo E1 Atg7, em que LC3II é incorporada na membrana em crescimento. O segundo sistema de conjugação também é mediado por Atg7, bem como pela enzima de tipo E2 Atg10, resultando em um conjugado Atg5-Atg12. Posteriormente, a proteína STX17 facilita a fusão do autofagossomo

com o lisossomo, resultando em um autofagolisossomo onde ocorre a degradação do conteúdo dos autofagossomos. Adaptado de Levy *et al.* (2017).

1.3 GLICOSILAÇÃO

Os quatro componentes básicos das células são proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e glicanos (LOWE & MARTH, 2003). Também referidos como carboidratos, os glicanos constituem os mais abundantes e diversificados biopolímeros da natureza que recobrem a superfície das células formando uma camada conhecida como glicocálice. Estes glicanos são encontrados na forma conjugada denominados como glicoconjugados, como as glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídeos (NIEUWDORP *et al.*, 2008; ERNST & MAGNANI, 2009).

Os glicanos tanto livres como conjugados nas superfícies das células desempenham várias funções como moléculas sinalizadoras, moléculas de reconhecimento e moléculas de adesão celular (VARKI & KORNFELD, 1980; KARIYA & GU, 2011; WITCZAK *et al.*, 20014). Os diferentes tipos de glicanos são sintetizados através do processo de glicosilação de forma ordenada e sequencial envolvendo as especificidades distintas do substrato das enzimas glicosiltransferase e glicosidase (OHTSUBO & MARTH, 2006; VAN KOOYK & RABINOVICH, 2008).

Alterações no padrão de glicosilação têm sido frequentemente associadas com a transformação maligna e progressão do tumor. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez por Meezan e colaboradores, em 1969, com a demonstração de que os fibroblastos saudáveis possuem glicoproteínas de membrana menores do que as encontradas nas células cancerosas. Desta forma, o padrão de glicosilação de uma célula é considerado como um código para a fisiologia celular (DUBE & BERTOZZI, 2005; FREEZE, 2006; PINHO & REIS, 2015). As informações armazenadas na estrutura dos glicanos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são decodificadas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (LIU & RABINOVICH, 2005; GHAZARIAN *et al.*, 2011; LICHTENSTEIN & RABINOVICH, 2013).

1.4 LECTINAS

As lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas capazes de reconhecer e se ligar seletivamente, de forma reversível, a

carboidratos livres ou carboidratos presentes em glicoconjugados (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

A ocorrência das lectinas é ampla na natureza, sendo encontradas em todas as classes e famílias dos organismos vivos, desde micro-organismos até animais vertebrados, invertebrados e plantas (SHARON & LIS, 1994). Com a introdução da técnica da cromatografia de afinidade para purificação de lectinas, no início dos anos 70, o ritmo de isolamento de lectinas foi impulsionado e numerosas lectinas se tornaram disponíveis. Nessa mesma década, foram intensificados os estudos das propriedades moleculares de lectinas individuais, sendo possível avançar na compreensão das suas estruturas moleculares. O grupo de pesquisa liderado por Edelman, e de forma independente Karl Hardman e Clinton Ainsworth, desenvolveram trabalhos com cristalografia de raios X de alta resolução, revelando a estrutura primária e tridimensional de diversas lectinas, o que colaborou para pontuar as diferenças estruturais destas moléculas e correlacionar com sua atividade biológica (SHARON & LIS, 2004). Em 1988, Kurt Drickamer, com base nas análises das sequências de aminoácidos de lectinas, propôs que a atividade de ligação a carboidratos reside num segmento da cadeia designado por ele como domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD). Esse conjunto de estudos revelou que as lectinas diferem entre si quanto a sequência de aminoácidos, ao requerimento de metais, ao peso molecular e à estrutura tridimensional, porém compartilham a presença de, pelo menos, um sítio específico de ligação a carboidratos (SHARON & LIS, 2004).

Muitos estudos foram, e vêm sendo realizados, a respeito do papel fisiológico das lectinas; levantando argumentos moleculares, bioquímicos, celulares e evolucionários apontando que elas possuem um papel na defesa da planta, e sustentando a hipótese da função de reconhecimento celular (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; SHARON & LIS, 2004). O maior argumento desse papel é a observação da capacidade das lectinas de se ligarem a glicoconjugados de outros organismos. Além de as lectinas de plantas serem capazes de se ligarem a carboidratos simples como a glicose, manose e galactose, elas apresentam ainda, uma grande afinidade por oligossacarídeos, dentre os quais são incomuns ou totalmente ausentes nas plantas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

As lectinas encontradas nas plantas têm sido identificadas e purificadas de folhas, frutos, raízes, tubérculos, rizomas, sementes bulbos, cascas, caules (PEUMANS *et al.*, 1985; VAN DAMME *et al.*, 1996). As lectinas de plantas podem ser utilizadas com facilidade e com baixo custo, sendo que, algumas lectinas primeiramente foram utilizadas

como ferramentas para diferenciar tumores malignos de tumores benignos, bem como o grau de glicosilação associado à metástase (FU *et al.*, 2011). Nos últimos anos, essas lectinas têm sido bem conhecidas por demonstrarem atividades antitumorais, incluindo indução de apoptose e de autofagia (LI *et al.*, 2009).

A classificação das lectinas de plantas de acordo com suas diferentes especificidades de ligação a carboidratos compreende 12 famílias distintas: (i) aglutinina homóloga de *Agaricus bisporus*; (ii) amarantinas; (iii) homólogos de quitinase classe V; (iv) família cianovirina; (v) família *Euonymus europaeus*; (vi) família GNA; (vii) proteínas com domínios de heveína; (viii) jacalina; (ix) família das leguminosas; (x) domínio motivo de lisina; (xi) família *Nicotiana tabacu*; e (xii) família de ricina-B (FU *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2015). Entre as 12 famílias de lectinas de planta mencionadas acima, a família de lectinas de leguminosas é bem conhecida por suas funções biológicas, tais como atividades antitumorais, antifúngicas e antivirais (FU *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011).

1.4.1 Lectinas de leguminosas

As sementes de leguminosas, como ervilhas e feijões, representam uma rica fonte de lectinas. As lectinas da família de Leguminosae/Fabaceae são o grupo de lectinas vegetais mais bem estudadas e representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A subtribo Diocleinae, da família Leguminosae, engloba os 13 principais gêneros dessas lectinas, dentre os quais se destacam os da *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (CAVADA *et al.*, 2001; SHARON, 2007; KONOZY *et al.*, 2003).

A descoberta de Peter C. Nowell, em 1960, mostrando que a lectina do feijão-vermelho (*Phaseolus vulgaris*), conhecida como fitohemaglutinina (PHA), possui a capacidade de estimular linfócitos a sofrerem mitose, juntamente com a demonstração, feita por Joseph C. Aub, em 1965, de que a aglutinina de *Triticum vulgaris* (WGA) aglutina preferencialmente as células malignas, foram importantes pois revelaram o potencial modulatório das lectinas sobre as células animais (SHARON & LIS, 2004).

A primeira lectina cristalizada, que foi denominada por James B. Sumner, em 1919, como Concanavalina A (ConA), foi isolada da semente extraído da *Canavalia ensiformis* e protagonizou o campo de pesquisa na área. ConA foi a primeira lectina cuja sequência primária foi

estabelecida, e mais tarde, a primeira lectina com a estrutura tridimensional definida por cristalografia de raios-x (SHARON & LIS, 2004). ConA é uma lectina que demonstra ser específica aos monossacarídeos D-manose e D-glicose, cada um dos seus monômeros é composto por 237 resíduos de aminoácidos. Seus monômeros possuem dois sítios de ligação altamente conservados para íons Ca^{2+} e Mn^{2+} os quais são essenciais para estabilização da proteína e coordenação das moléculas de carboidratos (CAVADA *et al.*, 2001; KAUSHIK *et al.*, 2009; ABHILASH *et al.*, 2013).

Ao longo dos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que a lectina ConA pode apresentar atividades antiproliferativas sobre diversas linhagens de células cancerosas, dando perspectivas de uma aplicação antitumoral para essa lectina (FU *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2015). Pratt e colaboradores (2012) mostraram a capacidade de ConA de induzir autofagia em células de glioblastoma. A exposição à ConA resultou no aumento da expressão de BNIP3 e dos genes relacionados à autofagia Atg13, Atg12 e Atg16, via modulação de metaloproteinase de matriz tipo-1 (MT1-MMP) (PRATT *et al.*, 2012). Além disso, o tratamento com ConA induziu um aumento na expressão de COX-2 e foi correlacionado com uma redução no nível de AKT fosforilada, sugestivo de morte celular (SINA *et al.*, 2010; PRATT & ANNABI, 2014).

Estudo prévios, realizados em nosso grupo de pesquisa, verificaram o potencial antitumoral promovido pelas lectinas dos gêneros Dioclea e Canavalia, incluindo ConV (*Canavalia virosa*), CaBo (*Canavalia bonariensis*), DLL (*Dioclea lasiocarpa*) e DlyL (*Dioclea lasiophylla*). Primeiramente, foi demonstrado que a ConV induz autofagia em células de glioma C6, bem como reduz a viabilidade e migração celular. Posteriormente, foi demonstrado que a DLL, em baixas concentrações, além de reduzir a viabilidade celular e induzir autofagia promove a ativação da caspase-3. Esses mesmos efeitos foram observados nas lectinas CaBo e DlyL, porém com potenciais diferentes em relação à autofagia e apoptose. Por fim, as lectinas ConV, CaBo, DLL e DlyL reforçaram o potencial antitumoral das lectinas de leguminosas específicas à glicose/manose (NASCIMENTO *et al.*, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017; CAVADA *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2018).

1.4.2 ConGF

A *Canavalia grandiflora* é uma planta do grupo das angiospermas de ocorrência predominante em ambientes secos (Figura 6). É uma espécie presente na flora do Brasil principalmente no Cerrado, com

floração de abril a maio e frutificação de julho a novembro. Pertence à família Fabaceae/Leguminosae, Tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae (MANN *et al.*, 2001; VARELA *et al.*, 2004; SNAK *et al.*, 2011; QUEIROZ *et al.*, 2015; TOZZI, 2016). As plantas são usadas para forragem animal e as sementes são utilizadas como fonte de lectina (NAPIMOGA *et al.*, 2011).

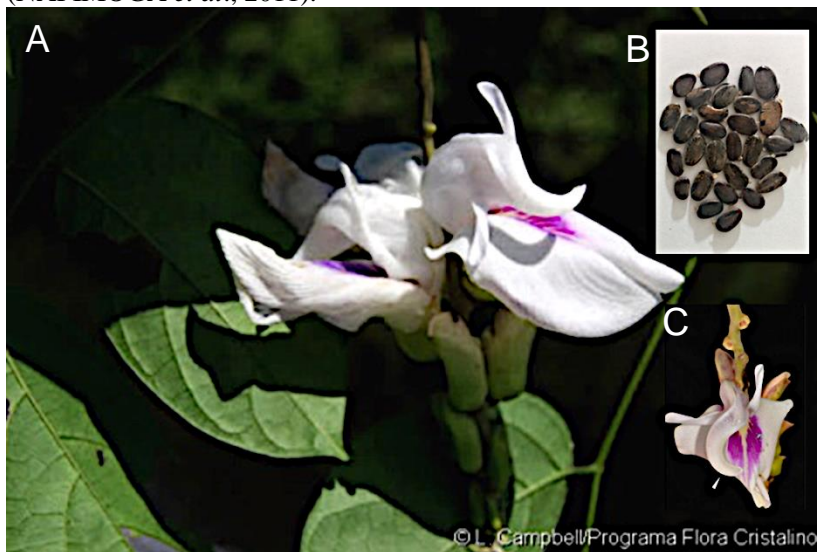


Figura 6 – Flor (painel A) e sementes (painel B) de *Canavalia grandiflora*. A seta na imagem destaca a quilha com o ápice espiraladamente infletido (painel C). Fonte: Neotropical Plants (www.kew.org); acesso em 20/03/2018. Sementes: foto enviada Prof. Benildo S. Cavada.

A ConGF é uma lectina isolada das sementes de *Canavalia grandiflora*, composta por 237 aminoácidos. Apresenta alta similaridade estrutural com a ConA (91%) e a mesma especificidade por glicose/manose. Entretanto, a estrutura de ConGF (Figura 7) revela quatro modificações únicas (Ile₃₇, Ala₄₈, Thr₁₆₄ e Thr₂₂₀) que a difere com relação a lectinas do tipo ConA. O sítio de ligação a metal para cátions divalentes, como Ca²⁺ e Mn²⁺ é altamente conservado na estrutura da lectina ConGF, assim como o sítio de ligação a carboidratos, semelhante aos presentes nas lectinas de leguminosas. ConGF foi analisada por espectrometria de massa e por cristalografia de raio-x revelando suas estruturas primária e tridimensional, as quais foram depositadas em bancos de dados, como o Protein Data Bank (PDB) (CECCATTO *et al.*, 2002; SIMÕES *et al.*, 2012; BARROSO-NETO *et al.*, 2014).

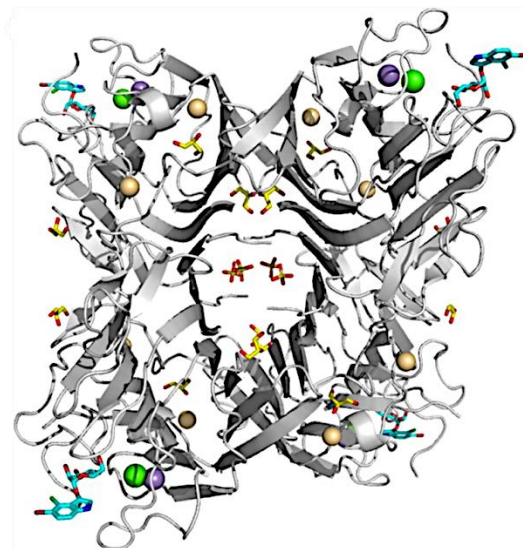


Figura 7 – Estrutura geral da lectina ConGF. O arranjo tetramérico de ConGF está em cor cinza. Os ligantes estão representados em esferas, verdes, roxas e douradas que respectivamente representam os ions cálcio, manganês e cádmio. Adaptado de Barroso-Neto *et al.* (2014).

Estudos demonstraram que a lectina ConGF possui uma importante atividade anti-inflamatória. De acordo com Nunes *et al.* (2009) esta lectina foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, em associação à redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β . Além disso, ConGF induziu o relaxamento em segmentos de aorta endotelizadas de ratos (BARROSO-NETO *et al.*, 2014). No entanto, na literatura não há estudos que avaliaram o potencial efeito antitumoral de ConGF em modelos de gliomas.

2 JUSTIFICATIVA

GBM é um tumor extremamente agressivo de baixa sobrevida e possui poucas alternativas de tratamento. Atualmente, o tratamento para GBM considerado mais efetivo é constituído de varias modalidades terapêuticas combinadas, como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (Dunn *et al.*, 2012), porém, a taxa de sobrevivência dos pacientes com GBM raramente ultrapassa 14 meses após o diagnóstico da doença. Vários obstáculos têm sido identificados no tratamento

quimioterápico, limitando sua eficácia, esses incluem a presença de efeitos colaterais (BRANDES *et al.*, 2008; BIELAMOWICZ *et al.*, 2013; SANA *et al.*, 2014) e mecanismos de resistência das células tumorais (HOLOHAN *et al.*, 2013). Portanto, é extremamente importante o desenvolvimento de pesquisas no sentido de buscar novos compostos e estratégias capazes de interagirem, com alta especificidade, sobre células de tumores malignos do SNC.

Neste contexto, as lectinas extraídas de plantas, são proteínas que apresentam potencial para serem utilizadas como agentes antitumorais, devido a sua especificidade sobre resíduos de açúcares presentes em tumores. A literatura mostra que esse potencial vem sendo grandemente explorado através de estudos experimentais que verificaram a ação antitumoral de lectinas. Entre elas, a mais estudada é a ConA, uma lectina de leguminosa com especificidade para glicose/manose, que apresentou atividade de indução de autofagia e antiproliferativa sobre células tumorais, inclusive gliomas (LIU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; ROY *et al.*, 2014). Da mesma forma, foi demonstrado pelo nosso grupo, que as lectinas da subtribo Diocleinae como a ConV, CaBo, DLL e DlyL possuem uma ação citotóxica sobre células C6, sugerindo um potencial antitumoral.

Devido à busca por novas terapias, associado ao fato de que as lectinas apresentam eficácia e especificidade em alguns modelos de tumores; nossa proposta nesse trabalho foi investigar a ação da lectina ConGF isolada da espécie *Canavalia Grandiflora*, presente na biodiversidade brasileira, sobre a linhagem de glioma C6.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antitumoral da lectina extraída das sementes da *Canavalia grandiflora* (ConGF) em culturas de células de glioma da linhagem C6.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar o efeito citotóxico da lectina ConGF em células de glioma da linhagem C6;
- Analisar o efeito da lectina ConGF sobre a morfologia das células por microscopia óptica;

- Analisar a capacidade de migração/proliferação celular após os tratamentos com a ConGF;
- Analisar o efeito de ConGF sobre o potencial de membrana mitocondrial;
- Caracterizar a indução de morte celular pela ConGF em culturas celulares de glioma;
- Investigar se a ConGF é capaz de modular o processo autofágico em células de glioma da linhagem C6.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTURA CELULAR DE GLIOBLASTOMA C6 DE RATO

As células C6 de glioblastoma de rato Wistar (*Rattus norvegicus*) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (Brasil). As células foram cultivadas em garrafas de cultivo com 25 cm² de área de crescimento, com meio nutritivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 10 U/ml de penicilina, incubadas em estufa a 37°C com atmosfera umidificada de 95% de O₂ e 5% de CO₂. A troca do meio foi realizada a cada dois dias, até as células atingirem a confluência de 80% para serem replicadas com tripsina. Para a realização dos experimentos, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS: NaCl 8g/L; KCL 0,2g/L; Na₂HPO₄ 1,44g/L; KH₂HPO₄ 0,24g/L; H₂O 1L) e dissociadas quimicamente (1,5 ml de tripsina/5 min), seguido de inativação da tripsina com 1,5 ml de meio de cultivo e centrifugação (1200 rpm/5 minutos). O precipitado celular foi ressuspensão com 3 ml de meio e a concentração celular determinada por contagem em câmara de Neubauer. Após a 3^a passagem, as células foram utilizadas para a realização dos experimentos, no limite de uso até a 12^a passagem.

4.2 PURIFICAÇÃO DA LECTINA ConGF

A lectina de *Canavalia grandiflora* foi obtida de acordo com os métodos descrito por Ceccato (2010), no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol) coordenado pelo Prof. Dr. Benildo Cavada. A ConGF foi isolada por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50, e sua pureza avaliada através de eletroforese em gel de poliácridamida na presença de SDS. A proteína liofilizada e purificada foi enviada ao nosso laboratório para avaliação dos efeitos biológicos.

4.3 DILUIÇÃO E BLOQUEIO DE ConGF

A lectina foi dissolvida de forma estéril em tampão HEPES-salina sem glicose composto por NaCl a 124 mM, KCl a 4 mM, MgSO₄ a 1,2 mM, HEPES a 25 mM, CaCl₂ a 1 mM, pH 7,4, armazenada a -20°C, e utilizada para o preparo das concentrações a serem testadas por diluição em meio de cultivo no momento do tratamento. Para verificar o papel do domínio lectínico sobre a atividade de ConGF, esta lectina foi dissolvida também de forma estéril em tampão HEPES-salina

sem glicose, contendo 0,1 M de seu açúcar ligante específico (α -metil-D-manosídeo) e mantida durante 30 minutos a 37°C antes do tratamento.

4.4 TRATAMENTO CELULAR

As células C6 foram semeadas em placas de 6, 24 ou 96 poços com meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, 95% de O₂ e 5% de CO₂ por 24 horas. Antes da adição da lectina, a placa foi observada ao microscópio invertido de forma a avaliar a aderência e a confluência (aproximadamente 80%) das células. Após a confluência, o meio de cultura foi substituído por meio fresco e acrescido de veículo (controle) ou lectina ConGF nas concentrações de 10, 30, 50 ou 100 µg/mL e incubadas em estufa dentro das mesmas condições anteriores por 3, 6, 12, 24 ou 48 horas dependendo do tempo de tratamento.

4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular das células após a exposição à ConGF foi avaliada pelo método colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), proposto por Tim Mosmann (1983). O MTT é convertido em um formazan púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. O formazan púrpura determinado é proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

As células C6 foram semeadas em placas de 96 poços, em uma densidade de 50.000 células/mL. Ao completar o tempo de tratamento, o meio foi removido e substituído por 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão HBSS). As placas foram incubadas por 1 h a 37°C. Em seguida, foi retirada a solução de MTT e adicionaram-se 100 µL de DMSO em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. Após um período de 30 min de incubação em ausência de luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Multileitora SpectraMax Paradigm) no comprimento de onda de 540 nm.

Os valores obtidos por meio da leitura de absorbância foram transformados em porcentagens de viabilidade celular, em relação à média dos controles celulares, considerados como equivalente a 100% de células viáveis. Para este ensaio, foram utilizados 4 crescimentos celulares distintos (n=4), medidos em triplicata.

Os resultados, expressos em porcentagem de viabilidade referente às diferentes concentrações de ConGF utilizada nos tratamentos, foram

plotados em gráfico. Este procedimento foi realizado usando o Software de análises estatísticas GraphPad Prism, versão 6.0.

4.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA

Para análise da morfologia celular foi observado a presença dos prolongamentos citoplasmáticos, a espessura desses prolongamentos e o formato celular, após o tratamento com a ConGF. Na sequência foi realizada a captura de imagem com câmera digital acoplada a microscópio invertido (Nikon Eclipse T2000-U). As células foram semeadas em placas de 96 poços, em uma densidade de 50.000 células/mL, e após 24 h, incubadas com veículo (tampão HEPES-salina sem glicose) ou ConGF nas concentrações 10, 30, 50 ou 100 µg/mL por 6, 12, 24 ou 48 horas, efetuando-se a captura da imagem após o tempo de tratamento.

4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

A proliferação das células C6 após o tratamento com ConGF foi avaliada através do método de exclusão do azul de tripan (WEISENTHAL *et al.*, 1983; GONÇALVES *et al.*, 2013). As células de glioma de rato foram semeadas em placas de 96 poços, onde foram semeadas 5×10^3 células por poço com meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Ao atingirem confluência, as células foram tratadas com ConGF nas concentrações 10, 30, 50 ou 100 µg/mL, por 24, 48 ou 72 horas. No final do tratamento, o meio foi removido. Em seguida, as células foram lavadas 1x com 100 µL de PBS e depois foram adicionados 50 µL de uma solução 0,05% tripsina/EDTA para desprender as células, que foram imediatamente contadas em câmara de Neubauer com adição de azul de tripan, para exclusão das células inviáveis. A proliferação celular foi determinada pelo número de células viáveis, os valores coletados foram representados como médias \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.8 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Para avaliar os possíveis efeitos do tratamento com ConGF sobre alterações na migração celular, foi realizado o método de *scratch* (LIANG *et al.*, 2007; YELSKAYA *et al.*, 2013), com adaptações. Esse método consiste em avaliar a capacidade migratória após a remoção de uma camada de células aderentes da placa de cultura. Para tanto, as células C6

foram semeadas em placas de 24 poços, com meio DMEM suplementado com 10% de SFB, em densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço, e incubadas por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura celular foi removido e com o auxílio de uma ponteira de 200 μL foi realizado um risco no centro de cada cavidade da placa. A placa foi lavada com PBS para a retirada de células soltas, e então foi adicionado novo meio de cultura isento de soro, contendo veículo ou ConGF nas concentrações de 20, 25 ou 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A placa foi mantida em estufa a 37°C , com 5% de CO_2 . As imagens foram capturadas logo depois dos riscos serem feitos, considerado como tempo 0 hora. O experimento foi acompanhado durante 48 horas, e durante este período, foram capturadas fotos pontuais em 24 ou 48 horas com a utilização da técnica de microscopia óptica convencional e do equipamento Nikon Eclipse T2000-U. Cada medição foi aferida a partir da borda esquerda para a borda direita, indo de cima para baixo da imagem usando o Zen 2.3 lite. A média da largura das lacunas foi expressa em unidades arbitrárias de número de pixels.

4.9 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi\text{M}$) COM OS INDICADORES FLUORESCENTES JC-1 E TMRE

O potencial da membrana mitocondrial, após o tratamento com ConGF em diferentes concentrações (10, 30, 50 ou 100) $\mu\text{g}/\text{mL}$, foi mensurado pela utilização das sondas fluorescentes: (i) iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianeto (JC-1) e (ii) tetrametilrodamina etil ester (TMRE).

4.9.1 Ensaio de JC-1

Após o tratamento com a ConGF, as células foram submetidas à técnica com a sonda fluorescente catiónica lipofílica JC-1 (COSSARIZZA *et al.*, 1993). Para este experimento, 50.000 células/mL foram semeadas em placas de 96 poços, e após atingirem confluência, foram tratadas com a lectina e incubadas por 3 horas. Para cada ensaio, foi incluído o controle positivo FCCP (carbonil cianeto de p-trifluorometoxi fenilhidrazona, 10 mM) um translocador de prótons, que promove o colapso do potencial de membrana mitocondrial, sendo dissolvido em tampão HEPES-salina e incubado por 1 hora. Transcorridos estes períodos de incubação, os poços foram lavados 1x com PBS, e as células marcadas com uma solução de coloração JC-1 durante 20 minutos a 37°C , na ausência de luz. Em seguida, as células

foram lavadas 2x com PBS, e novamente ressuspensas em PBS. A leitura de emissão de fluorescência foi realizada em leitor de placa (Multileitora SpectraMax Paradigm); para a fluorescência vermelha, excitação de 488nm e emissão de 590 nm, e para fluorescência verde, excitação de 488nm e emissão de 525 nm. As placas foram observadas e fotografadas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse T2000-U). A determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada através da razão entre a fluorescência vermelha e a verde. Células sem tratamento foram utilizadas como grupo controle negativo (100% potencial de membrana mitocondrial) e o FCCP foi utilizado como controle positivo.

4.9.2 Ensaio de TMRE

O $\Delta\Psi_m$ é crítico para manter a função fisiológica da cadeia respiratória para gerar ATP. Uma perda significativa do $\Delta\Psi_m$ torna as células esgotadas de energia, levando a sua subsequente morte (JOSHI & BAKOWSKA, 2011). A sonda TMRE é um indicador fluorescente, permeável às células, que se acumula dentro das mitocôndrias ativas devido a sua carga negativa. Mitocôndrias despolarizadas ou que perderam sua função possuem o potencial de membrana menor, deixando de sequestrar o TMRE. Assim, uma diminuição da intensidade de fluorescência desta sonda indica uma maior despolarização da membrana mitocondrial ou inatividade desta organela. Para garantir que as mudanças no sinal do corante não fossem devidas as mudanças na morfologia ou massa mitocondrial (PERRY *et al.*, 2011) foi realizado o ensaio com TMRE no tempo de 3 horas, pois nesse tempo não houve redução da viabilidade celular (verificado através do teste do MTT). Para isso, as células foram semeadas em placas de 96 poços, em uma densidade de 50.000 células/mL. Após o tempo de tratamento de 3 horas, o meio foi substituído por 100 μ L de uma solução de TMRE (10 nM). As placas foram incubadas durante 20 minutos a 37°C na ausência de luz (EHRENBERG *et al.*, 1988; EGEE *et al.*, 2007). Os poços foram lavados 1x com PBS, para remoção do corante não ligado, seguido da adição de 100 μ L/poço desse mesmo tampão. As placas foram imediatamente levadas para leitura de emissão de fluorescência em leitor de placa (Infinite M200 TECAN). A intensidade de fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de 550 nm de excitação e 590 nm de emissão. Os valores da fluorescência foram expressos como uma porcentagem do controle (veículo) considerado como 100%.

4.10 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

4.10.1 Ensaio com Laranja de acridina

A laranja de acridina (LA) é um corante fluorescente catiônico que se acumula em organelas ácidas de maneira dependente de pH. Em pH ácidos, a laranja de acridina sofre modificações físico-químicas e passa a emitir fluorescência no espectro laranja. O aumento das organelas vesiculares ácidas (AVOs) sugere a ocorrência de autofagia, uma vez que autofagossomos e autofagolisossomos são organelas ácidas. Desta forma, para estudar o padrão de morte celular e indução de AVOs pela ConGF, após 24 ou 48 horas de incubação foi realizado o ensaio com LA em quatro experimentos independentes, realizados em triplicata (LEAL *et al.*, 2018). As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas. Decorridos 24 ou 48 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas com LA (10 $\mu\text{g/mL}$, Sigma Chemicals, EUA) por 20 minutos a 37°C na ausência de luz. As células foram analisadas sob um microscópio invertido de fluorescência (Nikon Eclipse T2000-U) utilizando conjuntos de filtros, 470 nm excitação e 525 nm emissão com a cor verde para análise da integridade da cromatina, e 350 nm excitação e 615 nm emissão com cor vermelha para análise dos AVOs. A fim de quantificar a presença de AVOs, as imagens foram analisadas através do software ImageJ. Os valores da fluorescência foram convertidos em porcentagens da média de fluorescência de AVOs (vesículas ácidas, em vermelho) pela média de CR (cromatina, em verde), e comparadas às porcentagens de cada tratamento em relação à média dos controles celulares.

4.10.2 Ensaio de detecção de necrose

Para caracterizar o tipo de morte celular recorreu-se à dupla marcação com Hoechst e Iodeto de propídeo (IP) (GIL-AD *et al.*, 2004). O marcador nuclear fluorescente IP é uma sonda utilizada para evidenciar os fenômenos típicos da morte por necrose, pois é capaz de penetrar em células com a membrana plasmática comprometida, emitindo fluorescência na cor vermelha. O Hoechst é um marcador fluorescente que penetra em células de membrana intacta ou rompida, ligando-se ao DNA, emitindo fluorescência em azul. Para esse experimento foi realizado quatro ensaios independentes, em triplicata. Placas de 96 poços foram semeadas na densidade de 5×10^3 células por poço, e após 24 horas,

as células foram tratadas. Decorrido 24 ou 48 horas de tratamento, o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 15 minutos no escuro com tampão de ligação (composto por 0,01 M de HEPES (pH 7,4), 140 mM de NaCl, 25 mM de CaCl₂), contendo Hoechst (1 g/mL; Sigma Chemicals, EUA) e IP (14 g/mL, Sigma Chemicals, EUA). Em seguida, as células foram analisadas pela técnica de microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse T2000-U) utilizando conjuntos de filtros, 488 nm excitação e 560 nm emissão para IP e 353 nm excitação e 483 nm emissão para Hoechst. As imagens capturadas foram analisadas através do software ImageJ, e a fluorescência foi quantificada. Os valores obtidos foram transformados na razão entre a média de fluorescência das células IP positivas pela média de fluorescência das células Hoechst positivas (IP/Hoechst), e comparadas às porcentagens de cada tratamento em relação à média dos controles.

4.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LC3

Com o intuito de verificar uma possível indução do processo autofágico pela ConGF em células de glioma C6, foi realizada uma análise da expressão da proteína LC3, a qual está relacionada com a indução de autofagia, por meio do ensaio de *western blot*.

4.11.1 Preparação dos extratos celulares

Uma população de 3×10^5 células C6 foi semeada em placa de cultura de 6 poços, contendo meio de cultura DMEM por 24 horas. Ao atingirem confluência, as células foram tratadas com ConGF (10 ou 30 $\mu\text{g/mL}$) ou veículo (tampão HEPES-salina sem glicose) e incubadas em estufa de CO₂ por 12 horas. Após o período de incubação, as células foram lavadas 1 x com PBS e as amostras foram coletadas utilizando 200 μL de SDS-stopping solution (4% SDS, 2 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 6,8) por poço. Com o auxílio de raspadores (*cell scraper*) as células foram lisadas e descoladas da superfície das placas. Subsequentemente, os extratos celulares foram transferidos para microtubos, previamente identificados, e fervidos por 5 minutos a 100°C. Após agitação em vortéx, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm. Após retirada de alíquotas para dosagem de proteína, as amostras receberam tampão de diluição (40% glicerol, 50 mM Tris, bromo fenol blue) na proporção de 25:100 (v/v) e β -mercaptoetanol (concentração final 8% v/v). O conteúdo de proteína foi quantificado através do método de Lowry modificado

(PETERSON, 1977). Os extratos foram congelados em freezer -80°C até seu uso.

4.11.2 Western Blot

Para a realização da separação de proteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi preparado gel de separação com concentração de 12% (acrilamida/bis-acrilamida) e gel de entrada na concentração de 4%. As amostras foram submetidas à eletroforese utilizando corrente fixa de 15 mA/placa e voltagem máxima de 140V durante aproximadamente 2,5 horas, utilizando-se os tampões superior (glicina 190 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%) e inferior (Tris 50 mM; pH 8,3). Para transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, os géis foram submetidos à eletrotransferência usando um sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm²; 1,5 h) (BJERRUM & HEEGAARD, 1989). Em seguida, a membrana foi lavada em água destilada e corada com Ponceau (0,5% em ácido acético 1%) para visualização das bandas (LOPES *et al.*, 2012). No intuito de bloquear ligações proteicas inespecíficas, as membranas foram incubadas com leite desnatado 5% diluído em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) por 1 hora, à temperatura ambiente sob agitação. No final das incubações, as membranas foram lavadas 3x com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, contendo Tween-20 0,1%) durante 5 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos específicos anti-LC3A/B (1:1000, Cell Signaling), e anti- β -actina (1:2000, Santa Cruz), diluídos em TBS-T Albumina 5%. Para a detecção das proteínas, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários específicos *anti-rabbit* ou *mouse* (conjugados com peroxidase). As imagens foram capturadas através do equipamento Fotodocumentador ChemiDoc MP Bio-Rad. As bandas das proteínas foram quantificadas utilizando o programa Image Lab 5.0. Para comparação dos resultados obtidos foram construídos gráficos no programa GraphPad Prism 6.0.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para *western blot*.

ANTICORPO	MASSA MOLECULAR (PROTEÍNA ALVO)	FABRICANTE (CÓDIGO)	DILUIÇÃO
Anti-LC3A/B	~ 16kDa ~ 14kDa	Cell Signalling (#12741)	1:1000
Anti- β -actina	~ 43kDa	Santa Cruz Biotechnology	1:2000

		(sc-47778)	
Goat anti-mouse IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody	-	Millipore (AP308P)	1:2500
Goat anti-rabbit IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody	-	Millipore (AP132P)	1:5000

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo Teste de Tukey, quando apropriado. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO CITOTÓXICO DE ConGF EM CÉLULAS DE GLIOMA

Inicialmente, investigou-se o potencial citotóxico de ConGF sobre as células C6, através do ensaio de MTT. Para este fim, as células foram tratadas com veículo (controle; HEPES/salina) ou ConGF nas concentrações 10, 30, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$, por 6, 12, 24 ou 48 horas. A Figura 8 demonstra os resultados obtidos para a viabilidade celular após a incubação com a lectina. O tratamento das células com 30, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de ConGF por 6, 12 ou 24 horas, causou uma redução significativa da viabilidade celular. Em contraste, 10 $\mu\text{g/mL}$ de ConGF não causou efeito significativo sobre a viabilidade celular nesses tempos. Entretanto, incubação das células C6 com ConGF por 48 horas induziu uma diminuição marcante e significativa da viabilidade celular em todas as concentrações estudadas (10-100 $\mu\text{g/mL}$).

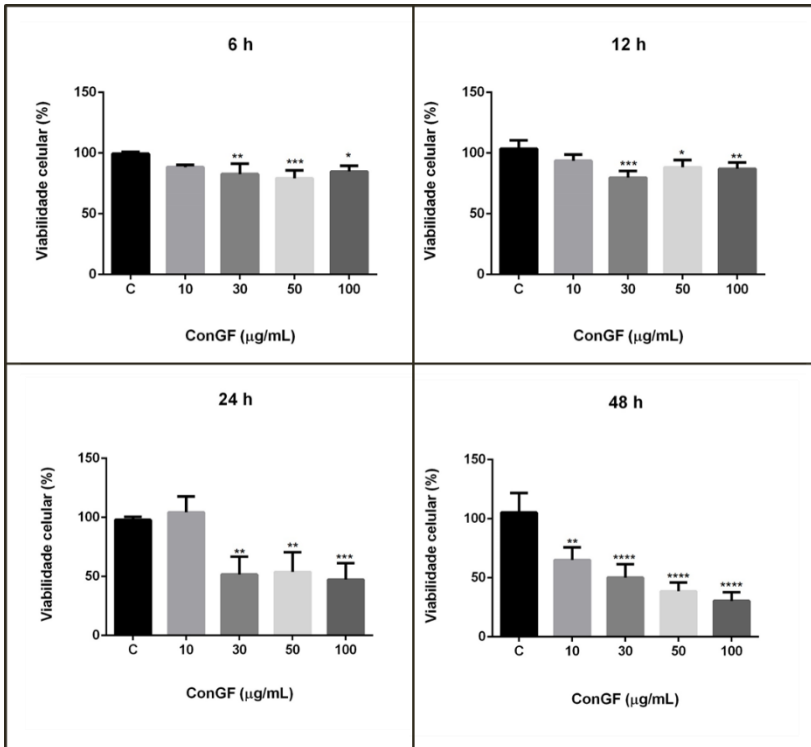


Figura 8 – Efeito de ConGF sobre a viabilidade de células de glioma C6. Células de glioma C6 foram expostas a veículo (HEPES; controle) ou à ConGF (10, 30, 50 ou 100 µg / mL) por 6, 12, 24 ou 48 horas. Após exposição à lectina, a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os dados foram expressos como porcentagem do grupo controle que foi considerado como 100% de células viáveis. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 ou **** p<0,0001, quando comparado ao grupo incubado com veículo (controle).

5.2 ConGF PROVOCA ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS C6

No intuito de avaliar possíveis alterações morfológicas induzidas pela ConGF, as células de glioma C6 foram tratadas com veículo (HEPES; controle) ou com ConGF (10, 30, 50 ou 100 µg / mL) por 6, 12, 24 ou 48 horas. Após as incubações, a morfologia celular foi observada através de microscopia de luz, e em seguida, as fotos foram capturadas. Através da análise das imagens, foi possível observar que as células do

grupo controle exibiram fenótipo tipo fusiforme e íntima distribuição espacial, caracterizando assim as células que são viáveis. Em contraste, em células expostas à ConGF, foram observadas alterações morfológicas induzidas a partir da concentração 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConGF em todos períodos avaliados (6-48 horas). As diferenças na morfologia entre as células tratadas e as do controle foram caracterizadas por perda da morfologia predominantemente fusiforme, arredondamento do corpo celular e descolamento do fundo da placa (Figura 9).

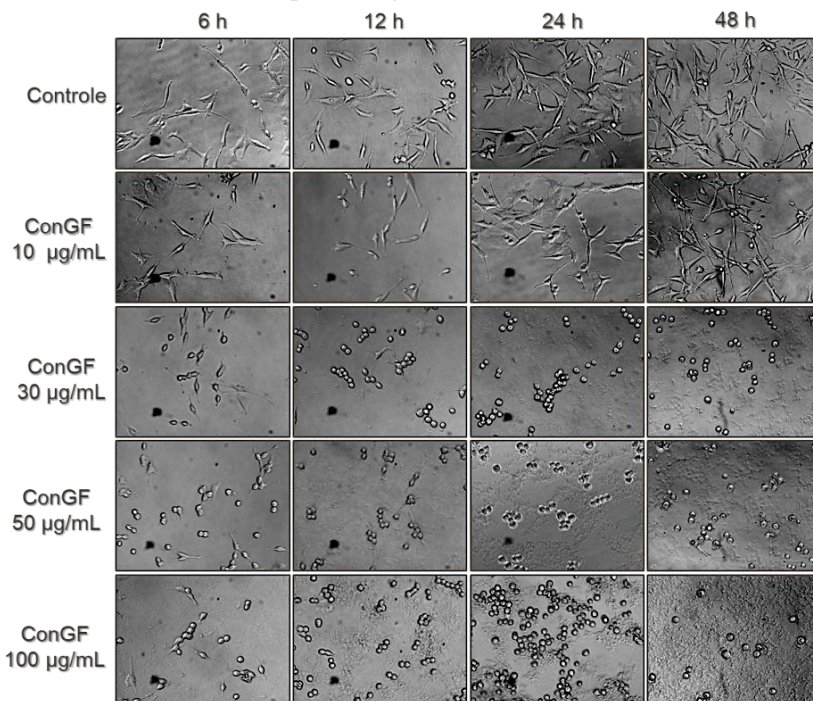


Figura 9 – Alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com ConGF em células de glioma C6. As células foram expostas ao veículo (HEPES; controle) ou à ConGF (10, 30, 50 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 6, 12, 24 ou 48 horas. A morfologia celular foi visualizada por microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U e as imagens em aumento de 20x.

5.3 AVALIAÇÃO DE ConGF NA REDUÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DAS CÉLULAS DE GLIOMA

Depois de identificar o efeito citotóxico de ConGF e sua capacidade de induzir alterações morfológicas em células C6, foi

necessário estudar o efeito da lectina sobre a proliferação celular. Para este fim, as células foram homogenizadas em uma solução de azul de tripan na concentração de 0,02% e as células viáveis, que não incorporaram o corante azul de tripan, foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer.

Conforme demonstrado na Figura 10 (painel A), o tratamento com ConGF promoveu uma diminuição do número de células e perda do fenótipo característico. A densidade celular, ao longo do tempo, apresentou comportamentos diferentes, dependendo da concentração da lectina. A proliferação celular nas primeiras 24 horas foi modesta e similar tanto no controle como nas células tratadas. A partir de 48 horas pôde ser verificado que o tratamento com 30, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de ConGF, promoveram uma diminuição contínua e significativa do número de células viáveis, quando comparado ao controle (Figura 10, painel B). A baixa concentração de ConGF (10 $\mu\text{g/mL}$) teve um efeito modesto, significativo apenas em 48 h. Dessa maneira, pode ser concluído que células de glioma C6 expostas às concentrações de 30, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de ConGF, apresentam uma diminuição de sua densidade celular.

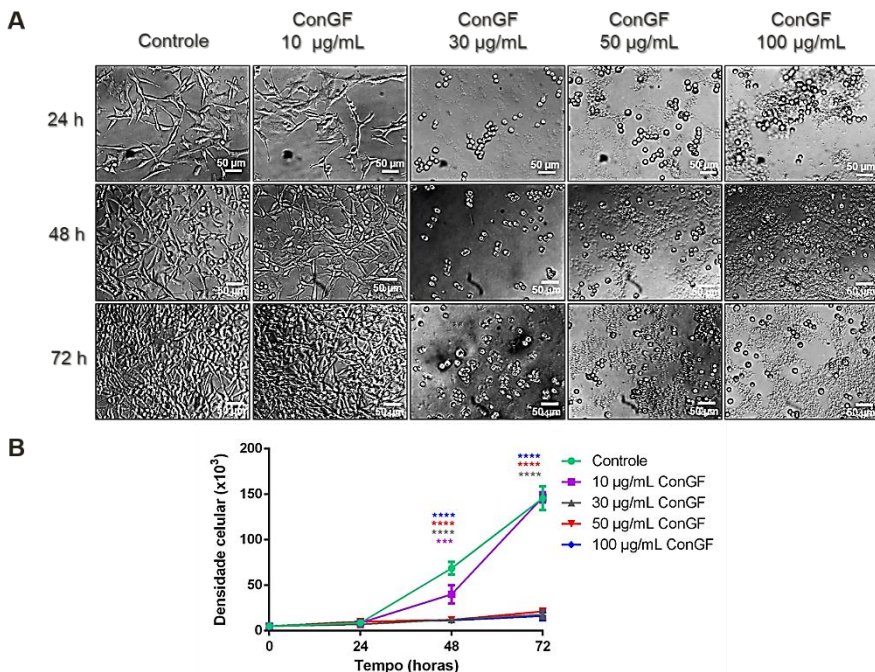


Figura 10 – Efeito de ConGF sobre a proliferação celular em células de glioma C6. Células de glioma C6 foram incubadas com veículo (HEPES; controle) ou ConGF (10, 30, 50 ou 100 µg / mL) por 24, 48 ou 72 horas. A) Análise morfológica das alterações na densidade celular utilizando microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (aumento de 20x). A barra de escala representa 50 µm. B) Quantificação da densidade celular em câmara de Neubauer. Após o período de tratamento, as células foram desprendidas com solução 0,05% tripsina/EDTA e contadas em câmara de Neubauer com adição de azul de tripan. Os valores foram representados como médias \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo tratado com veículo (controle).

5.4 EFEITOS DE ConGF SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS DE GLIOMA

A migração celular é uma das características marcantes em cânceres e está diretamente relacionada à malignidade. A migração celular pode ser avaliada *in vitro* através do ensaio de *scratch* (LIANG *et al.*, 2007; YELSKAYA *et al.*, 2013). Esse ensaio baseia-se no plaqueamento das células em alta densidade. Após as células atingirem

confluência, é feito um risco para a remoção de uma camada de células, resultando em uma lacuna entre as duas populações. Dessa maneira, para investigar se as alterações desencadeadas pela ConGF afetam a migração das células de glioma C6, ensaios com o método de *scratch* foram realizados.

Os resultados deste experimento mostraram que a ConGF, em baixas concentrações, 25 ou 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, foi capaz de diminuir a migração celular de gliomas C6 após 24 ou 48 horas do tratamento. A redução na migração celular, como pode ser observada na Figura 11 (painel A), é caracterizada pela presença da abertura entre as lacunas de células. No grupo controle, as células foram capazes de migrar, diminuindo a distância criada pelo risco em aproximadamente 74%, em relação ao tempo 0 horas. O tratamento com ConGF (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inibiu quase que completamente a migração das células, visto que a lacuna tem em média o mesmo tamanho do tempo 0 horas.

Após as 48 horas de incubação com a ConGF, a inibição da migração tornou-se ainda mais pronunciada. No grupo controle, as células já cobriram a região do risco completamente, enquanto as células que receberam o tratamento de 25 ou 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ainda possuem um grande espaço entre os dois lados do poço da placa de cultura. Dessa maneira, a capacidade de inibição da migração de ConGF foi demonstrada.

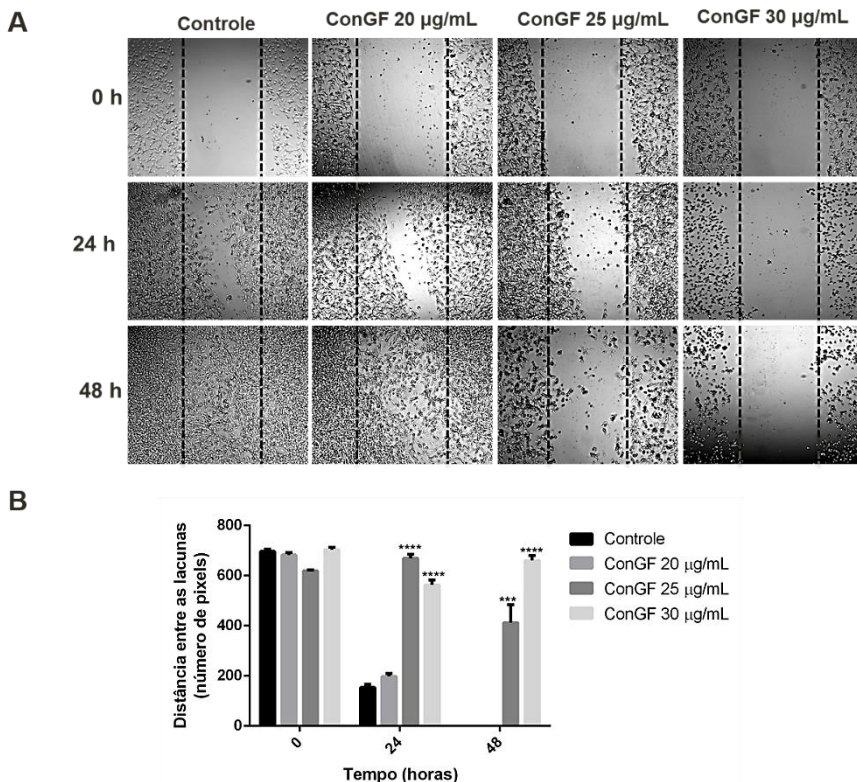


Figura 11 – Efeito de ConGF na migração celular sobre células de glioma C6. Células de glioma C6 foram tratadas com veículo (HEPES; controle) ou ConGF (20, 25 ou 30 µg/mL), sendo a migração analisada após 0, 24 ou 48 horas do tratamento. A) Imagens ilustrativas das células submetidas ao ensaio *scratch* e fotografadas subsequentemente através de microscopia invertida (aumento de 5x). B) Análise quantitativa da migração das células C6. A largura da lacuna foi quantificada como unidades arbitrária em pixels utilizando o programa Zen 2.3 lite. Os valores estão representados como média ± EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. *** p<0,001 e **** p<0,0001, quando comparado ao grupo tratado com veículo (controle).

5.5 O EFEITO DE ConGF É DEPENDENTE DO SÍTIO DE LIGAÇÃO A CARBOIDRATOS (CRD)

Para melhor compreender o mecanismo da ação citotóxica de ConGF, foi caracterizada a importância do sítio de ligação a glicano no efeito da lectina em células C6.

Com esse objetivo, a ConGF foi submetida ao bloqueio do sítio de ligação a açúcar através da pré-incubação da lectina com α -metil-D-manosídeo. A Figura 12 apresenta o resultado do ensaio de viabilidade celular após 24 horas de tratamento com a lectina ConGF nativa ou submetida ao protocolo de bloqueio do CRD. A análise dos dados mostra uma redução da viabilidade celular induzida apenas pelo tratamento com ConGF nativa. A forma bloqueada de ConGF não produziu efeitos significativos sobre a viabilidade celular na linhagem de células C6 (Figura 12, painel B). Além disso, o bloqueio do CRD de ConGF parece não alterar drasticamente a morfologia das células a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$.

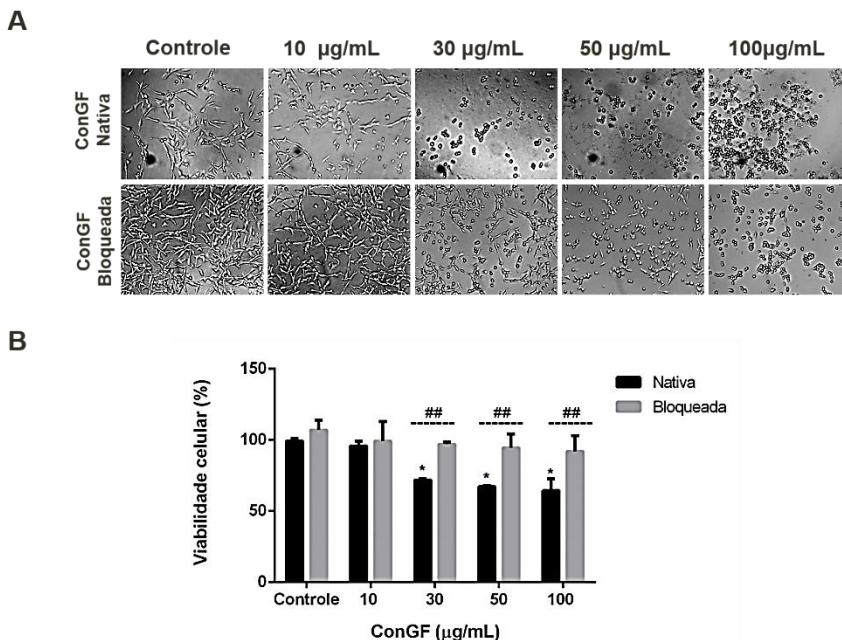


Figura 12 – Efeito de ConGF nativa e bloqueada sobre a viabilidade celular de células de glioma C6. Células de glioma C6 foram tratadas com veículo (HEPES; controle) ou ConGF nativa ou bloqueada com α -metil-D-manosídeo (10, 30, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. A) Imagens representativas da morfologia das células captadas através de microscopia invertida (aumento de 10x) frente à lectina nativa e bloqueada. B) Viabilidade celular avaliada pelo teste de redução do MTT. Os valores estão representados como média \pm EPM de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo

tratado com veículo (controle) e ## $p < 0,001$ quando comparado ao grupo tratado com lectina nativa.

5.6 EFEITO DE ConGF SOBRE O POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

O $\Delta\psi_m$ é um indicador sensível do estado energético das mitocôndrias e da célula, e pode ser utilizado para avaliar o sistema de transporte de elétrons (atividade da cadeia respiratória) e a transição de permeabilidade mitocondrial (LY *et al.*, 2003). Assim, a determinação de $\Delta\psi_m$ é amplamente utilizada para a caracterização do metabolismo celular, viabilidade e pode ser um indicativo de apoptose em vários modelos celulares.

Para avaliar os possíveis efeitos de ConGF sobre o potencial da membrana mitocondrial das células C6, utilizamos as sondas fluorescentes JC-1 e TMRE. Em vias de indução de apoptose, a perda do $\Delta\psi_m$ pode ser um evento precoce no processo apoptótico (LY *et al.*, 2003), dessa forma, os ensaios para caracterizar possíveis alterações de $\Delta\psi_m$ foram realizados no tempo de 3 horas, onde a morfologia das células ainda não apresentava modificações.

JC-1 indica a polarização mitocondrial mudando sua fluorescência de verde (525 nm) para vermelho (590 nm), de uma maneira sensível ao potencial. As mitocôndrias funcionais apresentam $\Delta\psi_m$ altamente negativo, e o JC-1 penetra e acumula-se em forma de agregados, emitindo coloração vermelha. Já em baixas concentrações, encontra-se na forma de monômeros e emite coloração verde, indicando diminuição do $\Delta\psi_m$. Nas células tratadas com ConGF por 3 horas, Figura 13 (painel A e B), o $\Delta\psi_m$ (expresso como a razão entre as fluorescências vermelho/verde) foi significativamente menor (aproximadamente 45% em comparação com as células controle). As células tratadas com o oxidante mitocondrial FCCP (controle positivo), também apresentaram uma menor razão entre as fluorescências emitidas, indicando um $\Delta\psi_m$ baixo. Os mesmos resultados foram obtidos quando o corante TMRE, foi usado para determinar o $\Delta\psi_m$ (Figura 13, painel C). Notavelmente, apesar do $\Delta\psi_m$ ser mais baixo na presença de ConGF, o ensaio de viabilidade celular (MTT) no tempo de 3 horas não mostra alteração entre os grupos controle e tratado com ConGF (Figura 13, painel D).

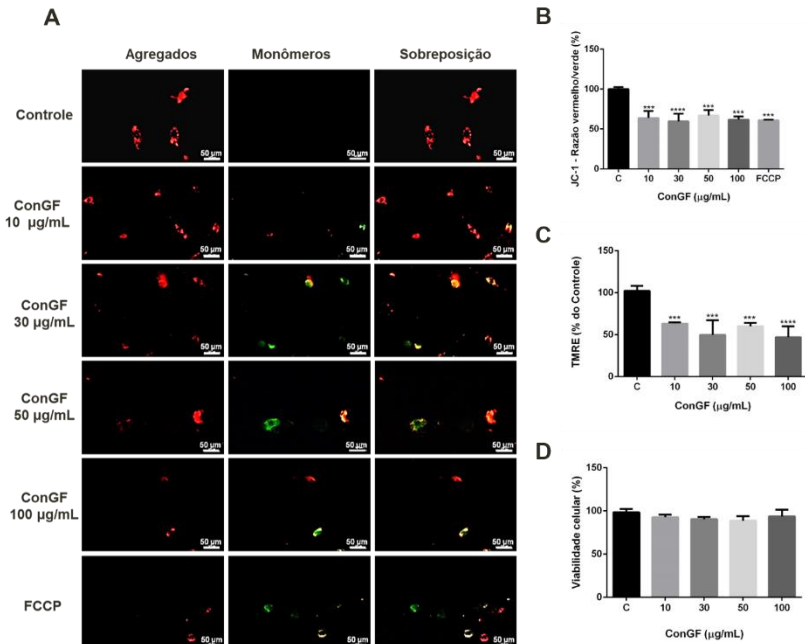


Figura 13 – Efeito do tratamento com ConGF sobre o potencial de membrana mitocondrial das células de glioma C6. As células foram tratadas com veículo (HEPES; controle) ou ConGF (10, 30, 50 ou 100 µg/mL), ou ainda, com o controle positivo CP (FCCP 10 µM) durante 3 horas. Após os tratamentos, as células foram incubadas por 20 minutos com JC-1, e avaliadas em leitor de placas para fluorescência, ou observadas através de microscopia de fluorescência. A) Imagens das células coradas com JC-1 e capturadas através de microscopia de fluorescência (aumento de 20x). A barra de escala representa 50 µm. B) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial, mensurado pela razão vermelho (agregados)/verde (monômeros) de JC-1. C) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial avaliado pela incorporação de TMRE. D) A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Os valores estão expressos como média ± EPM dos tratamentos, realizados em triplicata. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$, quando comparado ao grupo tratado com veículo (controle).

5.7 EFEITO DE ConGF SOBRE A AUTOFAGIA EM CÉLULAS DE GLIOMA

Alguns estudos têm demonstrado que eventos estressores podem levar à inibição da via da mTOR, desencadeando inibição da proliferação

e indução da autofagia, entre outros eventos (GOZUACIK & KIMCHI, 2004). Corantes fluorescentes, como o laranja de acridina (LA), podem ser usados para marcar AVOs presentes durante a autofagia. Dessa forma, células em processo autofágico podem ser detectadas em microscópio de fluorescência.

Considerando que ConGF promove a morte das células de glioma C6, a qual pode estar relacionada à autofagia, investigamos se o tratamento com ConGF poderia induzir aumento do processo autofágico. Assim, as células foram tratadas com ConGF e após 24 ou 48 horas de incubação, foram coradas com LA e observadas em microscópio invertido de fluorescência.

A Figura 14 (painel A) mostra que o tratamento com ConGF (30-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induziu um aumento significativo da marcação de AVOs nas células C6, sendo que a concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produziu um efeito mais proeminente, em relação aos efeitos produzidos pelas concentrações de 50 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em contrapartida, no tempo de 48 horas (painel B), observou-se um incremento significativo da marcação de AVOs, em relação ao controle, em todas as concentrações estudadas (10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), indicando ainda, um efeito concentração-dependente.

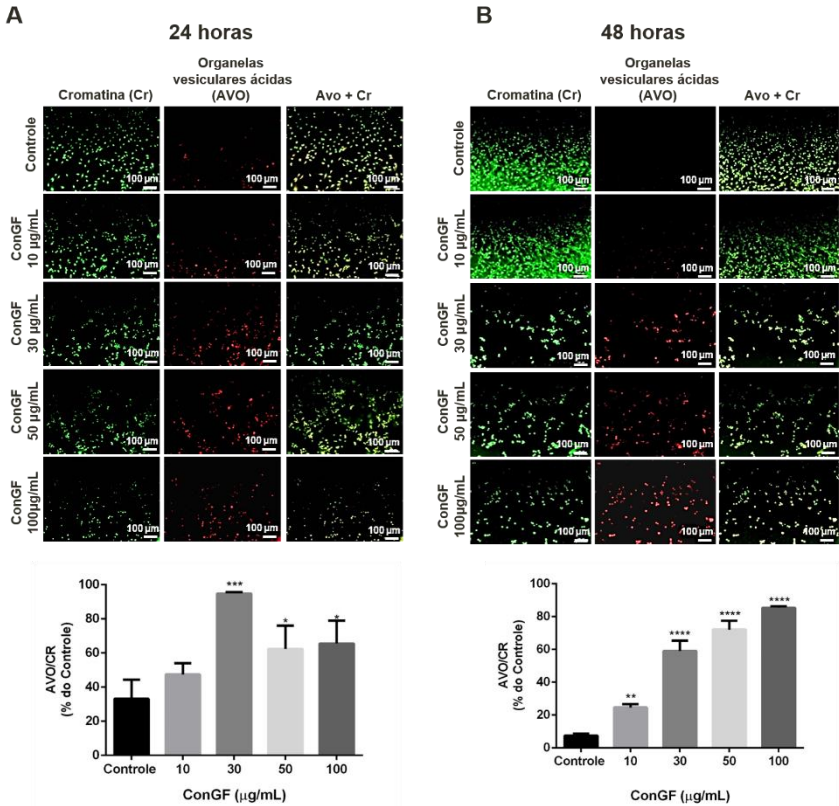


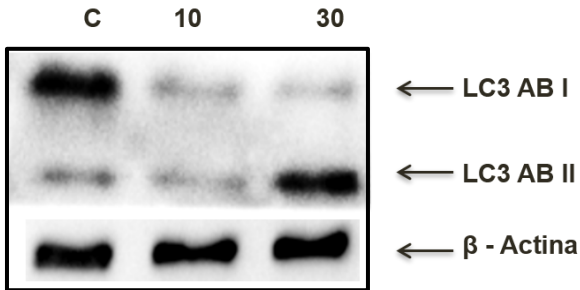
Figura 14 – Avaliação da presença de AVOs em células de glioma C6 após o tratamento com ConGF. As células C6 foram tratadas por 24 horas (painel A) ou 48 horas (painel B) com veículo (HEPES; controle) ou ConGF (10, 30, 50 ou 100 µg/mL). A cromatina (Cr) e organelas vesiculares ácidas (AVOs) foram identificadas pela coloração verde e vermelha, respectivamente. Células AVO-positivas (vermelho) representam autofagia, e a sobreposição de AVO e Cr foi apresentada por Cr + AVO. As células foram visualizadas através de microscopia de fluorescência e as imagens foram capturadas através do microscópio de fluorescência invertido Zeiss e analisadas através do *software* Image J. Imagens representativas de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata. A quantificação foi demonstrada como porcentagem de AVO/Cr, e os dados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, quando comparado ao grupo tratado com veículo (controle).

5.8 O TRATAMENTO COM ConGF INDUZIU ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DA LC3

A proteína LC3 é considerada como o principal marcador do processo autofágico, pois está envolvida na formação dos autofagossomos quando convertidos em LC3II (ZHANG *et al.*, 2013). Após a indução de autofagia, a forma não modificada da LC3 (LC3-I) é conjugada à fosfatidiletanolamina (PE), pela ação de diversas Atgs, tais como a Atg7, Atg5-12 e Atg16, formando a LC3-II, a qual está correlacionada com o número de autofagossomos presentes na célula (KIM & LEE, 2014).

Para uma melhor compreensão do mecanismo de ação de ConGF, foi avaliado um dos marcadores chaves do processo autofágico, o LC3-I/II. Assim, através da técnica de *western blot*, investigamos o nível de expressão da proteína LC3 I/II em relação à expressão da proteína β -actina, utilizada como controle de carga protéica. O resultado da expressão protéica para LC3 I/II, está representado na Figura 15. Células C6 tratadas com 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConGF por 12 horas demonstraram um aumento significativo da razão entre LC3II (forma lipidada e ativa da proteína que forma o autofagossomo) e LC3I (forma não modificada), em relação ao controle. Dessa forma, os dados demonstram que a ConGF é capaz de induzir um aumento de processos autofágicos.

A



B

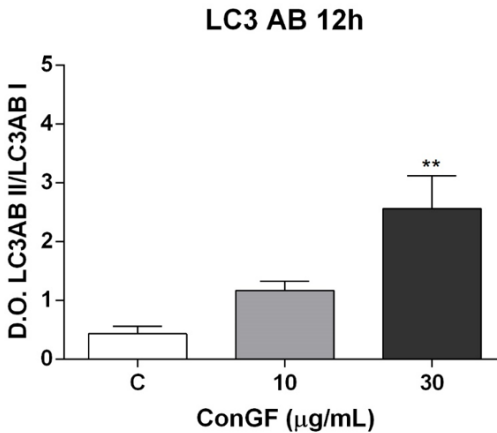


Figura 15 – Expressão de LC3-I/II após o tratamento com ConGF em células de glioma C6. Células C6 tratadas com veículo (HEPES; controle) ou ConGF (10 ou 30 μ g/mL) por 12 horas. A) Immunoblottings representativos de LC3-I/II e β -actina. B) A quantificação dos dados está expressa como a razão entre a forma lipídica e ativa de LC3 (LC3 II) e a forma não modificada da LC3 (LC3-I), LC3AB II/LC3AB I. ** p < 0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo (controle).

5.9 EFEITOS DE ConGF SOBRE OS NÍVEIS DE NECROSE EM CÉLULAS DE GLIOMA C6

Com a finalidade de avaliar se o tipo de morte em função do tratamento com ConGF, é induzida por necrose, realizou-se o ensaio de

IP/Hoechst. As células com membranas celulares comprometidas são permeáveis ao IP (14 g/mL, Sigma Chemicals, EUA), indicando células necróticas, e este, uma vez dentro das células, intercala-se ao DNA e induz uma intensa fluorescência vermelha, que é excitada por luz verde (BEVENSEE *et al.*, 1995). O Hoechst (1 g/mL; Sigma Chemicals, EUA) é um marcador nuclear, que penetra em células de membrana intacta ou rompida, emitindo fluorescência em azul e é excitado no ultravioleta (ROGALSKA *et al.*, 2010).

Conforme demonstrado na Figura 16 (painel A), o tratamento de células de glioma C6 com 10 ou 30 µg/mL de ConGF, por 24 horas, não causou alterações significativas na razão IP/Hoechst, em relação ao grupo controle. Por outro lado, observamos um aumento significativo da razão IP/Hoechst induzido pelas concentrações de 50 ou 100 µg/mL de ConGF por 24 horas. A quantificação da razão da fluorescência de IP/Hoechst comprovou que a exposição à ConGF (30, 50 ou 100 µg/mL) por um período maior, 48 horas (painel B), causou um dano significativo às células. Já a incubação com ConGF 10 µg/mL, durante 48 horas, não causou alterações significativas na razão IP/Hoechst.

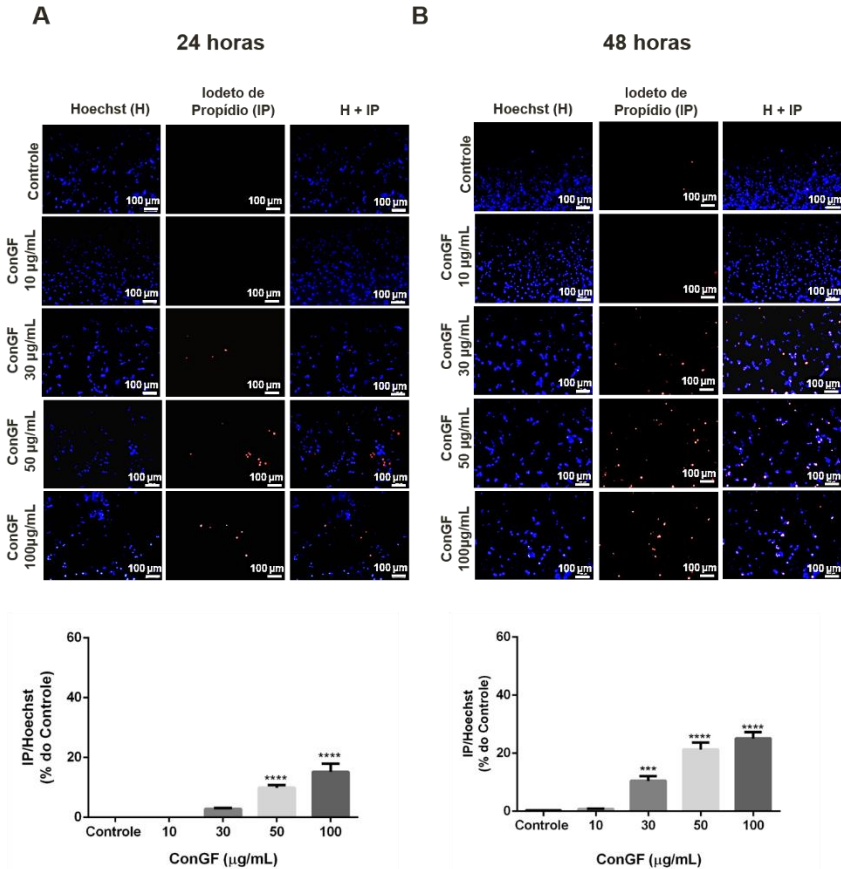


Figura 16 – Avaliação da indução de necrose medida através da razão Iodeto de Propídio/Hoechst em células de glioma C6 após o tratamento com ConGF. As células C6 foram tratadas por 24 horas (painel A) ou 48 horas (painel B) com veículo (HEPES; controle) ou ConGF (10, 30, 50 ou 100 µg/mL). Após o período de incubação, as células foram coradas com Hoechst (marcador de núcleo celular) e PI (marcador de células necróticas). As imagens foram capturadas através do microscópio de fluorescência invertido Zeiss e analisadas através do *software* Image J. Análise quantitativa da morte celular foi determinada através da relação da fluorescência de IP/Hoechst. Os dados estão expressos como média ± EPM de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata. *** p<0,001 e **** p<0,0001, quando comparado ao grupo tratado com veículo (controle).

6 DISCUSSÃO

Devido à elevada taxa de mortalidade dos pacientes acometidos por GBM, principalmente em virtude de seu típico fenótipo maligno e resistente, os mecanismos de morte celular têm ganho bastante destaque no desenvolvimento de drogas citotóxicas para uma terapia antitumoral seletiva e eficiente. Cabe ressaltar que atualmente não existe terapia eficaz disponível para tratar o glioma cerebral (BOLTEUS *et al.*, 2001; MANINI *et al.*, 2018).

Dentre as moléculas já estudadas, as lectinas têm tido destaque devido a sua capacidade de se unirem reversivelmente e com alta especificidade a carboidratos (CAVADA *et al.*, 2001), conferindo a elas um rico potencial de atividades biológicas. Tem sido reconhecido que os carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos, podendo desencadear fenômenos de diferenciação celular, proliferação e interações célula-célula, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (LIU & RABINOVICH, 2005). Neste sentido, a atividade de lectinas tem sido utilizada no estudo de diferentes processos biológicos, inclusive na modulação e identificação de gliomas. Diversos estudos relatam a ação de lectinas vegetais como moléculas biológicas capazes de induzirem a morte de células tumorais através da modulação de vias apoptóticas e autofágicas (JIANG *et al.*, 2015). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar a ação da lectina ConGF, em um modelo de GBM.

Nosso grupo tem buscado estudar os efeitos biológicos de lectinas leguminosas, especialmente aquelas obtidas da subtribo Diocleinae, sobre modelos *in vitro* de gliomas. Embora as lectinas da subtribo Diocleinae sejam proteínas que compartilham muitas semelhanças, têm sido relatadas diferenças significativas na potência e eficácia de suas atividades antitumorais (LEAL *et al.*, 2018). Dentro desse paradigma, evidenciamos que ConV pode ter efeito citotóxico em células de glioma C6, induzindo um incremento dependente da concentração na formação de AVOs, efeito similar aos dados apresentados por Pratt e colaboradores (2012). Este efeito citotóxico, foi claramente observado nas concentrações de 50 ou 100 µg/mL de ConV, após 24 ou 48 horas de tratamento, e também na concentração 30 µg/mL de ConV, após 48 horas de incubação. A lectina DLL provocou uma notável diminuição da viabilidade celular após 24 ou 48 horas, mas este efeito começou a partir de uma baixa concentração (10 µg/mL). Adicionalmente, DLL em concentrações de 10-100 µg/mL (após 6 horas de tratamento) induziu uma ativação significativa da caspase-3, sugerindo que a lectina DLL é uma

lectina eficaz na indução de apoptose de glioma em uma baixa faixa de concentração (NASCIMENTO *et al.*, 2017). Além disso, em um estudo recente demonstramos que a lectina CaBo, também exibiu potencial antitumoral sobre células C6, induzindo tanto a morte celular quanto a inibição da migração celular em um grau superior ao demonstrado pela ConV. Por outro lado, a indução de autofagia por CaBo não foi tão proeminente como a observada para ConV (CAVADA *et al.*, 2018).

No presente trabalho, foi avaliada a atividade biológica de ConGF em culturas de gliomas C6. Nossos resultados demonstraram que a ConGF pode exercer efeitos antitumorais contra gliomas em cultura de células C6. Primeiramente, visamos investigar os efeitos de ConGF na citotoxicidade, alteração morfológica da célula, inibição da proliferação e migração. A seguir, buscamos determinar o possível mecanismo de morte celular induzido nas células de glioma C6.

Nos experimentos de viabilidade celular, o tratamento com ConGF, por 24 horas, foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células C6 nas concentrações 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando assim, potencial citotóxico em células de glioma. Adicionalmente, após 48 horas de exposição à ConGF, foi demonstrado o efeito citotóxico ainda maior, observando que a viabilidade celular diminuiu significativamente em todas as concentrações em estudo.

As análises das mudanças morfológicas causadas pelo tratamento com ConGF corrobora com os ensaios de viabilidade, que mostram o efeito citotóxico produzido pela ConGF. Nossos dados mostram intensa redução da densidade celular após o tratamento com ConGF, condição em que os prolongamentos citoplasmáticos se tornam mais finos, irregulares e escassos, em comparação com as células do grupo controle. Tais alterações morfológicas foram bastante características principalmente após 6 horas de incubação, e a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. Essas observações estão de acordo com trabalhos publicados, como o de Liang Tan e colaboradores em 2008 utilizando lectina leguminosa para aglutinar células tumorais. Evidenciando dessa forma que a aglutinação interfere no processo de adesão celular e também na sua capacidade proliferativa.

A proliferação celular está presente no desenvolvimento e manutenção dos organismos, entretanto, um desbalanço na proliferação é uma característica da malignidade de tumores (LOUIS *et al.*, 2016). Por meio do ensaio de proliferação por exclusão do corante azul de tripan foi possível observar que o tratamento com a ConGF inibe a proliferação de células de glioma C6, nas concentrações 30, 50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$.

As células de glioma compartilham muitas propriedades com as células tronco neurais, incluindo a capacidade celular de migrar por todo o SNC (WESTPHAL & LAMSZUS, 2011). Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstramos que as lectinas de leguminosas com afinidade por glicose/manose como ConV e CaBo foram capazes de inibir a migração celular em glioma C6 na concentração de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (OSTERNE *et al.*, 2017; CAVADA *et al.*, 2018), enquanto DlyL a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ (LEAL *et al.*, 2018). Nesse aspecto, no nosso estudo demonstramos o efeito de ConGF em inibir a migração celular na linhagem C6, em menores concentrações (20, 25 ou 30 $\mu\text{g/mL}$) após 24 horas e mantendo este efeito no tempo de 48 horas. Portanto, ConGF parece mais eficiente nesta ação, quando comparada as outras lectinas de leguminosas avaliadas em trabalhos anteriores, em que a ação inibitória sobre a migração ocorreu em concentrações maiores.

Tendo em vista os resultados fenotípicos nas células de glioma que evidenciam a redução da viabilidade, inibição da proliferação e da migração celular ocasionada pelo tratamento com a ConGF, a próxima etapa do trabalho teve como foco avaliar a ocorrência de morte celular induzido pela ConGF em células C6.

A apoptose pode ser ativada por vias envolvendo sinais intrínsecos mediada pela mitocôndria e extrínsecos por meio dos receptores de morte, ativados na superfície celular quando ligantes específicos se unem a estes receptores. Como a ativação da via mitocondrial é considerada um evento crucial no processo apoptótico, a manipulação desta via com objetivo de induzir a apoptose tem sido indicada como uma estratégia terapêutica (GALLUZZI *et al.*, 2018). Sendo assim, investigamos o efeito de ConGF sobre o potencial de membrana mitocondrial. Neste trabalho, utilizamos os corantes fluorescentes JC-1 e TMRE, os quais podem ser usados para aferir a perda do potencial de membrana mitocondrial, normalmente associados à apoptose (GALLUZZI *et al.*, 2007). Os resultados mostraram que após 3 horas de tratamento, ConGF induziu alterações no potencial de membrana mitocondrial nas células tratadas sugerindo que a apoptose possa estar sendo induzida direta ou indiretamente através da via mitocondrial.

Em relação à morte celular necrótica, não foram observadas alterações significativas induzidas pelo tratamento com ConGF na concentração 30 $\mu\text{g/mL}$, por 24 horas. O efeito sobre a ruptura da membrana foi observado apenas em um longo tempo de exposição, 48 horas de incubação com a ConGF.

Estudos anteriores demonstraram a indução de autofagia em culturas de células de glioblastoma pela lectina ConA. Em nosso grupo,

esse efeito nas células de glioblastoma, também foi encontrado em resposta a outras lectinas leguminosas, como ConV, CaBo e DlyL (OSTERNE *et al.*, 2017; CAVADA *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2018).

Na literatura é relatado que a mitocôndria despolarizada se torna alvo de autofagia para sua digestão e eliminação (Elmore *et al.*, 2001; Priault *et al.*, 2005). A autofagia ocorre horas após a despolarização e a presença de mitocôndrias despolarizadas são mais frequentes quando a autofagia é inibida (TWIG *et al.*, 2008). ConGF, por sua vez, demonstrou induzir um aumento do número de AVOs (uma característica do processo autofágico) nas células tratadas com a ConGF nas concentrações 30, 50 ou 100 µg/mL, quando comparadas com o controle, e após 24 horas de incubação. Por meio da microscopia de fluorescência, utilizamos o corante LA para observar esse processo. Sendo mais significativo na concentração de 30 µg/mL. Este aumento de AVOs é mantido no tempo de 48 horas de forma concentração-depedente. A presença de vacúolos autofágicos em células em processo de morte após o tratamento com a lectina sugere que a morte celular poderia estar relacionada com a autofagia (KONDO *et al.*, 2005).

As fases do processo de autofagia são mediadas por diferentes complexos protéicos para a formação dos vacúolos autofágicos, principalmente pela família de proteínas Atgs. A Atg mais importante na etapa do sequestro e formação do autofagossomo é o Atg 8 (amplamente conhecido como LC3) (ZHANG *et al.*, 2013). Dessa forma, foi hipotetizado que um aumento no fluxo autofágico poderia estar relacionado com a diminuição do número de células viáveis, observado nos ensaios de citotoxicidade celular após o tratamento com ConGF.

Para confirmar tal hipótese, avaliou-se o imunocontéudo do marcador de autofagia, a proteína LC3, por *western blot*. Assim, células C6 tratadas com 30 µg/mL de ConGF por 12 horas demonstraram um aumento significativo da razão entre a forma lipídada e ativa de LC3 (LC3 II; 14 kDa) e a forma não modificada de LC3 (LC3-I; 16 kDa). Dessa forma, os dados obtidos demonstram que ConGF causa um estímulo do processo autofágico. Porém ressalta-se que o aumento do imunocontéudo de LC3-II indica o acúmulo de autofagossomos, mas não garante a degradação autofágica. Se, no entanto, a quantidade de LC3-II se acumular na presença de inibidores da protease lisossomal, isto indicaria aumento do fluxo autofágico (Mizushima & Yoshimori, 2007). Portanto, para uma avaliação geral de todo o sistema autofágico, estudos adicionais utilizando inibidores de diversas fases da autofagia serão necessários.

A desregulação do processo autofágico resulta em várias doenças humanas, como doenças neurodegenerativas e o câncer. Os genes supressores de tumor que estão frequentemente mutados em neoplasias humanas (PTEN e p53) são responsáveis por ativar a autofagia e inibir os sinais oncogênicos (Ras, PI3K, Akt). Tal afirmação indica que a autofagia é um dos mecanismos de supressão tumoral (TANABE *et al.*, 2011). A possibilidade do uso de indutores de autofagia no tratamento do câncer torna a autofagia induzida em células tumorais um tema de pesquisa atrativo, pois pode aumentar o efeito de quimioterápicos em muitos tipos de tumores malignos. Entretanto, deve também ser considerado que em células tumorais a autofagia pode ser protetora. Assim, a inibição da autofagia pode em muitas situações sensibilizar as células tumorais para o tratamento, ativando a apoptose (KONDO *et al.*, 2005). Neste contexto, a lectina ConGF pode se constituir uma ferramenta promissora para auxiliar a terapia antitumoral, pois apresentou potente atividade antiproliferativa/antitumoral *in vitro*, sendo que tal efeito parece estar relacionado com a indução do processo de autofagia e não com a proteção celular. No entanto, para a confirmação desta hipótese novos estudos em sistemas mais complexos ainda serão necessários.

7 PERSPECTIVAS

- Caracterizar de forma detalhada e precisa a indução de apoptose pela lectina;
- Caracterizar os efeitos do tratamento com os inibidores da autofagia após o tratamento com ConGF;
- Investigar o papel das metaloproteinases de matriz e seus inibidores no potencial antitumoral de ConGF em células de gliomas.
- Realizar ensaio de toxicidade sobre culturas de astrócitos e neurônios corticais primários para excluir um putativo efeito citotóxico de ConGF em células não tumorais.

8 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi avaliado o potencial antitumoral de ConGF sobre células de glioma C6.

O tratamento com ConGF promoveu um efeito citotóxico significativo nas células tratadas e foi capaz de induzir alterações morfológicas e reduzir a densidade das células. Além disso, a ConGF foi capaz de diminuir a capacidade migratória das células, em baixas

concentrações. Adicionalmente, a proliferação celular das células de glioma C6, após a exposição à lectina ConGF foi inibida. Foi possível ainda, verificar que a ConGF causou uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial. A indução de morte celular pela ConGF foi acompanhada pela presença de vacúolos autofágicos, sugerindo que o mecanismo de morte promovido por esta lectina pode envolver a indução de autofagia.

De maneira geral, os dados apresentados nesse trabalho indicam que ConGF possui uma significativa capacidade de induzir autofagia sobre células de glioma da linhagem C6, evento que pode ter aplicabilidade na estratégia de terapia antiglioma.

9 REFERÊNCIAS

ABHILASH, J. *et al.* Metal ions in sugar binding, sugar specificity and structural stability of *Spatholobus parviflorus* seed lectin. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 8, p. 3271-3278, 2013.

AGNIHOTRI, S. *et al.* Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 1, p. 25-41, 2013.

ARBAB, A. S. *et al.* Major challenges and potential microenvironment-Targeted Therapies in Glioblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2732, 2017.

ARYA, R.; MALLIK, M.; LAKHOTIA, S. C. Heat shock genes—integrating cell survival and death. **Journal of Biosciences**, v. 32, n. 3, p. 595-610, 2007.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, p. 1305-1308, 1998.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 3-4, p. 325-331, 2008.

ASHKENAZI, A. *et al.* From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 4, p. 273, 2017.

AUER, R. N.; DEL MAESTRO, R. F.; ANDERSON, R. A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 325-331, 1981.

BARROSO-NETO, I. L. *et al.* Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: a structural analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 543, p. 31-39, 2014.

BARTH, R. F.; KAUR, B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. **Journal of Neuro-oncology**, v. 94, n. 3, p. 299-312, 2009.

BEHIN, A. *et al.* Primary brain tumours in adults. **The Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 323-331, 2003.

BENDA, P. *et al.* Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. **Journal of Neurosurgery**, v. 34, n. 3, p. 310-323, 1971.

BENJAMIN, D. *et al.* Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 11, p. 868, 2011.

BERNET, A. *et al.* Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. **Gastroenterology**, v. 133, n. 6, p. 1840-1848, 2007.

BEVENSEE, M. O.; SCHWIENING, C. J.; BORON, W. F. Use of BCECF and propidium iodide to assess membrane integrity of acutely isolated CA1 neurons from rat hippocampus. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 58, n. 1-2, p. 61-75, 1995.

BOYA, P.; REGGIORI, F.; CODOGNO, P. Emerging regulation and functions of autophagy. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 713, 2013.

BOLTEUS, A. J.; BERENS, M. E.; PILKINGTON, Geoffrey J. Migration and invasion in brain neoplasms. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 1, n. 3, p. 225-232, 2001.

BREDESEN, D. E.; MEHLEN, P.; RABIZADEH, S. Receptors that mediate cellular dependence. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 8, p. 1031, 2005.

BRUMATTI, G.; SALMANIDIS, M.; EKERT, P. G. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 10, p. 1619-1630, 2010.

CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, n. 2, p. 123-135, 2001.

CAVADA, B. S. *et al.* Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 369-378, 2018.

CECCATTO, V. M. *et al.* Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* benth. seeds. *Protein and peptide letters*, v. 9, n. 1, p. 67-73, 2002.

CHAN, E.Y.; TOOZE, S. A. Evolution of Atg1 function and regulation. **Autophagy**, v. 5, n. 6, p. 758-765, 2009.

CHANG, Y.; NEUFELD, T. P. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 7, p. 2004-2014, 2009.

CHEN, Y. Q. *et al.* Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. **Oncogene**, v. 18, n. 17, p. 2747, 1999.

CHICOINE, M. R.; SILBERGELD, D. L. Invading C6 glioma cells maintaining tumorigenicity. **Journal of Neurosurgery**, v. 83, n. 4, p. 665-671, 1995.

CHINOT, O. L. *et al.* Bevacizumab plus radiotherapy–temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 8, p. 709-722, 2014.

COLEMAN, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 4, p. 339, 2001.

COSSARIZZA, A. *et al.* A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 1, p. 40-45, 1993.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 49, 2014.

DAVIS, L. Spongioblastoma multiforme of the brain. **Annals of Surgery**, v. 87, n. 1, p. 8, 1928.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8543, 2003.

DELLOYE-BOURGEOIS, C. *et al.* Sonic Hedgehog promotes tumor cell survival by inhibiting CDON pro-apoptotic activity. **PLoS biology**, v. 11, n. 8, p. e1001623, 2013.

QUEIROZ, L. P. *et al.* A multilocus phylogenetic analysis reveals the monophyly of a recircumscribed papilionoid legume tribe Diocleae with well-supported generic relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 90, p. 1-19, 2015.

DEVERAUX, Q. L. *et al.* X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. **Nature**, v. 388, n. 6639, p. 300, 1997.

DEWSON, G. Bax to the wall: Bax-and Bak-induced mitochondrial dysfunction in apoptosis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 6, p. 353, 2001.

DIAO, J. *et al.* ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. **Nature**, v. 520, n. 7548, p. 563, 2015.

DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 6, p. 477, 2005.

DU, P. *et al.* LncRNA-XIST interacts with miR-29c to modulate the chemoresistance of glioma cell to TMZ through DNA mismatch repair pathway. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 5, p. BSR20170696, 2017.

ECKLEY, M.; WARGO, K. A. A review of glioblastoma multiforme. **US Pharm**, v. 35, n. 5, p. 3-10, 2010.

EGEA, J. *et al.* Nicotinic receptor activation by epibatidine induces heme oxygenase-1 and protects chromaffin cells against oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 6, p. 1842-1852, 2007.

EHRENBERG, Benjamin *et al.* Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. **Biophysical Journal**, v. 53, n. 5, p. 785-794, 1988.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ESKELINEN, E. The dual role of autophagy in cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 294-300, 2011.

ERNST, B.; MAGNANI, J. L. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 8, p. 661, 2009.

FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 12, p. 620-633, 2013.

DO BRASIL, Flora. 2020 em construção.(2017) Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB252> [accessed 20.02. 2017], 2016.

FLUSBERG, D. A.; SORGER, P. K. Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 8, p. 446-458, 2015.

FOMBONNE, J. *et al.* Patched dependence receptor triggers apoptosis through ubiquitination of caspase-9. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10510-10515, 2012.

FORCET, C. *et al.* The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 6, p. 3416-3421, 2001.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FULDA, Simone; DEBATIN, Klaus-Michael. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798, 2006.

FRANKEL, L. B.; LUND, A. H. MicroRNA regulation of autophagy. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 11, p. 2018-2025, 2012.

FREEZE, H. H. Genetic defects in the human glycome. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 7, p. 537, 2006.

FU, L. *et al.* Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 10, p. 1442-1449, 2011.

FULDA, S. Cell death-based treatment of glioblastoma. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 121, 2018.

FUCHS, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231-241, 2007.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 329, 2015.

FULCI, G. *et al.* p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma. **Oncogene**, v. 19, n. 33, p. 3816-3822, 2000.

FURNARI, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, v. 21, n. 21, p. 2683-2710, 2007.

GALLUZZI, L. *et al.* Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 803-813, 2007.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107, 2012.

GALLUZZI, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58, 2015.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. **Microbial Cell**, v. 3, n. 3, p. 101, 2016.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 13, p. 1811-1836, 2017.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, p. 1, 2018.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.

GIL-AD, I. *et al.* Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 189-198, 2004.

GILBERT, M. R. *et al.* Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 32, p. 4085-4091, 2013.

GILBERT, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 8, p. 699-708, 2014.

GIBERT, B.; MEHLEN, P. Dependence receptors and cancer: addiction to trophic ligands. **Cancer Research**, v. 75, n. 24, p. 5171-5175, 2015.

GILLIES, L. A.; KUWANA, T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 4, p. 632-640, 2014.

GOLDSCHNEIDER, D.; MEHLEN, P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. **Oncogene**, v. 29, n. 13, p. 1865, 2010.

GOMES, L. R.; MENCK, C. FM; LEANDRO, G. S. Autophagy roles in the modulation of DNA repair pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2351, 2017.

GONÇALVES, A. C. *et al.* Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1542-1549, 2013.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2891, 2004.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell death signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 12, p. a006080, 2015.

GROBBEN, B.; DE DEYN, P.; SLEGGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell and Tissue Research**, v. 310, n. 3, p. 257-270, 2002.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 251, 2012.

HASSAN, M. *et al.* Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual Review of Genetics**, v. 43, 2009.

HIDDINGH, L. *et al.* Identification of temozolomide resistance factors in glioblastoma via integrative miRNA/mRNA regulatory network analysis. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5260, 2014.

HOLLAND, E. C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 2, p. 120-129, 2001.

HU, W.; KAVANAGH, J. J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **The Lancet Oncology**, v. 4, n. 12, p. 721-729, 2003.

HUSE, J. T.; PHILLIPS, H. S.; BRENNAN, C. W. Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. **Glia**, v. 59, n. 8, p. 1190-1199, 2011.

HUSE, J. T.; HOLLAND, E.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma: molecular analysis and clinical implications. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 59-70, 2013.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 3, p. 184-195, 2000.

IZZO, V. *et al.* Mitochondrial permeability transition: new findings and persisting uncertainties. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 9, p. 655-667, 2016.

JACOBS, V. L. *et al.* Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. **ASN Neuro**, v. 3, n. 3, p. AN20110014, 2011.

JIANG, Q. L. *et al.* Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Proliferation**, v. 48, n. 1, p. 17-28, 2015.

JOSHI, D. C.; BAKOWSKA, J. C. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 51, 2011.

KALKAVAN, Halime; GREEN, Douglas R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 46, 2018.

KARIYA, Y.; GU, J. N-glycosylation of ss4 integrin controls the adhesion and motility of keratinocytes. **PloS One**, v. 6, n. 11, p. e27084, 2011.

KAUR, J.; DEBNATH, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 8, p. 461, 2015.

KAUSHIK, S.; MOHANTY, D.; SUROLIA, A. The role of metal ions in substrate recognition and stability of concanavalin A: a molecular dynamics study. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 1, p. 21-34, 2009.

KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 8, p. 407-417, 2012.

KEPP, O. *et al.* Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 221, 2011.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, 1972.

KIM, J. *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 132, 2011.

KIM, K. H.; LEE, M. S. Autophagy—a key player in cellular and body metabolism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 6, p. 322, 2014.

KONDO, Y. *et al.* The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726, 2005.

KONOZY, E. HE *et al.* Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 2, p. 222-229, 2003.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 12, p. 1463-1467, 2005.

LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 3, p. e1675, 2016.

LABOURDETTE, G.; MARKS, A. Synthesis of S-100 Protein in Monolayer Cultures of Rat-Glial Cells. **The FEBS Journal**, v. 58, n. 1, p. 73-79, 1975.

LAVRIK, I. N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2665-2672, 2005.

LENTING, K. *et al.* Glioma: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 2, p. 263-282, 2017.

LEAL, R. B. *et al.* Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008.

LEVY, J. M. M.; TOWERS, Christina G.; THORBURN, Andrew. Targeting autophagy in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 9, p. 528, 2017.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329, 2007.

LIANG, X. H. *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 672, 1999.

LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, n. 8, p. 976, 2013.

LI, C. Y. *et al.* Galanthus nivalis agglutinin (GNA)-related lectins: traditional proteins, burgeoning drugs? **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 3, p. 323-333, 2009.

LI, W. W. *et al.* Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 2, p. 282-286, 2011.

LIMA, F. R. S. *et al.* Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 2, p. 338-349, 2012.

LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, n. 3, p. e985913, 2015.

LIU, B.; MIN, M. W.; BAO, J. K. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. **Autophagy**, v. 5, n. 3, p. 432-433, 2009.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29, 2005.

LIU, J. *et al.* Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 26281-26285, 2002.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 6, p. 957, 2015.

LOUIS, D. N.; HOLLAND, E. C.; CAIRNCROSS, J. Gregory. Glioma classification: a molecular reappraisal. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 3, p. 779, 2001.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

LOWE, J. B.; MARTH, J. D. A genetic approach to mammalian glycan function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 643-691, 2003.

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 307, 2004.

LUCHINO, J. *et al.* Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers. **Cancer Cell**, v. 24, n. 5, p. 673-685, 2013.

LUNA-VARGAS, M. P.; CHIPUK, J. E. Physiological and pharmacological control of BAK, BAX, and beyond. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 12, p. 906-917, 2016.

LY, J. D.; GRUBB, D. R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. **Apoptosis**, v. 8, n. 2, p. 115-128, 2003.

MAHMOOD, Z.; SHUKLA, Y. Death receptors: targets for cancer therapy. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 6, p. 887-899, 2010.

MANINI, I. *et al.* Role of microenvironment in glioma invasion: what we learned from in vitro models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 147, 2018.

MANN, K. *et al.* The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. **The FEBS Journal**, v. 268, n. 16, p. 4414-4422, 2001.

MARTIN, S. J. *et al.* Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 28753-28756, 1996.

MARTIN-SANCHEZ, D. *et al.* Cell death-based approaches in treatment of the urinary tract-associated diseases: a fight for survival in the killing fields. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 118, 2018.

MEHLEN, P. *et al.* The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 801, 1998.

MEHLEN, P.; TAUSZIG-DELAMASURE, S. Dependence receptors and colorectal cancer. **Gut**, v. 63, n. 11, p. 1821-1829, 2014.

MEEZAN, E. *et al.* Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. **Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 2518-2524, 1969.

MILLE, F. *et al.* The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL–caspase-9 complex. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 6, p. 739, 2009.

MIZUSHIMA, N. *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069, 2008.

MONTERO, J.; LETAI, A. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 56, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAGATA, S. DNA degradation in development and programmed cell death. **Annual Review of Immunology**, v. 23, 2005.

NAKATOGAWA, H. *et al.* Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 458-467, 2009.

NAPIMOGA, M. H. *et al.* Mucanã (*Canavalia grandiflora*) Seeds and Their Anti-inflammatory and Analgesic Effects. In: **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. 2011. p. 795-802.

NASCIMENTO, K. S. *et al.* Structural analysis of Dioclea lasiocarpa lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 92, p. 79-89, 2017.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

NIEUWDORP, M. *et al.* Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 845-852, 2008.

NOBUSAWA, S. *et al.* IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6002-6007, 2009.

NUNES, B. S. *et al.* Lectin extracted from Canavalia grandiflora seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, n. 6, p. 609, 2009.

NUNEZ, G. *et al.* Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3237, 1998.

OGAWA, K. *et al.* Phase II trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with chemotherapy for high-grade gliomas. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 7, p. 862-868, 2006.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2007.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764-772, 2013.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855-867, 2006.

OKU, M. *et al.* Evidence for ESCRT-and clathrin-dependent microautophagy. **J Cell Biol**, p. jcb. 201611029, 2017.

ORENSTEIN, S. J.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2010. p. 719-726.

OSTERNE, V. J. S. *et al.* Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 271-282, 2017.

OSTROM, Q. T. *et al.* Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-Oncology**, v. 19, p. v1–v88, 2017.

PERRY, S. W. *et al.* Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **Biotechniques**, v. 50, n. 2, p. 98, 2011.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.

PEUMANS, W. J. *et al.* Isolation and partial characterization of a new lectin from seeds of the greater celandine (*Chelidonium majus*). **Plant Physiology**, v. 78, n. 2, p. 379-383, 1985.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PIETROCOLA, F. *et al.* Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2013. p. 310-322.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540, 2015.

PRATT, J.; ROY, R.; ANNABI, B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1245-1255, 2012.

PRATT, J.; ANNABI, B. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 5, p. 917-924, 2014.

PROKHOROVA, E. A. *et al.* Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 23, p. 4593-4612, 2015.

PUROW, B.; SCHIFF, D. Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass? **Nature Reviews Neurology**, v. 5, n. 8, p. 419-426, 2009.

RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and metabolism. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1344-1348, 2010.

RABIZADEH, S. *et al.* Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. **Science**, v. 261, n. 5119, p. 345-348, 1993.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.

REIFENBERGER, G. *et al.* Advances in the molecular genetics of gliomas-implications for classification and therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 7, p. 434, 2017.

RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 405, 2007.

ROGALSKA, A.; SZWED, M.; JÓZWIAK, Z. Aclarubicin-induced apoptosis and necrosis in cells derived from human solid tumours. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 700, n. 1, p. 1-10, 2010.

ROY, B. *et al.* Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in Concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 210, p. 96-102, 2014.

RUSSELL, R. C. *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 741, 2013.

SANAI, N.; BERGER, M. S. Surgical oncology for gliomas: the state of the art. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 2017.

SCHLEGEL, J. *et al.* The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. **Pathobiology**, v. 67, n. 4, p. 202-206, 1999.

SCHMIDEK, H. H. *et al.* Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea. **Journal of Neurosurgery**, v. 34, n. 3, p. 335-340, 1971.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHEN, H. M.; CODOGNO, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? **Autophagy**, v. 7, n. 5, p. 457-465, 2011.

SIMÕES, R. C. *et al.* Protein crystal content analysis by mass spectrometry and preliminary X-ray diffraction of a lectin from *Canavalia grandiflora* seeds with modulatory role in inflammation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 7, p. 811-818, 2012.

SINA, A. *et al.* The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 4, n. 1, p. 31-38, 2010.

SNAK, C.; MIOTTO, S. T. S.; OLDENBERG, R. Phaseolinae (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) in the State of Paraná, Brazil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 3, p. 695-716, 2011.

SNAK, C. *Canavalia* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22856>>. Acesso em: 15 Jan. 2018.

STRASSER, A.; JOST, P. J.; NAGATA, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. **Immunity**, v. 30, n. 2, p. 180-192, 2009.

SUN, B. Z. *et al.* Mechanisms of TRAIL and gemcitabine induction of pancreatic cancer cell apoptosis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, p. 2675-2678, 2011.

TAIT, S. WG; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 621, 2010.

TAN, L. *et al.* Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. **Analytical Biochemistry**, v. 383, n. 1, p. 130-136, 2008.

TANAKA, S. *et al.* Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, n. 1, p. 14, 2013.

THAKKAR, J. P. *et al.* Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 2014.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.

TOZZI, A. M. G. A. *et al.* Leguminosae. Flora Fanerogâmica do estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, São Paulo, v. 8, p. 18-21, 2016.

TWIG, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 2, p. 433-446, 2008.

VARELA, E. S. *et al.* Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 59-69, 2004.

VAN KOOYK, Y.; RABINOVICH, G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 593, 2008.

VARKI, A.; KORNFELD, S. Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 22, p. 10847-10858, 1980.

VON DEIMLING, A.; KORSHUNOV, A.; HARTMANN, C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. **Brain Pathology**, v. 21, n. 1, p. 74-87, 2011.

WANG, H. H. *et al.* GADD45A plays a protective role against temozolomide treatment in glioblastoma cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8814, 2017.

WANG, X.; YOUSEFI, S.; SIMON, H. U. Necroptosis and neutrophil-associated disorders. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 111, 2018.

WEISENTHAL, L. M. *et al.* A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. **Cancer Research**, v. 43, n. 2, p. 749, 1983.

WEI, Y.; FAN, T.; YU, M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, n. 4, p. 278-288, 2008.

WELLER, M. *et al.* Glioma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15017, 2015.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 5, p. 492-507, 2008.

WEN, P. Y.; HUSE, J. T. 2016 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 23, n. 6, Neuro-oncology, p. 1531-1547, 2017.

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 495, 2011.

WILEMAN, T. Autophagy as a defence against intracellular pathogens. **Essays in Biochemistry**, v. 55, p. 153-163, 2013.

WIRSCHING, H. G.; WELLER, M. The role of molecular diagnostics in the management of patients with gliomas. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 17, n. 10, p. 51, 2016.

WITCZAK, Z. J. *et al.* A potential CARB-pharmacophore for antineoplastic activity: Part 1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 7, p. 1752-1757, 2014.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-484, 2006.

XIE, Z.; KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 1102, 2007.

YAN, H. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 765-773, 2009.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 2, p. 124-131, 2010.

YELSKAYA, Z. *et al.* Synergistic inhibition of survival, proliferation, and migration of U87 cells with a combination of LY341495 and Iressa. **PloS One**, v. 8, n. 5, p. e64588, 2013

YIP, S. *et al.* MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 14, p. 4622-4629, 2009.

ZHANG, H.; BAEHRECKE, E. H. Eaten alive: novel insights into autophagy from multicellular model systems. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 7, p. 376-387, 2015.

ZHANG, N. *et al.* The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. **Cell Research**, v. 15, n. 10, p. 749, 2005.

ZIMMER, D. B.; VAN ELDIK, L. J. Analysis of the calcium-modulated proteins, S100 and calmodulin, and their target proteins during C6 glioma

cell differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 108, n. 1, p. 141-151, 1989.

ZHANG, X. *et al.* Why should autophagic flux be assessed? **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 5, p. 595, 2013.