

Jhônatas Luís Knaut

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE LECTINAS  
EXTRAÍDAS DE LEGUMINOSAS SOBRE CÉLULAS DE GLIOMA  
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

Coorientador: Prof. Dr.  
Débora K. R. Venske

Florianópolis  
2016

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

Knaut, Jhônatas Luis

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE LECTINAS EXTRAÍDAS DE  
LEGUMINOSAS SOBRE CÉLULAS DE GLIOMA C6 / Jhônatas Luis Knaut  
; orientador, Rodrigo Bainy Leal ; coorientadora, Débora  
K. R. Venske. - Florianópolis, SC, 2016.  
101 p.

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

Inclui referências

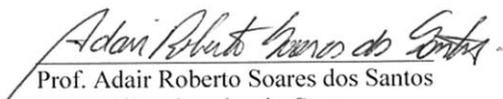
1. Neurociências. 2. Glioma. 3. Lectina. 4. Autofagia.  
I. Leal, Rodrigo Bainy. II. Venske, Débora K. R. . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Neurociências. IV. Título.

**JHÔNATAS LUÍS KNAUT**

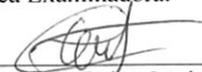
**“AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE  
LECTINAS EXTRAÍDAS DE LEGUMINOSAS SOBRE  
CÉLULAS DE GLIOMAS C6”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 01 de março de 2016.

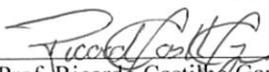
  
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

  
Prof. Rodrigo Bañy Leal  
Orientador – UFSC

  
Dra. Jade de Oliveira  
Membro - UFSC

  
Prof. Marcelo Farina  
Membro - UFSC

  
Prof. Ricardo Castillo Garcez  
Membro externo ao Programa

## AGRADECIMENTOS

A orientação do professor Rodrigo Bainy Leal pelo espaço e oportunidade de aprendizado. A co-orientação da professora Débora K. R. Venske pelo conhecimento transmitido.

Laboratório do Prof Rodrigo Bainy Leal

*A todo o grupo, pela convivência, amizade e ajuda*

Laboratório do Prof. Benildo Cavada

*Pelo apoio científico e fornecimento das lectinas*

Laboratório da Prof Ana De Paul

*Especialmente a Virginia Juarez, pelas microscopias eletrônicas*

Laboratório da Prof Marcelo Farina

*Especialmente a Dirleise, pela metodologia DCF*

Laboratório da Prof Carla Tasca

*Em especial as alunas Karen, Débora e Tarine pela metodologia de microscopia de fluorescência*

Laboratório da Prof Tania Pasa

*Especialmente a Nádia pela prestatividade e pelas metodologias de ciclo celular e citometria com Anexina e IP*

Laboratório da Prof Cláudia Simões

*Especialmente a Naira pela metodologia de autofagia*

A equipe Lameb

*Vanessa, Dennis e Camile*

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*Pelo apoio financeiro*

Aos pós-graduandos

*Pelas risadas e convivência que fizeram esses dois anos mais felizes e divertidos*

## RESUMO

Gliomas, tumores originados de células gliais (astrócitos, oligodendrócito ou epêndima), são os tumores cerebrais primários mais comuns. Lectinas são proteínas de reconhecimento e ligação específicos a carboidratos. O objetivo do presente trabalho foi analisar o possível efeito citotóxico das lectinas ConA, ConBr, ConM, CoxyL, ConGF, DSL (nativa e recombinante), DwL, DvioL, DmrL, DLL, DrfL e CTL, que são extraídas de plantas leguminosas, sobre células C6 de glioma de rato, um glioma com características astrocitárias. Após 24h de incubação com as respectivas lectinas e nas concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL, foi observado que apenas a lectina CTL não provocou redução da viabilidade, avaliada através do teste de redução do MTT. Baseado na potência de ação citotóxica observada nesse *screening* as lectinas ConA, ConBr, DvioL e DSL recombinante foram escolhidas para realizar o mesmo teste do MTT, porém também nos tempos 1, 3, 6 e 12 horas, sendo então selecionadas as lectinas ConA e Dviol para investigação das possíveis vias de morte celular envolvidas. Dessa forma, através de ensaios de microscopia de fluorescência, citometria de fluxo e microscopia eletrônica conclui-se que o principal mecanismo responsável pelo efeito citotóxico de ConA e Dviol é a indução de morte celular autofágica, efeito obtido a partir das concentrações de 30µg/mL. Ao realizar ensaios com as lectinas desnaturadas, concluiu-se que o efeito biológico depende da estrutura terciária da lectina, porém, mais estudos sobre a importância do sítio de reconhecimento a carboidratos devem ser realizados, uma vez que os ensaios de bloqueio do sítio de ligação ao açúcar não mostraram claramente uma ação bloqueadora do efeito citotóxico de ConA e Dviol. Os resultados também mostraram que Dviol possui maior potência em relação a ConA na indução de morte autofágica. Este trabalho sugere Dviol com uma molécula com potencial para futuros estudos de terapia anti-tumoral.

**Palavras-chave:** Glioma. Lectina. ConA. Dviol. Autofagia.

## ABSTRACT

Gliomas, tumors originating from glial cells (astrocytes, oligodendrocytes or ependymal) are the most common primary brain tumors. Lectins are proteins of specific recognition and binding to carbohydrates. The aim of this study was to analyze the possible cytotoxic effect of the lectins ConA, ConBr, ConM, CoxyL, ConGF, DSL (native and recombinant), DWL, DvioL, DmrL, DLL, DrfL and CTL, which are extracted from leguminous plants, on C6 rat glioma cells, which have astrocytes features. After 24 hours of incubation with the respective lectins and at concentrations of 10, 30, 50 and 100 $\mu$ g/mL, it was observed that only the CTL lectin did not cause reduction in viability as measured by MTT test. Based on the potency of cytotoxic activity observed in this screening, ConA, ConBr, DvioL and DSL recombinant lectins were chosen for the same MTT test after 1, 3, 6 and 12 hours incubation, and then ConA and DvioL lectins were selected for further investigation concerning the possible cell death pathways involved. Thus, by fluorescence microscopy, flow cytometry and electron microscopy assays, it was concluded that the main mechanism responsible for the cytotoxic effect of ConA and DvioL is the induction of autophagic cell death, the effect obtained from the concentration of 30 $\mu$ g/mL. When performing tests with denatured lectins, it was concluded that the biological effect depends on the tertiary structure of the lectin. However, further studies regarding the role of the carbohydrate recognition domain (CRD) deserve to be conducted, since the CRD blocking protocol did not completely abrogated the cytotoxic action of ConA and DvioL. The results also showed that DvioL have greater potency compared to the ConA to induce autophagic death. This study suggests DvioL as a potential molecule to undertake future studies for anti-tumor therapy.

**Keywords:** Glioma. Lectin. ConA. DvioL. Autophagy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura cristalográfica da lectina ConA.....	23
<b>Figura 2</b> - Estrutura cristalográfica da lectina DvioL.....	25
<b>Figura 3</b> - Redução do MTT em células C6 tratadas com ConA, ConBr, ConM, ConGF, CoxyL, DwL, DvioL, DmrL, DLL, DrfL, DSL, DSL [R] ou CTL por 24 horas .....	40
<b>Figura 4</b> - Redução do MTT em células C6 tratadas com ConA, ConBr, DvioL e DSL [R] por 1, 3, 6, 12 e 24 horas .....	43
<b>Figura 5</b> - Histograma de Ciclo Celular .....	45
<b>Figura 6</b> - Ciclo celular de C6 tratadas com ConA ou DvioL por 6 horas .....	46
<b>Figura 7</b> - Ciclo celular de C6 tratadas com ConA ou DvioL por 24 horas .....	47
<b>Figura 8</b> - Citometria de fluxo Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio de células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 6 horas .....	50
<b>Figura 9</b> - Citometria de fluxo Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio de células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 24 horas .....	51
<b>Figura 10</b> - Microscopia de fluorescência Iodeto de Propídio e Hoechst de células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 6 e 24 horas.....	55
<b>Figura 11</b> - Atividade de Lactato Desidrogenase em células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 12 e 24 horas .....	56
<b>Figura 12</b> - Quantificação de vesículas ácidas por citometria de fluxo de células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 6 e 24 horas .....	58
<b>Figura 13</b> - Quantificação de vesículas ácidas por citometria de fluxo de células C6 tratadas com 100µg/mL de DvioL por 3, 6 e 24 horas .....	59
<b>Figura 14</b> - Redução do MTT em células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 48 horas .....	59
<b>Figura 15</b> - Potencial de membrana mitocondrial de células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 3, 6 e 12h.....	62
<b>Figura 16</b> - Imagens de microscopia óptica de contraste de fase de células C6 tratadas com ConA .....	64
<b>Figura 17</b> - Imagens de microscopia óptica de contraste de fase de células C6 tratadas com DvioL .....	65
<b>Figura 18</b> - Volume celular e granulosidade por citometria de fluxo de células C6 tratadas com ConA ou DvioL.....	67
<b>Figura 19</b> - Microscopia eletrônica de células C6 tratadas com 30µg/mL de ConA ou DvioL por 24 horas .....	69
<b>Figura 20</b> - Redução do MTT em células C6 tratadas com ConA ou DvioL bloqueadas por 24 horas.....	72

<b>Figura 21</b> - Citometria de fluxo Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio de células C6 tratadas com ConA (nativa, desnaturada e bloqueada) por 6 e 24 horas .....	74
<b>Figura 22</b> - Citometria de fluxo Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio de células C6 tratadas com Dviolet (nativa e desnaturada) por 6 e 24 horas .....	75
<b>Figura 23</b> - Quantificação de vesículas ácidas por citometria de fluxo de células C6 tratadas com ConA (nativa, desnaturada e bloqueada) ou Dviolet (nativa e desnaturada) por 6 e 24 horas .....	78
<b>Figura 24</b> - Imagens de microscopia óptica de contraste de fase de células C6 tratadas com ConA nativa, desnaturada e bloqueada .....	79
<b>Figura 25</b> - Imagens de microscopia óptica de contraste de fase de células C6 tratadas com Dviolet nativa e desnaturada.....	80
<b>Figura 26</b> - Volume celular e granulosidade por citometria de fluxo de células C6 tratadas com ConA (nativa, desnaturada e bloqueada) ou Dviolet (nativa e desnaturada).....	81
<b>Figura 27</b> - Representação esquemática dos processos induzidos por ConA e Dviolet sobre células de glioma C6.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - $CI_{50}$ de ConA, ConBr, ConM, ConGF, CoxyL, DwL, DvioL, DmrL, DLL, DrfL, DSL, DSL [R] e CTL.....	41
<b>Tabela 2</b> - Citometria de fluxo Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio de células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 6 horas .....	52
<b>Tabela 3</b> - Citometria de fluxo Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio de células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 24 horas .....	53
<b>Tabela 4</b> - Citometria de fluxo Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio de células C6 tratadas com ConA (nativa, desnaturada e bloqueada) ou DvioL (nativa e desnaturada) por 6 horas .....	76
<b>Tabela 5</b> - Citometria de fluxo Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio de células C6 tratadas com ConA (nativa, desnaturada e bloqueada) ou DvioL (nativa e desnaturada) por 24 horas .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT - Proteína Cinase B  
APAF-1 - Fator Ativador de Protease Apoptótica  
Atg - Gene relacionado a Autofagia  
BAX - Proteína 4 tipo Bcl-2  
Bcl-2 - Célula-B de Linfoma 2  
BH3 - Proteína de único domínio BH3  
BNIP3 - BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3  
CDK - Cinase dependente de Ciclina  
CDKI - Inibidor de Cinase dependente de Ciclina  
CI<sub>50</sub> - Concentração que inibe 50% da proliferação celular  
ConA - Concanavalina A  
ConBr - Lectina da Canavalia brasiliensis  
ConGF - Lectina da Canavalia grandiflora  
ConM - Lectina da Canavalia maritima  
CoxyL - Lectina da Canavalia oxyphylla  
CTL - Lectina da Centrolobium tomentosum  
CXCL12 - Ligante 12 de Quimiocina  
CXCR4 - Receptor de Quimiocina do tipo 4  
CXCR7 - Receptor de Quimiocina do tipo 7  
DLL - Lectina da Dioclea lasiocarpa  
DmrL - Lectina da Dioclea marginata  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico  
DrfL - Lectina da Dioclea reflexa  
DSL - Lectina da Dioclea sclerocarpa  
DvioL - lectina da Dioclea violacea  
DwL - Lectina da Dioclea wilsonii  
EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal  
EGFRvIII - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Constitutivamente Ativo  
GABRA1 - Subunidade Alfa 1 do Receptor GABA  
GBM - Glioblastoma Multiforme  
GIC - Célula Iniciadora de Glioblastoma  
GNA - lectina de Galantus nivalis  
GPCR - Receptor Acoplado a Proteína G  
GPCR - Receptor Acoplado a Proteína G  
GSC - Glioma de Células Tronco  
INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva  
IP - Iodeto de Propídio  
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  
LDH - Lactato Desidrogenase  
MEC - Matriz Extracelular  
MEC - Matriz Extracelular  
MMP - Metaloproteinase de Matriz  
mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos  
MTT - sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido  
NaHCO<sub>3</sub> - Bicarbonato de sódio  
NEFL - Polipeptídeo de Neurofilamento Leve  
NF1 - Neurofibromatose 1  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PBS - Tampão fosfato-salino  
PCL - lectina da Polygonatum cyrtonema  
PDGFRA - Receptor A do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas  
PI3K - Fosfoinositol-3-cinase  
PTEN - Fosfatase Homóloga a Tensina  
RAS - Proteína Oncogênica p21  
RTK - Receptor Tirosina Cinase  
SFB - Soro Fetal Bovino  
SHH - Proteína Sonic Hedgehog  
SNC - Sistema Nervoso Central  
SYT-1 - Sinaptotagmina 1  
TMRE - tetrametilrodamina-etil-ester  
TNF - Fator de Necrose Tumoral  
 $\Delta\Psi_m$  - Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução .....</b>	<b>13</b>
1.1 Glioma .....	16
1.1.1 Glioblastoma multiforme .....	18
1.2 Lectinas .....	21
1.2.1 Lectinas e o Câncer .....	22
1.2.2 Concanavalina-a .....	23
1.2.3 Lectina da <i>Dioclea violacea</i> .....	24
1.3 Morte Celular .....	25
1.3.1 Necrose .....	25
1.3.2 Apoptose .....	26
1.3.3 Autofagia .....	29
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>32</b>
2.1 Objetivo Geral .....	32
2.2 Objetivos Específicos .....	32
<b>3 Materias e Métodos .....</b>	<b>33</b>
3.1 Cultura de células .....	33
3.2 Lectinas .....	33
3.2.1 Diluição, desnaturação e bloqueio .....	33
3.3 Ensaio de viabilidade celular .....	34
3.4 Ciclo celular .....	35
3.5 Potencial de membrana mitocondrial .....	35
3.6 Atividade de lactato desidrogenase .....	36
3.7 Microscopia de fluorescência .....	36
3.8 Morte celular por citometria de fluxo .....	37
3.8.1 Anexina V-FITC vs. iodeto de propídio .....	37
3.8.2 Laranja de acridina .....	37
3.9 Microscopia Eletrônica .....	38
3.10 Análise Estatística .....	38
<b>4 Resultados e Discussão .....</b>	<b>39</b>
4.1 Avaliação do potencial citotóxico de lectinas leguminosas .....	39
4.2 ConA e DvioL não alteram o ciclo celular de células C6 .....	45
4.3 ConA e DvioL induzem morte celular em células C6 .....	48
4.4 ConA e DvioL reduzem o potencial de membrana mitocondrial .....	61
4.5 ConA e DvioL provocam alterações morfológicas em células C6 .....	63
4.6 Bloqueio e desnaturação de lectinas .....	71
4.7 ConA e DvioL induzem morte celular autofágica em células de glioma C6 .....	82

<b>5 Conclusão .....</b>	<b>84</b>
<b>6 Perspectivas.....</b>	<b>85</b>
<b>7 Referências.....</b>	<b>86</b>
APÊNDICE 1 .....	97
APÊNDICE 2 .....	98



## 1 INTRODUÇÃO

A palavra "câncer" deriva do termo grego *karkinos*, cuja tradução é "caranguejo". O termo "câncer/*karkinos*" foi primeiro utilizado por Hipócrates, por volta de 400 a.C., para se referir a um tumor com vasos sanguíneos inchados à sua volta de aparência semelhante a um caranguejo (MUKHERJEE, 2012). Atualmente o câncer se refere às neoplasias, ou seja, células transformadas de rápido crescimento e proliferação, com capacidade de invasão de tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, fenômeno conhecido como metástase, que ocorre em tumores malignos (DE ALMEIDA, 2005).

O câncer é uma das principais causas de morte, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento e é, portanto, uma preocupação mundial. No Brasil, o câncer é a segunda maior causa de morte, com 190 mil óbitos por ano e estima-se quase 600 mil novos casos de câncer em 2016. Segundo o INCA, responsável por essa estimativa, o aumento dos casos de câncer pode ser explicado, em parte, pelo aumento da expectativa de vida, urbanização e globalização. Por se tratar de uma doença associada principalmente ao envelhecimento, quanto maior a expectativa de vida da população maior costuma ser a incidência do câncer (BRASIL/INCA, 2015).

A carcinogênese, ou seja, a formação do câncer, é um processo multifatorial, em que cada evento resulta de alterações genéticas, as quais conduzem à transformação progressiva de células saudáveis em células malignas (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Apesar de ser um processo complexo e ainda pouco entendido, acarretado por diversos fatores genéticos e ambientais, as alterações conhecidas que desencadeiam em neoplasias ocorrem pela ativação, através de agentes carcinogênicos, de genes denominados proto-oncogenes, inativos nas células normais, ou pela inibição de genes supressores de tumores, que culmina em proliferação e crescimento celulares descontrolados, transformando as células saudáveis em tumorais (TAYLOR e LADANYI, 2011). Proto-oncogenes e genes supressores de tumor normalmente controlam o ciclo celular e o reparo do DNA (FELSHER, 2004), portanto, células tumorais tornam-se geneticamente instáveis (FUSTER et al, 2005). Para que o dano causado ao DNA seja transmitido às células filhas é necessário que ocorra também a replicação do DNA e a divisão celular, promovendo assim o efeito mutagênico (TAYLOR e LADANYI, 2011).

Os eventos conhecidos da carcinogênese ocorrem em estágios, conhecidos como iniciação, promoção e progressão. Na iniciação, um

agente promotor de carcinogênese (agente carcinógeno) age no DNA celular e nesse estágio a susceptibilidade genética pode contribuir. A promoção da carcinogênese é um processo que ocorre geralmente de maneira lenta, em que a exposição ao agente carcinógeno deve ser constante para que ocorra a progressão. Nesse estágio de promoção, a dieta e o estilo de vida podem promover efeitos benéficos e, até mesmo, prevenir o desenvolvimento do câncer (DE ALMEIDA, 2005). Por isso, a mudança do comportamento dos adultos e a disseminação de hábitos saudáveis desde os primeiros anos de vida são essenciais para que haja uma redução, estimada em um terço, dos casos de câncer (BRASIL/INCA, 2015). Já o terceiro estágio, refere-se à progressão e expansão do câncer, sendo um processo, na maioria dos casos, irreversível, que evolui até o aparecimento das manifestações clínicas (DE ALMEIDA, 2005).

Durante a transformação neoplásica, tipicamente as células adquirem seis atributos que permitem crescimento descontrolado e sua disseminação: sinalização proliferativa descontrolada, evasão de supressores de crescimento, ativação de invasão e metástase, imortalidade replicativa, habilidade para induzir angiogênese e resistência à morte celular (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Os tumores não são entidades autônomas. Comunicação bidirecional entre o tumor e os tecidos em torno, conhecido como microambiente tumoral, é essencial para o processo de crescimento tumoral, evasão do sistema imune, manutenção do nicho de células-tronco cancerígenas e crescimento de novos vasos sanguíneos (CHERRY et al., 2014). Por exemplo, para um tumor sólido alcançar diâmetros superiores a 2 mm, ele deve adquirir uma vascularização através do processo de angiogênese tumoral (FUSTER et al, 2005).

Os tumores malignos diferenciam-se dos benignos pela capacidade de invadir outros tecidos e formar novos tumores (LAZEBNIK, 2010). Em vários tipos de células tumorais, dez alterações essenciais ditam coletivamente o crescimento maligno: auto-suficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão de tecidos e metástase, alteração energética da célula, instabilidade genômica e mutação, evasão da destruição imune, e inflamação induzida por tumor (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Essas dez capacidades adquiridas representam a base do mecanismo de defesa anti-câncer (LI et al., 2011).

A disseminação tumoral (metástase) ocorre através da microcirculação, após as células invadirem os capilares e vasos

linfáticos finos no interior do tumor. Após a entrada na vasculatura, as células tumorais podem absorver fatores transportados pelo sangue, formar grandes agregados com plaquetas e leucócitos (importante para a semeadura metastática), e eventualmente, se alojarem nos pequenos vasos de órgãos distantes. (BORSING et al., 2001; FUSTER et al., 2005). O revestimento das células tumorais por plaquetas e linfócitos pode servir para estabilizar êmbolos tumorais, facilitar a sobrevivência (incluindo a proteção contra a imunidade inata), favorecer o aprisionamento microvascular e eventual crescimento de metástases na microvasculatura de órgãos distantes (AL-MEHDY et al., 2000; BORSING et al., 2002; FUSTER et al., 2003).

Um crescente corpo de evidências suporta papéis cruciais para glicanos em várias etapas fisiopatológicas da progressão do tumor. Glicanos regulam a proliferação do tumor, invasão, angiogênese e metástase. Por exemplo, a proliferação de células tumorais é potencializada pela capacidade de glicoproteínas e glicoesfingolípido ativarem diretamente os receptores de fator de crescimento tirosina cinases (RTKs) e pela capacidade de proteoglicanos funcionarem como co-receptores para fatores de crescimento tumorais solúveis, além dos glicanos poderem mediar sinalizações intracelulares (KOMATSU et al., 2001; SALGIA, 2014). Tumores também geram glicoconjugados que desempenham um papel repulsivo, facilitando fisicamente o descolamento de células invasivas do tumor primário. É comum os tumores expressarem um repertório único de glicanos, portanto, uma série de abordagens com alvos glicano específicos pode ser considerada para o desenvolvimento de novas drogas. Mensurações séricas de certos glicanos típicos de superfície de células tumorais é atualmente utilizado para facilitar diagnósticos, pesquisar recorrência de sinais do tumor ou fornecer uma medida para avaliar a resposta terapêutica. O refinamento de tecnologias para análise clínica do material de biópsia, a fim de originar um glicotipo para o tumor, pode auxiliar uma escolha racional para a aplicação antecipada de imunomoduladores e de inibidores de glicanos tumorais para reduzir o risco de disseminação associada à remoção cirúrgica (FUSTER et al., 2005).

O tratamento do câncer pode ser feito por meio de diferentes abordagens, dependendo do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento, e incluem a remoção dos tumores por excisão cirúrgica, no caso de tumores localizados, radioterapia e quimioterapia. Estas abordagens, juntamente com algumas técnicas adjuvantes emergentes, como a fototerapia dinâmica e a imunoterapia, podem ser utilizadas separadamente ou em conjunto. Na incapacidade das medidas

locais, através de cirurgia ou radioterapia, conterem o câncer em razão do desenvolvimento de metástase, há necessidade do tratamento sistêmico por quimioterapia, a qual emprega medicamentos administrados via intravenosa (em sua maioria) ou via oral. A quimioterapia visa à exterminação das células tumorais, sem causar a morte da população de células saudáveis dos tecidos, o que muitas vezes não ocorre, acarretando danos principalmente às células de rápido crescimento, o que explica parte dos efeitos colaterais observados na quimioterapia. No entanto, os benefícios em relação à toxicidade devem ser considerados, a fim de se obter um índice terapêutico favorável (DE ALMEIDA et al., 2005).

Os tumores cerebrais estão entre os tipos mais malignos de câncer, sendo um grande problema de saúde e apresentando desafios particularmente difíceis para a terapia (RIOS-MARCO et al., 2015). Dentre os tumores cerebrais, os gliomas são os tumores malignos intracraniais mais comuns, sendo responsáveis por 80% dos tumores primários no sistema nervoso central (CHERRY et al., 2014).

## 1.1 GLIOMA

Quando as células do tumor apresentam características de células gliais o tumor é chamado de glioma. O termo glioma engloba astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas dependendo do tipo de célula glial que o originou, no caso, astrócito, oligodendrócito e células ependimais, respectivamente (RUBIN, 2010).

O maior subconjunto, compreendendo mais de 50% dos gliomas, é o de astrocitomas, os quais são assim nomeados por apresentarem características histológicas de astrócitos (CHERRY et al., 2014). Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e eles têm muitas funções fisiológicas críticas. Por exemplo, eles participam ativamente no desenvolvimento cerebral, regulação do sistema nervoso central maduro e plasticidade neural (WILHELMSSON et al., 2012). Os astrócitos também podem liberar fatores que são essenciais para a sobrevivência neuronal e proporcionar um ambiente fisiológico para a função dos neurônios (VAN DE MARK et al., 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os astrocitomas em quatro graus (I-IV) baseado nos seguintes critérios de severidade histológica: celularidade, pleomorfismo nuclear, atividade mitótica do tumor e presença de necrose e neovascularização. Uma vez

que a angiogênese e proliferação vascular sempre acompanham a gênese dos gliomas, elas têm sido usadas como indicadores de grau de malignidade (CHENG et al., 2013). O astrocitoma de grau IV, ou glioblastoma multiforme (GBM), é o mais comum glioma primário diagnosticado em adultos e ocorre na incidência aproximada de 3,2 a cada 100.000 pessoas por ano nos Estados Unidos (OSTROM et al., 2015).

O sistema de classificação atual que divide os gliomas por malignidade não tem sido efetivo em estimar prognósticos, notavelmente entre os graus II e IV (HARTMANN et al., 2010). Por conta disso, buscaram-se correlacionar características moleculares com os graus de gliomas. Por exemplo, sabe-se que o nível de expressão de numerosos membros da família de metaloproteinases de matriz (MMP) relaciona-se com a malignidade tumoral (PAGENSTECHEER et al., 2001). Outro aspecto que atualmente os grupos de pesquisa levam em conta ao avaliarem o estadiamento de neoplasias é a presença de apoptose, necrose e autofagia (DEMARIA et al., 2010). Como exemplo, trabalhos mostram que os glioblastomas multiformes, gliomas de grau mais elevado, são também caracterizados por regiões de hipóxia e muitas vezes por grandes áreas de necrose, e tal estresse contínuo ou excessivo em última instância, resulta em morte celular induzida por autofagia (PRATT et al., 2014).

Os fatores de risco relacionados ao aparecimento do câncer podem ser hereditários ou encontrados no meio ambiente, sendo que a esse último, é atribuída a maioria dos casos. (TAYLOR e LADANYI, 2011). Alguns estudos atuais mostraram um maior risco de câncer cerebral em pessoas que usaram telefones celulares por mais de dez anos (HARDELL et al. 2008). Os resultados de estudo "INTERPHONE" sugere a possível relação entre o uso de celulares (a níveis de exposição elevados) e risco de glioma, corroborando com a maior incidência de glioma no lobo temporal do cérebro (INTERPHONE Study Group, 2010).

### 1.1.1 Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme, um astrocitoma de grau IV, é a forma mais comum de tumor cerebral maligno, representando 46,1% do total de casos. Além disso, os glioblastomas correspondem a 55,1% de todos os gliomas diagnosticados nos Estados Unidos entre 2008 e 2012. A ocorrência de glioblastoma é mais comum em idosos, portanto a incidência desse tumor aumenta com a idade, com as maiores taxas entre 75 e 84 anos. Além do mais, o glioblastoma é 1,6 vezes mais comum em homens, e 2 vezes mais incidente na população de etnia branca, comparada com a negra (OSTROM et al., 2015).

O glioblastoma multiforme (GBM) foi dividido, por Verhaak et al. (2010), em quatro subtipos: clássico, mesenquimal, pró-neural e neural. O subtipo clássico é primariamente definido por um aumento na expressão no Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR do inglês *epidermal growth factor receptor*) e deleção dos genes PTEN (do inglês *tumor suppressor protein phosphatase and tensin homolog*). A amplificação do EGFR neste subtipo frequentemente co-ocorre com uma mutação que origina um receptor constitutivamente ativo (EGFRvIII) (ALDAPE et al., 2004). O EGFR é um receptor tirosina cinase (RTK) oncogênico que ativa vias de sinalização pró-migratórias e proliferativas, e quando amplificado ou mutado, exerce um papel no desenvolvimento de várias neoplasias (ZHANG et al., 2007). A amplificação de EGFR, apesar de não ser estritamente definida em outros subtipos genéticos, está comumente presente nos subtipos pró-neural e neural, o que faz dessa mutação genética a mais frequente em GBM. Portanto, embora 27% (VERHAAK et al., 2010) desses câncers sejam caracterizados como subtipo clássico, aproximadamente 40% de todos os GBMs diagnosticados contêm amplificação de EGFR, muitos dos quais também contêm mutação em EGFRvIII (ALDAPE et al., 2004).

Os subtipos mesenquimal e pró-neural compreendem 29% e 28% dos GBMs, respectivamente (VERHAAK et al., 2010). O subtipo mesenquimal é caracterizado pela deleção ou mutação de NF1 (do inglês *tumor suppressors neurofibromin 1*) e PTEN. NF1 é um regulador negativo da proteína oncogênica RAS, e PTEN antagoniza fosfoinositol-3-cinase (PI3K), que são duas importantes moléculas da sinalização *downstream* de RTKs. O subtipo pró-neural tipicamente tem amplificação do receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA do inglês *platelet-derived growth factor receptor A*) e mutação no supressor de tumor TP53. De forma similar ao EGFR, o

PDGFRA é um RTK que ativa vias de crescimento mitogênicas (CHERRY et al., 2014).

Por último, o subtipo neural é o menos comum, e corresponde a 16% dos diagnósticos de GBMs. Este subtipo não é definido por uma desregulação de vias oncogênicas ou supressoras de tumor, mas, em vez disso, é definido pela presença de marcadores neuronais, como polipeptídeo de neurofilamento leve (NEFL do inglês *neurofilament light polypeptide*), subunidade alfa 1 do receptor GABA (GABRA1 do inglês *GABA receptor subunit alpha 1*), e sinaptotagmina 1 (SYT-1 do inglês *synaptotagmin-1*) (CHERRY et al., 2014).

Nota-se que as características genéticas que definem os subtipos de GBM exibem em comum a desregulação na sinalização RTK, que é a maior indutora por trás de marcas adquiridas de malignidade (CHERRY et al., 2014).

Células iniciadoras de glioblastomas (GICs do inglês *Glioblastoma-initiating cells*) representam uma subpopulação semelhante a células-tronco dentro dos glioblastomas malignos responsáveis pelo desenvolvimento tumoral, progressão, resistência terapêutica e recidiva tumoral. Portanto, a erradicação dessa subpopulação é essencial para atingir a estabilidade e a remissão por um longo período (MARTÍN et al., 2014).

Foi proposto que a gliomagênese inicia em células tronco neurais adultas ou precursores neurais que sofrem transformação em células iniciadoras de GBM (GICs), as quais apresentam um comportamento do tipo célula-tronco (MARTÍN et al., 2014). Portanto, GICs são caracterizadas por auto-renovação, diferenciação em múltiplas linhagens, manutenção da proliferação e alto potencial oncogênico (GALLI et al., 2004). Além do mais, GICs são altamente resistentes às terapias atuais, possivelmente explicando as frequentes recidivas tumorais (BAO et al., 2006). GICs podem ser induzidas a diferenciarem-se em células maduras do sistema nervoso central (SNC), as quais perdem o comportamento de célula-tronco e tornam-se mais sensíveis a certas terapias (MARTÍN et al., 2014).

Receptores de quimiocinas do tipo 4 e 7 (CXCR4 e CXCR7, respectivamente) são superexpressos em numerosas linhagens de células tumorais, incluindo GBM (RUBIN et al., 2003) e em tecidos de GBM extraídos de pacientes (CALATOZZOLO et al., 2011). A expressão de CXCR4 correlaciona-se com o grau do tumor (STEVENSON et al., 2008) e, além do mais, é superexpresso em gliomas de células tronco (GSC) comparado com seu homólogo mais diferenciado GBM, sugerindo que este particular subtipo de receptor acoplado a proteína G

(GPCR), CXCR4, pode exercer um papel na manutenção da população GSC (EHTESHAM et al., 2009). Em contraste, a expressão de CXCR7 é induzida localmente em áreas de hipóxia (EHTESHAM et al., 2013). Experimentos *in vitro* revelaram que CXCR4 e CXCR7 medeiam respostas proliferativas e migratórias em linhagens de GBM (CHERRY et al., 2014). Outra via que promove a formação de população GSC, é a sinalização *Sonic hedgehog* (SHH), normalmente vital para a formação tecidual durante o desenvolvimento e para a manutenção de células tronco neurais (YAN et al., 2014).

Os receptores acoplados a proteína G (GPCR) exercem um papel importante nos mecanismos moleculares envolvidos na angiogênese, proliferação e invasão celular (CHERRY et al., 2014). O início da angiogênese ocorre em múltiplos passos: (1) degradação da matriz extracelular (MEC), (2) desconexão célula-célula e adesão célula-matriz, (3) proliferação de células endoteliais e (4) migração de células endoteliais para formar novos vasos sanguíneos (RICHARD et al., 2001). A angiogênese em GBM é reforçada por GSCs recrutadas para os locais de formação de novos vasos por sinalização CXCR4/CXCL12 (CHENG et al., 2013a). Um trabalho publicado em 2014 por Yan e colaboradores mostrou que o ligante SHH, liberado por células endoteliais, pode promover desdiferenciação de células de glioma para GSCs em nichos perivascularares. Estas GSCs são então estimuladas a transdiferenciar em células de suporte vascular, conhecidas como pericitos (CHENG et al., 2013a). Portanto, além do aumento da liberação de fatores pró-angiogênicos e ativação de MMPs, GPCRs promovem a angiogênese em áreas hipóxicas e aumentam a integridade estrutural para formação de novos vasos sanguíneos.

O glioblastoma, além de ser o mais comum, é também o mais intratável dos gliomas malignos e, atualmente, não existe terapia satisfatória disponível para tratar esse tipo de câncer. O mau prognóstico associado com glioblastoma é devido à sua natureza infiltrativa, rápida proliferação e resistência a múltiplas drogas (OMURO e DE ANGELIS, 2013). Populações GSC são responsáveis pela resistência a terapia e recorrência de GBM (BAO et al., 2006; YAN et al., 2014), sendo capazes de propagar tumores heterogêneos (JOHNSON et al., 2014). Portanto, o prognóstico para pacientes diagnosticados com GBM é ruim (CHERRY et al., 2014), considerando que a agressividade desse tumor resulta em uma taxa média de sobrevida menor que 1 ano (STUPP et al., 2005) e apenas 5,1% dos pacientes sobrevivem cinco anos ou mais após o diagnóstico (OSTROM et al., 2015).

A terapia padrão para pacientes diagnosticados com GBM consiste na ressecção cirúrgica, terapia de radiação e quimioterapia (ZHANG et al., 2014). Com relação à remoção cirúrgica, os GBMs exibem um elevado grau de invasão, infiltrando profundamente o tecido normal. A completa remoção cirúrgica do glioma é quase impossível, o que gera uma alta incidência da recorrência do tumor (OKAZAKI et al., 2012). Infelizmente existem poucas opções quimioterápicas para os gliomas, como carmustina e temozolomida (PREUSSER et al. 2011).

Muito pouco progresso tem sido feito no tratamento desse câncer em décadas (CHERRY et al., 2014) e novos caminhos para o tratamento de gliomas são urgentemente necessários (SHEN et al., 2014). Um conjunto de moléculas promissoras para a terapia contra o câncer são as lectinas de plantas, proteínas que têm mostrado capacidades diversas de indução de morte celular, inclusive em células tumorais (LI et al., 2010).

## 1.2 LECTINAS

Lectinas representam uma família de proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que reconhece especificamente e liga-se reversivelmente a açúcares livres ou glicanos, presentes em glicoproteínas e glicolipídios, sem catalisar uma modificação nesses açúcares (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; FUSTER et al., 2005; LIU et al., 2013). Estas proteínas de ligação com carboidratos são de origem não imune, ou seja, elas não são um anticorpo anti-carboidrato (FUSTER et al., 2005). Além do mais, as lectinas podem aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoconjugados (SHARON e LIS, 1989) e isso se deve ao domínio de ligação a açúcares (VAN DAMME et al., 1998).

Lectinas de plantas são uma classe altamente diversificada de proteínas (LIU et al., 2013), amplamente distribuídas nas espécies vegetais e conhecidas por possuir diversas funções biológicas importantes como anti-tumoral, anti-fúngica e anti-virais (LI et al., 2010). As lectinas vegetais podem ser divididas em sete famílias diferentes de acordo com as suas relações evolucionárias e estrutura molecular, as quais são: lectinas de leguminosas; lectinas de ligação a quitina; lectinas inativadoras de ribossomos; lectinas relacionadas com a GNA (lectina de *Galantus nivalis*); lectinas relacionadas com jacalina; família das lectinas *amarathin* e lectinas do floema de *cucurbitaceae* (VAN DAMME et al., 1998).

Como uma das famílias de lectinas vegetais, a família das lectinas leguminosas é encontrada principalmente em sementes de leguminosas. Embora a sequência de aminoácidos e as estruturas terciárias das lectinas leguminosas exibam semelhanças significativas, as estruturas quaternárias delas são diferentes (SRINIVAS et al., 2001). As lectinas de leguminosas adquiriram uma atenção crescente por biólogos de câncer devido às suas propriedades antitumorais notáveis, em comparação com outras famílias de lectinas (LI et al., 2010).

### 1.2.1 Lectinas e o Câncer

Um levantamento feito até o ano de 2006 nos mercados farmacêuticos da América do Norte, Europa e Japão mostrou que 48,6% do total de 155 fármacos anticâncer clinicamente aprovados provêm de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007). E nesse panorama, as lectinas de plantas chamam a atenção devido às suas capacidades anti-proliferativas versáteis (LI et al., 2010), indutoras de morte celular programada incluindo apoptose e autofagia em células cancerígenas (CHEN et al., 2009; LIU et al., 2009; LIU et al., 2010). Como exemplo, pode-se citar a concanavalina A (ConA) que é uma proteína com domínio lectina leguminosa, a lectina da *Polygonatum cyrtonema* (PCL) da família GNA e as lectinas do visco (MLs) da família ricin-B (inativadora de ribossomos), que exibem potenciais antitumorais notáveis por induzirem tanto apoptose quanto morte celular autofágica (ZHANG et al., 2012).

Três hipóteses existem para tentar compreender como as lectinas de plantas determinam a morte de vários tipos de células de câncer, são elas: (1) por endocitose a lectina pode localizar seletivamente algumas organelas; (2) a lectina pode ligar-se a receptores contendo açúcar; e (3) a lectina pode causar diretamente inativação de ribossomos (LIU et al., 2013). Muitas lectinas de plantas têm toxicidade natural e podem produzir resposta de resistência a medicamentos; uma solução para isso poderia ser a modificação por mutação direta, concebendo um outro candidato sintético "ideal" como droga antitumor para utilização terapêutica com maior eficiência e menor toxicidade (MAIESE et al., 2012).

Inúmeros processos de reconhecimento celular, incluindo o desenvolvimento, a diferenciação, a morfogênese e a migração de células são regulados mediante interações entre lectinas e oligossacarídeos presentes em glicoproteínas da superfície celular (KOHN et al., 2004). Agentes que podem interferir com esse tipo de

interação têm sido considerados para controlar ou inibir o processo metastático (FUSTER et al., 2005). Além do efeito citotóxico, algumas lectinas de plantas têm sido utilizadas como ferramentas para diferenciar tumores malignos de benignos, e para marcar o grau de glicosilação associado com a metástase tumoral (LIU et al., 2013).

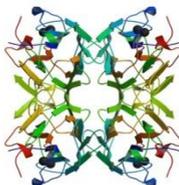
Terapias convencionais atuais contra o câncer não conseguem proporcionar seus efeitos de uma forma destino-específica (SAMPSON et al., 2011). Desta forma, visto que as lectinas ligam-se de forma específica a determinados carboidratos, cria-se a perspectiva de utilização das lectinas de plantas como compostos com potencial antineoplásico na terapêutica do câncer (LI et al., 2010).

### 1.2.2 Concanavalina-A

A lectina Concanavalina A (ConA), extraída das sementes de *Canavalia ensiformis*, foi a primeira lectina leguminosa a ser purificada e cristalizada em 1936 (SUMNER e HOWELL, 1936). Além de ter sido a primeira, ela é, também, a mais comum representante da família das lectinas leguminosas (LI et al., 2010).

ConA se apresenta como um tetrâmero (Figura 1), cujos monômeros são compostos por 237 resíduos de aminoácidos (LI et al., 2011). Os monômeros de ConA se associam em dímeros e esses dímeros formam tetrâmeros em pH maior que 5,5 ou permanecem como dímeros quando o pH for menor que 5,5 (AGRAWAL e GOLDSTEIN, 1965). A maioria das lectinas de leguminosas compartilham estrutura monomérica similar a ConA (SINHA et al., 2007). A lectina ConA é de ligação específica para a glicose e manose. A atividade de ligação entre ConA e esses açúcares é  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  dependente (LI et al., 2010).

Figura 1: Estrutura cristalográfica da lectina ConA. Fonte: Protein Data Bank.



Sendo a lectina leguminosa mais estudada, diversos trabalhos relatam os efeitos biológicos de ConA. Salienta-se que ConA induziu apoptose em fibroblastos (KULKARNI e MCCULLOCH, 1995),

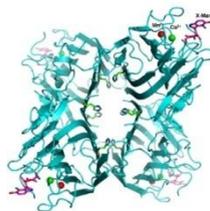
neurônios (CRIBBS et al., 1996), macrófagos da linhagem PU5-1.8 (SUEN et al, 2000), células A375 de melanoma humano e HepG2 de carcinoma hepatocelular humano (LIU et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que ConA liga-se preferencialmente a astrócitos reativos, por eles terem na membrana maior quantidade de oligossacarídeos ricos em manose (GERVASI et al., 2008), desencadeando morte celular apoptótica nessas células (YOSHIDA e NAGAI, 2009). Indução de morte celular autofágica por ConA foi mostrada em células de hepatoma (LI et al., 2010) e na linhagem de glioma U87 (PRATT et al., 2012). Muitos trabalhos mostram que tanto a apoptose quanto a autofagia induzida por ConA ocorrem de forma mediada por mitocôndria (CHANG et al., 2007; LIU et al., 2009; LI et al., 2010). Além da indução de apoptose e autofagia, ação anti-angiogênica e de imunomodulação também foram descritas para a ConA (LI et al., 2011).

Ensaio pré-clínico com ConA mostrou que ela tem efeito *in vivo* contra hepatocarcinoma, porém apresenta alguns efeitos tóxicos, como hepatite aguda em camundongos. Como opções para impedir os efeitos colaterais, pode-se citar modificações químicas e/ou mutações sítio-dirigidas ou o uso de peptídeo artificial com centro ativo de ConA (LIU et al., 2011).

### 1.2.3 Lectina da *Dioclea violacea*

A lectina extraída da semente de *Dioclea violacea* foi purificada pela primeira vez em 1996 por Moreira e colaboradores. Trata-se também de uma lectina leguminosa com afinidade por glicose/manose, que pertence a subtribo *Diocleinae*, a mesma da Concanavalina A (BEZERRA et al., 2013). Estruturalmente, DvioL (como é chamada a lectina da *Dioclea violacea*) pouco difere da ConA, apresentando-se em forma de tetrâmero (Figura 2) em pH fisiológico e de dímero em pHs mais ácidos. DvioL mostra-se relativamente mais resistente ao tratamento térmico, retendo 50% da sua atividade após 7,5 min a 60°C ou 5 min a 80°C (APARÍCIO et al., 1997).

Figura 2: Estrutura cristalográfica da lectina DvioL. Fonte: Protein Data Bank.



Os trabalhos utilizando DvioL mostram que esta lectina, em modelos animais, está envolvida com o processo inflamatório, tendo ação tanto anti-inflamatória (ASSREUY et al., 1997) quanto pró-inflamatória (ALENCAR et al., 2013). DvioL também induziu relaxamento em endotélio de aorta de rato (BEZERRA et al., 2013).

### 1.3 MORTE CELULAR

Basicamente pode-se dividir os tipos de morte celular em dois grupos: morte celular não programada e morte celular programada. A primeira delas, também chamada de necrose, é decorrente de fatores externos a células que provocam o comprometimento dos níveis celulares de respiração aeróbica, de síntese protéica, de manutenção da integridade das membranas celulares e de manutenção da capacidade de multiplicação celular, resultando por fim na morte da célula. Já a morte celular programada é um mecanismo celular intrínseco para eliminar células prejudiciais e garantir a manutenção da homeostase. As duas principais formas de morte celular programada são apoptose e autofagia (LOCKSHIN e ZAKERI, 2004).

Vários são os fatores que determinam o tipo de morte celular induzida por um determinado agente. Estes fatores incluem o tipo celular, o genótipo da célula, o microambiente em que ela se encontra, o tipo de dano induzido pelo agente, bem como a dose utilizada (TAN e WHITE, 2008).

#### 1.3.1 Necrose

A necrose é um tipo de morte celular desencadeada em resposta a um grande dano ou estresse físico, e é um processo não regulado de destruição celular traumática, caracterizada pela inflamação, ruptura da

membrana celular e consequente liberação dos componentes intracelulares. A necrose é um evento geralmente decorrente de infecções, inflamações ou isquemia, e o trauma acarretado causa alterações no transporte de íons, na produção energética e no equilíbrio do pH, os quais são essenciais na manutenção da homeostase celular (OKADA e MAK, 2004).

A morte celular necrótica é caracterizada morfológicamente por degradação do DNA, formato nuclear atípico com vacuolização, inchaço de organelas (KROEMER et al., 2009), vacuolização citoplasmática, ruptura da membrana plasmática e indução de inflamação nas células ao seu redor, causada pela liberação de moléculas pró-inflamatórias (EDINGER e THOMPSON, 2004). Bioquimicamente, ocorre ativação de calpaínas e catepsinas (KROEMER et al., 2009).

Como métodos para detecção da necrose destacam-se: ensaios baseados em substratos colorimétricos de lisados celulares, permeabilidade a corantes (azul de tripan e iodeto de propídio), citometria de fluxo e determinação de enzimas citosólicas (KROEMER et al., 2009).

Com a investigação crescente dos eventos relacionados à necrose e sua iniciação, outra via alternativa de morte celular emergiu, a necroptose. Este termo, necroptose, foi cunhado pela primeira vez em 2005, e refere-se à ocorrência de necrose como um evento programado e não somente passivo. Esta via vem sendo caracterizada nos últimos anos e já se sabe que está envolvida na patogênese de diversas doenças, tais como injúria isquêmica, neurodegeneração e infecção viral. O resultado celular envolve desintegração das membranas mitocondrial, lisossomal e plasmática e, portanto, pode ser considerada como um potencial alvo terapêutico alternativo a ser explorado (KREUZALER e WATSON, 2012).

### **1.3.2 Apoptose**

A apoptose, também conhecida como morte celular programada do tipo I (LI et al, 2010), é uma sinalização de morte celular altamente regulada e conservada evolutivamente que exerce um papel crítico no desenvolvimento e manutenção da homeostase tecidual (HASHIMOTO, 1996). Portanto, a apoptose refere-se à iniciação e execução dos eventos que levam a morte celular, sendo que a sua desregulação é encontrada em várias doenças, incluindo o câncer (HUSSEIN et al., 2003). A apoptose é um processo ativo desencadeado por uma variedade de

estímulos, que induzem alterações estruturais características (WHITE et al., 2004), sem causar danos inflamatórios (TAN e WHITE, 2008).

O início da cascata sinalizadora de apoptose pode ocorrer através de duas vias alternativas, via extrínseca ou via intrínseca. Ambas as vias desencadeiam uma resposta celular característica, efetivada pela ação de proteases cisteína-aspartil específicas, denominadas caspases (TAN e WHITE, 2008).

Na via extrínseca, a sinalização para morte celular inicia pela ação de um ligante aos receptores de morte na superfície celular (por exemplo, receptor de morte Fas), os quais são um subgrupo da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (GHOBRIAL et al., 2005). Pela interação com proteínas adaptadoras, eles formam um complexo sinalizador de indução de morte, a qual ativa a caspase-8, que provoca a clivagem da caspase-3, que é a proteína efetora de morte celular por apoptose (ZIEGLER e KUNG, 2008).

A via intrínseca, ou via mediada por mitocôndria, ocorre por meio de proteínas que regulam a função mitocondrial (TAN e WHITE, 2008). A família de proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2, atua na inibição da apoptose, enquanto as outras duas famílias, BAX e BH3, são pró-apoptóticas (ZIEGLER e KUNG, 2008). Diferentes estímulos intracelulares de dano e estresse podem dar início à sinalização para morte celular pela via mitocondrial, tais como dano ao DNA, ausência ou deficiência de fatores de sobrevivência, hipóxia, alta concentração de cálcio intracelular, crescimento acelerado, entre outros. Desta maneira, a membrana externa da mitocôndria é permeabilizada, liberando citocromo c, bem como outras proteínas pró-apoptóticas. O citocromo c aumentado no citosol liga-se ao fator ativador de protease apoptótica (APAF-1) e a caspase-9 formando o apoptossomo, o qual ativa a caspase-3 efetora, resultando na destruição das estruturas subcelulares, organelas e genoma (TAN e WHITE, 2008).

As caspases (proteínases cisteinil-aspartato específicas) são um dos principais executores do processo apoptótico e se encontram na forma de zimogênios inativos (PORTER e JANICKE, 1999). A Caspase-9 exerce um papel central na morte celular induzida por uma ampla variedade de indutores de apoptose, incluindo, por exemplo, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ). Caspase-9 cliva e ativa as caspases efetoras apicais, como caspase-3 que é um executor fundamental de apoptose, sendo responsável, em parte ou totalmente, pela clivagem proteolítica de muitas proteínas chaves, sendo que a forma ativada de caspase-3 é um marcador de células em apoptose (LIN, 2001; ESMEKAYA et al., 2010).

Outra marca bioquímica característica de apoptose é a exposição da fosfatidilserina (KROEMER et al., 2009). Para que os corpos apoptóticos sejam fagocitados e removidos pelos macrófagos é necessário que eles sejam marcados para sofrerem fagocitose. A sinalização para marcação destas células constitui na translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana plasmática, o que evita a ocorrência de processos inflamatórios dos tecidos vizinhos, diferentemente do que ocorre na necrose (HAIL et al., 2006).

Durante a execução de apoptose, a cromatina altera a forma geneticamente ativa para uma forma altamente condensada, inerte, que é fragmentada e empacotada em corpos apoptóticos. O grau notável de compactação observada, juntamente com o fato de que a condensação da cromatina apoptótica não envolve a formação de cromossomos, sugere que as células têm um sistema específico para a indução de condensação da cromatina na apoptose (TONÉ et. al, 2007). Além da condensação da cromatina, ocorre a condensação do núcleo (picnose nuclear) com massas de cromatina marginalizadas na membrana nuclear interna (MARTÍN et al., 2014), formação de bolhas na membrana (GHOBRIAL et al., 2005), e por fim, a fragmentação nuclear (KROEMER et al., 2009).

Outras características típicas da apoptose incluem encolhimento citoplásmico, zeiosis (formação de protuberâncias na membrana plasmática, ocasionada pela dissociação do citoesqueleto com a membrana), vacúolos citoplasmáticos (principalmente peri-nucleares) e vesículas lipídicas (ABBATE et al., 2007). Ocorre inchaço e desarranjo mitocondrial, com perda e desorganização das cristas mitocondriais (ESMEKAYA et al., 2010). O passo final da apoptose é caracterizado por hidratação celular massiva, após a degradação dos corpos apoptóticos por lisossomos (WHITE et. al, 2004). Células apoptóticas típicas não têm ruptura de membrana plasmática (diferente de células necróticas), porém células apoptóticas com degeneração secundária são caracterizadas por ruptura de membrana plasmática (MAJNO et al., 1995; HAYAKAWA et al., 2002).

Como métodos de identificação de células apoptóticas, pode-se citar a dupla coloração com Anexina V/Iodeto de Propídeo (KROEMER et al., 2009) e atividade de caspases como caspase-9 e caspase-3 (ESMEKAYA et al., 2010).

### 1.3.3 Autofagia

Autofagia é um processo dinâmico e conservado evolutivamente de degradação em massa de proteínas e organelas celulares (DEGTYAREV et al., 2014). Portanto, é um processo catabólico de auto-degradação e reciclagem dos componentes celulares através da maquinaria lisossomal e exerce um importante papel tanto fisiologicamente na manutenção, diferenciação e defesa celular, controle de crescimento, remodelação do tecido e aclimação (RUBINSZTEIN et al., 2007)), quanto em doenças (RABINOWITZ e WHITE, 2010). Existem três tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (DEGTYAREV et al., 2009).

Os primeiros estudos identificaram a autofagia como uma resposta adaptativa das células à privação de nutriente para assegurar funções de manutenção mínimas (SHEN et al., 2014). Embora a autofagia sirva como um mecanismo de sobrevivência celular contra a escassez de nutrientes, ela pode agir também, paradoxalmente, como um percurso de morte para eliminar células danificadas e deletérias em condições específicas (LI et al., 2010). Em comparação com a apoptose, a morte celular autofágica é também conhecida como morte celular programada do tipo II (RUBINSZTEIN et al., 2007).

Em células tumorais, o papel da autofagia pode depender do tipo de tumor e da fase da tumorigênese (XU et al., 2015). A autofagia pode, portanto, ser promotora de tumor, por exercer função de reciclagem celular, provendo substratos para o metabolismo e a manutenção mitocondrial, como também pode ser supressora tumoral, através da eliminação de substratos de proteínas oncogênicas e organelas (KREUZALER e WATSON, 2012). Assim, a opinião atual sobre o papel da autofagia na tumorigênese é que ela pode ser um supressor de tumor ou um promotor tumoral, dependendo do tipo e estágio do câncer (BHUTIA et al., 2013). Logo, a modulação adequada, suprimindo a autofagia citoprotetora ou promovendo a morte autofágica, poderia aumentar a citotoxicidade da terapia antineoplásica nas células tumorais (XU et al., 2015). Por tais razões, é necessário que se defina o papel específico da autofagia em cada contexto para que se possa ponderar a intervenção terapêutica adequada (KREUZALER e WATSON, 2012).

Durante a última década, uma enorme quantidade de informação foi obtida sobre a autofagia, provando que lesão celular, acumulação de organelas ou membranas danificadas e inclusões intracelulares podem ativar a via autofágica. O mecanismo molecular da autofagia está associado a múltiplas e complexas vias em diferentes condições (SHEN

et al., 2014). A ativação fora dos níveis basais desta via pode se dar em resposta à privação nutricional, alta demanda energética e reposta aos estímulos de estresse, nos quais as células necessitam retirar proteínas ou organelas danificadas ou mesmo patógenos intracelulares (AMARAVADI et al., 2011).

As características bioquímicas do processo autofágico incluem a indução por Beclina-1, dependente dos produtos dos genes atg, como Atg5 e Atg7 (DEGTYAREV et al., 2014), e consequente conversão de LC3-I a LC3-II (KROEMER et al., 2009), que permite a formação de autofagossomos. Este processo pode ser desencadeado por estresse do retículo endoplasmático (YIN et al., 2012; SHEN et al., 2014) ou inibição da sinalização PI3K/Akt/mTOR (DEGTYAREV et al., 2009). As células que sofrem autofagia excessiva são induzidas a morrer, de um modo independente da apoptose, o que acaba por caracterizar uma morfologia diferenciada daquelas que morrem por necrose ou apoptose (OKADA e MAK, 2004).

Durante a autofagia, porções do citoplasma e organelas são sequestrados de maneira ampla e inespecífica (RUBINSZTEIN et al., 2007) pelas cisternas do complexo de Golgi ou por alongamentos de estruturas originárias do retículo endoplasmático, formando as vesículas autofágicas (autofagossomos). O autofagossomo é acidificado, possibilitando a fusão com lisossomos, que origina o autolisossomo, que degradará o conteúdo presente no autofagossomo (OKADA e MAK, 2004). No citoplasma são observados esses autofagossomos formados por um envelope de membrana dupla ou membrana de múltiplas camadas, bem como lisossomos secundários (autolisossomos) com conteúdo heterogêneo ou material de membrana, podendo haver acúmulo de partículas lipídicas no citoplasma decorrente da degeneração das mitocôndrias (RAJAGOPALAN et al., 2014). No estágio final do processo de morte autofágica, as células sofrem lise celular, com derrame para o meio dos componentes do citoplasma, incluindo lisossomos secundários (MARTÍN et al., 2014). Na autofagia, a cromatina nuclear não está condensada e a integridade nuclear e membranas celulares ficam preservadas até o último estágio do processo autofágico (KROEMER et al., 2009).

Os métodos atuais para medir a autofagia incluem a contagem baseada em microscopia ou quantificação por citometria de fluxo de vacúolos autofágicos corados com compostos acidotrópicos, como o laranja de acridina, e quantificação dos níveis de Beclina-1 e LC3 (DEGTYAREV et al., 2014). Ressalta-se que um aumento nos autofagossomos e consequentemente em LC3-II, pode também ser

devido a um bloqueio nos estágios finais de autofagia (ex. fusão de autofagosomos com lisossomos), representando uma inibição do fluxo autofágico, portanto esse fato deve ser levado em consideração ao se analisar os resultados de quantificação de vesículas ácidas e LC3 (RIOS-MARCO et al., 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito citotóxico de lectinas extraídas de plantas leguminosas sobre culturas de células de glioma C6, com ênfase nos tipos de morte celular necrótica, apoptótica e autofágica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito citotóxico de 13 lectinas leguminosas em cultura celular de glioma da linhagem C6, através de curvas de concentração e de tempo, utilizando o teste de redução do MTT e, a partir dos resultados, escolher 2 lectinas para prosseguir com os estudos.
- b) Avaliar o efeito das lectinas sobre o ciclo celular de células de glioma C6.
- c) Avaliar efeito das lectinas em induzir morte celular necrótica sobre células de glioma C6.
- d) Avaliar efeito das lectinas em induzir morte celular apoptótica sobre células de glioma C6.
- e) Avaliar efeito das lectinas em induzir morte celular autofágica sobre células de glioma C6.
- f) Analisar aspectos morfológicos e características de morte celular por microscopias óptica e eletrônica.

### 3 MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 CULTURA DE CÉLULAS

Para realização dos experimentos utilizou-se células de glioma de rato Wistar (*Rattus norvegicus*) da linhagem C6, glioma obtido pela indução da carcinogênese por N-nitrosometilureia sobre células astrocíticas (BENDA et al., 1968). As células foram mantidas em cultura em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37 °C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Ao atingir confluência de 80% eram repicadas utilizando tripsina. Para a realização dos experimentos, utilizou-se da 3<sup>a</sup> a 18<sup>a</sup> passagem e o número de células foi padronizado para os ensaios por meio de contagem em câmara de Neubauer.

#### 3.2 LECTINAS

As lectinas utilizadas foram extraídas das sementes das seguintes leguminosas: *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia maritima* (ConM), *Canavalia oxyphylla* (CoxyL), *Canavalia grandiflora* (ConGF), *Dioclea sclerocarpa* (DSL), *Dioclea wilsonii* (DwL), *Dioclea violacea* (DvioL), *Dioclea marginata* (DmrL), *Dioclea lasiocarpa* (DLL), *Dioclea reflexa* (DrfL) e *Centrolobium tomentosum* (CTL). O isolamento das sementes e o fracionamento das lectinas seguiram os métodos clássicos descritos previamente por Moreira e Cavada em 1984, que incluem precipitação com sulfato de amônio e cromatografia por afinidade em Sephadex G-50. A pureza da lectina foi verificada por SDS-PAGE mostrando uma única banda. A lectina DSL, além de ser obtida pelo isolamento das sementes de *Dioclea sclerocarpa*, também foi produzida por técnica de proteína recombinante através de bactérias (DSL [R]). Portanto, utilizou-se 13 lectinas nesse trabalho. A purificação ou produção recombinante das lectinas foi realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), coordenado pelo professor Benildo Sousa Cavada.

##### 3.2.1 Diluição, Desnaturação e Bloqueio

As lectinas usadas nos tratamentos foram diluídas em tampão HEPES-salina sem glicose. Para determinar se a ação da lectina é

depende da integridade de sua estrutura proteica, as lectinas diluídas foram desnaturadas antes do tratamento por fervura (100°C) em banho-seco durante 10 min. A fim de bloquear o domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina, a proteína foi dissolvida em tampão HEPES-salina sem glicose, contendo 0,1 M de seu açúcar ligante específico ( $\alpha$ -metil-D-manosídeo) e mantida durante 30 min a 37 °C antes do tratamento.

### 3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio utilizado para avaliar a viabilidade celular foi o teste colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), proposto por Mosmann (1983). Para tal, placas de 96 poços foram semeadas com 0,1mL de suspensão de células C6 com densidade de 50.000 células/mL. As placas foram incubadas por 24h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência. Após 24 h, o meio foi substituído por um novo meio acrescido de veículo (controle) ou lectina nas concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 1, 3, 6, 12, 24 ou 48h, dependendo do tempo de tratamento. Passado o período de tratamento, o conteúdo de cada poço foi substituído por 100µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão HBSS). As placas foram incubadas por 1h a 37°C. Em seguida, o meio contendo MTT foi retirado e adicionou-se 100 µL de DMSO por poço para a dissolução dos cristais de formazana. Após 30 min a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN) a 540 nm.

Os valores de absorbância, medidos para cada concentração de cada amostra, foram transformados em porcentagens de viabilidade celular, em relação à média dos controles celulares, considerados 100% viáveis. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempo testados.

Os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras foram inseridos em gráficos, e através de análise de regressão logarítmica, calculou-se a CI<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra que inibiu a proliferação celular em 50%, quando comparada ao controle celular não tratado.

### 3.4 CICLO CELULAR

Baseado na metodologia proposta por Riccardi e Nicoletti (2006), placas de 12 poços foram semeadas com 1mL de células C6 na densidade de 250.000 células/mL e incubadas a 37 °C em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h até confluência. Após esse período, o meio foi substituído por um novo meio acrescido de veículo (controle) ou lectina nas concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 6 ou 24h. Passado o tempo de tratamento, as células foram ressuspensas dos poços por meio de dissociação química (300 µL/poço de tripsina 0,25%), coletadas e lavadas 2X com solução tampão salina (PBS), centrifugadas a 500 rpm por 5 min e fixadas com etanol 70% por 30 min a -4°C. Após fixação, uma solução contendo 50 µg/mL de RNase e 100µg/mL de iodeto de propídeo foi adicionada às células, e as mesmas foram incubadas ao abrigo de luz por 30 min, à temperatura ambiente. Após este período, as células foram analisadas em citômetro de fluxo, com registro de 20.000 eventos para cada amostra. A partir dos dados obtidos, a população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o software Flowing®. Foram realizados 3 experimentos independentes.

### 3.5 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

O potencial de membrana mitocondrial foi mensurado por meio de sonda fluorescente tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE). Para tanto, placas de 96 poços foram semeadas com 0,1mL de suspensão de células C6 com densidade de 50.000 células/mL. As placas foram incubadas por 24h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência. Após 24 h, o meio foi substituído por um novo meio acrescido de veículo ou lectina nas concentrações 10, 30, 50 e 100µg/mL e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 3, 6 ou 12h. Passado o período de tratamento, o meio foi substituído por 100µL de uma solução de TMRE a 10nM. Protegida da luz, as placas ficaram em estufa a 37°C por 20 min. As células foram lavadas 1X com PBS e, a seguir, foi adicionado 100µL/poço desse mesmo tampão. Realizou-se leitura da fluorescência por Multileitora Infinite M200 (Tecan) utilizando excitação de 550nm e emissão 590nm. Os valores da fluorescência, medidos para cada poço, foram transformados em porcentagens, em relação à média dos controles celulares, considerados como 100%. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempo testados.

### 3.6 ATIVIDADE DE LACTATO DESIDROGENASE

A atividade da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) foi avaliada no meio de cultura celular, conforme descrito por Rosa e colaboradores (1997). Para isso, placas de 96 poços foram semeadas com 0,1mL de suspensão de células C6 com densidade de 50.000 células/mL. As placas foram incubadas por 24h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência. Após 24 h, o meio foi substituído por um novo meio acrescido de veículo ou lectina nas concentrações 10, 30, 50 e 100µg/mL e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 12 ou 24h. Passado o período de tratamento, 50µL de meio de cada poço foi transferido para outra placa de 96 poços. Nessa nova placa, adicionou-se 200µL do tampão fosfato de potássio 0,5M acrescido de piruvato, NaHCO<sub>3</sub> e NADH. Leitura da cinética da atividade enzimática foi realizada por Multileitora Infinite M200 (Tecan). Controle positivo consistiu em incubar o poço por 15 min em estufa a 37°C com Triton-X100 0,02%, antes de retirar os 50µL de meio. Os valores da variação de fluorescência do NADH, medidos para cada poço, foram transformados em porcentagens, em relação à média dos controles positivos, considerados como 100%. Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempo testados.

### 3.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Porcentagem de células com lesão de membrana foi determinado por microscopia de fluorescência utilizando Hoeschst e Iodeto de Propídio (IP). Para isso, placas de 96 poços foram semeadas com 0,1mL de suspensão de células C6 com densidade de 50.000 células/mL. As placas foram incubadas por 24h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência. Após 24 h, o meio foi substituído por um novo meio acrescido de veículo ou lectina nas concentrações 10, 30, 50 e 100µg/mL e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 6 ou 24h. Passado o período de tratamento, o meio foi substituído por 50µL de uma solução de IP a 80µg/mL. Após incubação de 10 min em estufa a 37°C, 1µL de Hoechst (1mg/mL em tampão PBS) foi adicionado em cada poço, e a placa ficou mais 5 min na estufa a 37°C. Terminada a incubação, foram capturadas as imagens por meio de microscópio de fluorescência invertido. Os comprimentos de onda de excitação e emissão de IP e Hoechst foram 530/350 e 580/460 nm

respectivamente. A quantificação da fluorescência foi realizada utilizando o programa ImageJ. Os resultados são mostrados como porcentagem da média de fluorescência de IP pela média de fluorescência de Hoechst, como anteriormente descrito (EGEA et al., 2011). Foram realizados 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempo testados.

### 3.8 MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

#### 3.8.1 Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio

Anexina V-FITC, ligando-se a fosfatidilserina externalizada, e Iodeto de Propídio, corando células com membranas rompidas, foram utilizados concomitantemente para pesquisa de apoptose e necrose. Para isso, placas de 12 poços foram semeadas com 1mL de células C6 na densidade de 250.000 células/mL e incubadas a 37 °C em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h até confluência. Após esse período, o meio foi substituído por um novo meio acrescido de veículo ou lectina nas concentrações 10, 30, 50 e 100µg/mL e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 6 ou 24h. Passado o tempo de tratamento, as células foram ressuspensas dos poços por meio de dissociação química (300 µL/poço de tripsina 0,25%), lavadas com PBS e incubadas com tampão de ligação e Anexina V-FITC, por 15min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, adicionou-se iodeto de propídeo e realizou-se a análise em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, USA), registrando-se 20.000 eventos para cada amostra. Os dados obtidos foram analisados em software Flowing®. Foram realizados 3 experimentos independentes.

#### 3.8.2 Laranja de Acridina

Quantificação dos vacúolos ácidos corados com laranja de acridina foi realizada por citômetro de fluxo. Para isso, placas de 12 poços foram semeadas com 1mL de células C6 na densidade de 250.000 células/mL e incubadas a 37 °C em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h até confluência. Após esse período, o meio foi substituído por um novo meio acrescido de veículo ou lectina nas concentrações 10, 30, 50 e 100µg/mL e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 6 ou 24h. Passado o tempo de tratamento, as células foram ressuspensas dos poços por meio de dissociação química (300 µL/poço

de tripsina 0,25%), coradas com laranja de acridina 0,1µg/mL e incubadas por 30 min em estufa a 37°C. Terminada a incubação, as células foram lavadas com PBS e analisadas por citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, USA), registrando-se 20.000 eventos para cada amostra. Os dados obtidos foram analisados em software Flowing®. Foram realizados 3 experimentos independentes.

### 3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A fim de uma análise morfológica ao nível de organelas citoplasmáticas, realizou-se microscopia eletrônica. Garrafas de 25cm<sup>2</sup> foram semeadas com 5mL de células C6 na densidade de 600.000 células/mL e incubadas a 37 °C em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após esse período, o meio foi substituído por um novo meio acrescido de veículo ou lectina na concentração de 30µg/mL e as garrafas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Passado o tempo de tratamento, as células foram ressuspensas das garrafas por meio de dissociação química (1mL/garrafa de tripsina 0,25%), lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 4%. As amostras foram enviadas ao Centro de Microscopia Eletrônica - FCM da Universidade Nacional de Córdoba (UNC), onde foram realizados os procedimentos de inclusão, cortes e visualização em microscópio eletrônico.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism versão 5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados apresentados possuem distribuição normal, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ) e, desta forma, foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido por teste pos-hoc de Newman-Keuls e Bonferroni, respectivamente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE LECTINAS LEGUMINOSAS

A atividade citotóxica de 13 lectinas (ConA, ConBr, ConM, ConGF, CoxyL, DwL, DvioL, DmrL, DLL, DrfL, DSL, DSL [R] e CTL) foi avaliada, através do teste de redução do MTT, após 24 horas de incubação com as células de glioma C6. Os resultados mostraram que todas as lectinas testadas, exceto CTL, causaram diminuição da viabilidade na concentração mais alta (100µg/ml). A concentração de 50µg/mL foi também efetiva para a grande maioria das lectinas testadas, exceto ConGF e DSL (nativa) que nessa concentração não induziram alteração da viabilidade das células C6. Entretanto, na concentração de 30µg/mL somente ConA, ConBr e DvioL induziram queda de viabilidade das células C6 (Figura 3). A partir desses resultados, calculou-se a  $CI_{50}$ , cujos valores são apresentados na tabela 1.

Figura 3: Viabilidade celular, pelo teste de redução do MTT, de células C6 expostas ao veículo (controle) ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL de 13 lectinas leguminosas por 24 horas. ANOVA de uma via seguida por teste pos-hoc de Newman-Keuls. \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle (veículo).

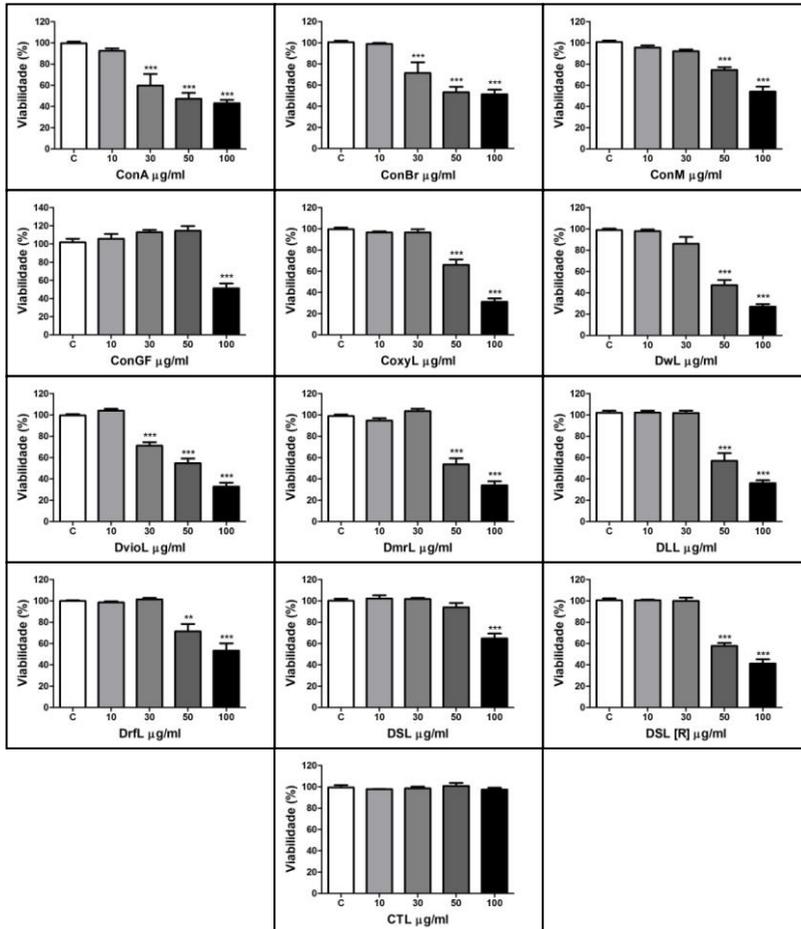


Tabela 1: Cálculo do  $CI_{50}$  para as lectinas do estudo sobre células de glioma C6.

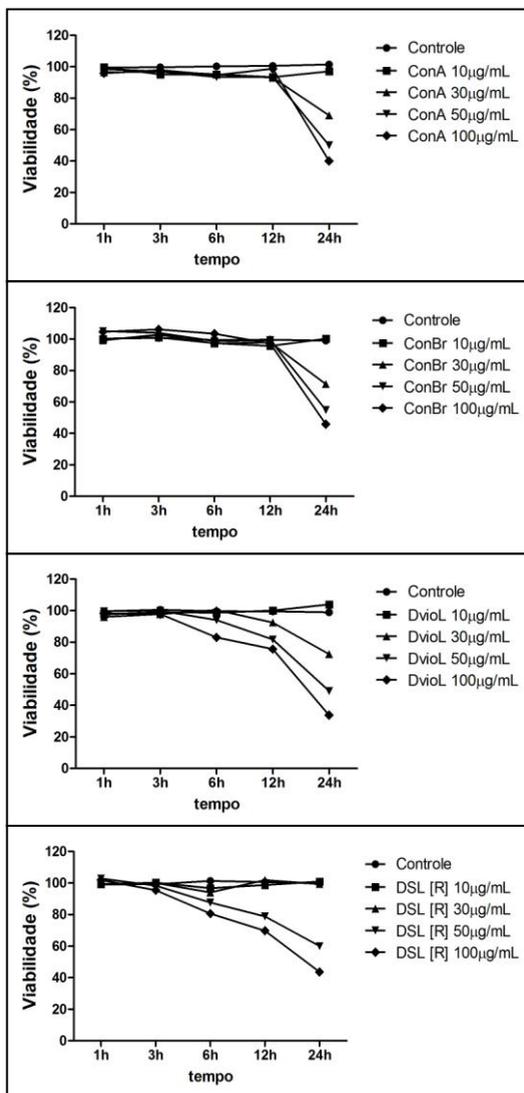
Lectina	Leguminosa	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intervalo 95% de confiança	Subtribo
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	56,02	39,21 - 80,03	<i>Diocleinaeae</i>
ConBr	<i>Canavalia brasiliensis</i>	63,36	48,03 - 83,58	<i>Diocleinaeae</i>
ConM	<i>Canavalia maritima</i>	110,5	91,43 - 133,6	<i>Diocleinaeae</i>
ConGF	<i>Canavalia grandiflora</i>	100,2	[muito amplo]	<i>Diocleinaeae</i>
Coxyl	<i>Canavalia oxyphylla</i>	70,08	63,50 - 77,35	<i>Diocleinaeae</i>
DwL	<i>Dioclea wilsonii</i>	55,42	47,77 - 64,28	<i>Diocleinaeae</i>
DvioL	<i>Dioclea violacea</i>	58,84	51,14 - 67,70	<i>Diocleinaeae</i>
DmrL	<i>Dioclea marginata</i>	67,25	55,21 - 81,91	<i>Diocleinaeae</i>
DLL	<i>Dioclea lasiocarpa</i>	70,51	58,32 - 85,25	<i>Diocleinaeae</i>
Drfl	<i>Dioclea reflexa</i>	102,3	78,71 - 132,9	<i>Diocleinaeae</i>
DSL	<i>Dioclea sclerocarpa</i>	119,7	102,2 - 140,3	<i>Diocleinaeae</i>
DSL [R]	<i>Dioclea sclerocarpa</i> [recombinante]	76,1	64,28 - 90,09	<i>Diocleinaeae</i>
CTL	<i>Centrobium tomentosum</i>	-	-	outra

Nota-se que a única lectina que não teve nenhum grau de efeito na redução da viabilidade nas células C6 foi a CTL. Apesar do sítio de ligação da CTL ser manose/glicose, como as demais lectinas, o que difere a lectina CTL das outras é que ela foi a única lectina testada que não pertence à subtribo *Diocleinae*. Isso sugere que não apenas a especificidade ao glicano é importante para o efeito biológico da lectina sobre as células C6, mas também a estrutura terciária. Ressalta-se que essa característica de estrutura é similar entre todas as lectinas da subtribo *Diocleinae*, uma vez que as lectinas dessa subtribo são caracterizadas por alta identidade entre as suas sequências de aminoácidos (BEZERRA et al., 2013). As outras lectinas avaliadas pelo teste do MTT são consideradas ConA-like, uma vez que são de especificidade manose/glicose e foram isoladas de sementes de plantas da sub-tribo *Diocleinae*. Apesar da altíssima homologia de sequência entre as lectinas ConA-like, diferenças significativas tem sido observadas em relação a potência dessas proteínas em várias atividades biológicas, como mostrado na figura 3.

Comparando as duas formas de obtenção da lectina DSL, purificada de sementes ou recombinante, nota-se que a forma recombinante foi mais efetiva em reduzir a viabilidade das células C6, sugerindo que, talvez, a obtenção por meio de engenharia genética resulte em melhores efeitos biológicos. Acredita-se que essa diferença deva-se ao fato de que a lectina recombinante representa apenas uma isoforma da proteína enquanto a lectina purificada pode conter mais de uma isoforma. Ao diluir as lectinas em tampão HEPES, as lectinas obtidas por meio de purificação demoravam algum tempo (em torno de 3 a 5 min) para serem diluídas e formavam uma solução sutilmente turva (quase límpida). Diferentemente, DSL recombinante diluiu instantaneamente quando em contato com o tampão HEPES e a solução resultante teve aspecto transparente.

Diante dos resultados da figura 3, as lectinas ConA, ConBr, DvioL e DSL recombinante foram escolhidas para realizar o mesmo teste do MTT, porém também nos tempos 1, 3, 6 e 12 horas (Figura 4).

Figura 4: Viabilidade celular, pelo teste de redução do MTT, de células C6 expostas ao veículo (controle) ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL de ConA, ConBr, DviolL e DSL [R] após 1, 3, 6, 12 e 24h de tratamento. ANOVA de duas vias seguida por teste pos-hoc de Bonferroni.



A figura 4 revela que ConA e ConBr não foram eficazes em reduzir a viabilidade celular nos tempos inferiores a 24h. ConA e ConBr só mostram redução significativa da viabilidade nas concentrações 30, 50 e 100µg/mL após 24h de tratamento ( $p<0,001$ ). Nota-se uma semelhança de efeito entre essas duas lectinas, que decorre, provavelmente, da alta homologia estrutural entre elas (CAVADA et al., 2001), que possuem 99% de homologia em suas sequências de aminoácidos (SANZ-APARICIO et al., 1997). A lectina DvioL mostrou uma ação mais potente ao reduzir a viabilidade de forma significativa nas concentrações de 50 e 100µg/mL ( $p<0,001$ ) após 12 horas de tratamento e na concentração 100µg/mL ( $p<0,001$ ) com 6h de exposição sobre células C6, além da redução com as concentrações de 30, 50 e 100µg/mL ( $p<0,001$ ) após 24h de tratamento como apresentado também na figura 3. Por fim, a forma recombinante de DSL reduziu significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 50 e 100µg/mL após 6h ( $p<0,01$  e  $0,001$  respectivamente), 12h ( $p<0,001$ ) e 24h ( $p<0,001$ ). Apesar de DSL recombinante apresentar um efeito na redução do MTT já com 6h e isso soar promissor, a sua concentração de 30µg/mL não foi eficaz em 24h, diferente do que aconteceu com 30µg/mL de ConA, ConBr e DvioL.

Dessas quatro lectinas, foram escolhidas duas (ConA e DvioL) para realizar um estudo mais detalhado em relação a indução de morte celular. ConA foi escolhida por ser a mais estudada e a única lectina, até então, com resultados de indução de morte em células de glioma (PRATT et al., 2012). DvioL foi escolhida por mostrar um efeito mais expressivo em relação à ConA e por ter sido obtida da mesma forma que a ConA, ambas por purificação da semente.

Na literatura há controvérsias sobre quem é o principal responsável pela redução do MTT. Há trabalhos apontando a desidrogenase succinica mitocondrial, e outros, mais atuais, dizendo que o MTT é principalmente reduzido no citosol pelo NADH (e em menor quantidade pelo NADPH) além de desidrogenases associadas ao retículo endoplasmático (RE) (BERRIDGE et al., 2005, STOCKERT et al., 2012). Independente de quem seja o principal redutor do MTT, esse processo só ocorre em células metabolicamente ativas e, por conta disso, é amplamente aceito que a quantidade de formazana (produto de cor roxa resultante da redução do MTT) é diretamente proporcional ao número de células vivas (VAN MEERLOO et al., 2011).

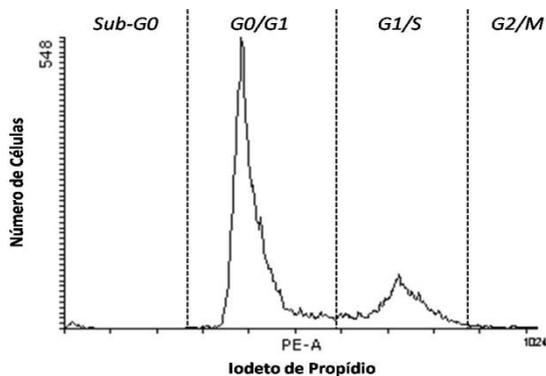
Diminuição da viabilidade indicada pelo teste de redução do MTT pode ocorrer por morte das células e/ou atraso do ciclo celular. Portanto o tratamento com as lectinas está matando as células e/ou

impedindo que as células de glioma C6 se proliferem. Por conta disso, avaliou-se o efeito de ConA e Dvioleta sobre o ciclo celular e sobre a indução de necrose, apoptose e autofagia.

#### 4.2 ConA E Dvioleta NÃO ALTERAM O CICLO CELULAR DE CÉLULAS C6

Após os tratamentos por 6 ou 24h com ConA e Dvioleta, as células C6 foram fixadas e seu material genético foi corado com iodeto de propídio (IP). Após análise por citômetro de fluxo os dados foram mostrados em histogramas nos quais o eixo  $y$  representa o número de células e o eixo  $x$  a intensidade de fluorescência de IP, portanto, quanto maior a marcação para IP, maior a quantidade de material genético. A partir dos histogramas do grupo controle, se estima as fases do ciclo celular, conforme ilustrado na figura 5.

Figura 5: Representação de histograma *números de células vs. IP* com as fases do ciclo celular correspondentes



Através da quantificação da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foram obtidos os gráficos das figuras 6 e 7.

Figura 6: Ciclo celular de células C6 expostas às concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg/mL de ConA ou Dvioleta após 6 h de tratamento. ANOVA de duas vias seguida por teste pos-hoc de Bonferroni.

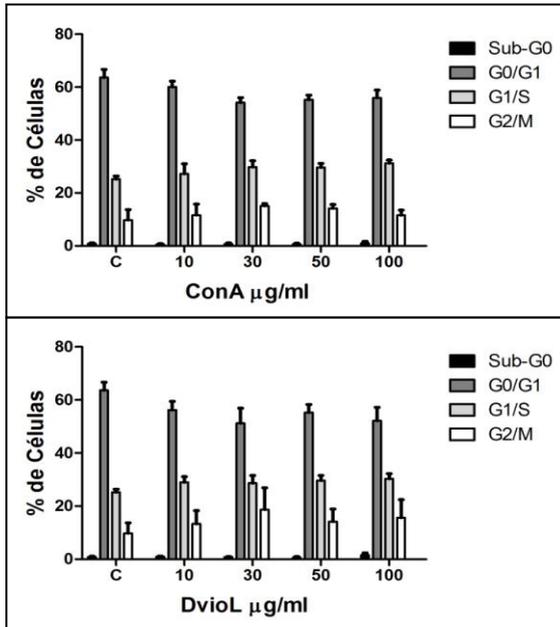
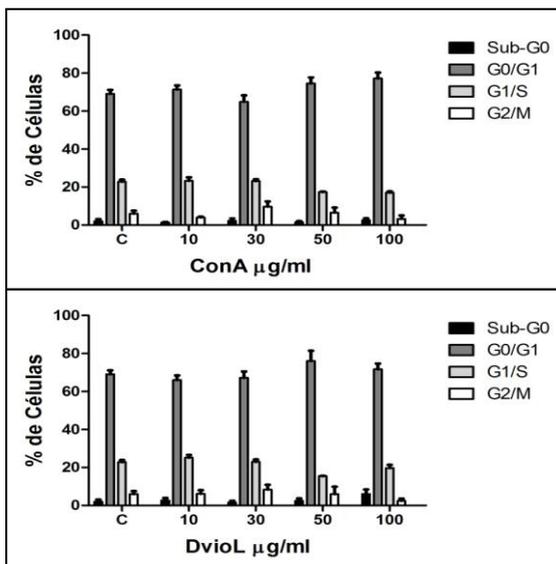


Figura 7: Ciclo celular de células C6 expostas às concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL de ConA ou DvioL após 24 h de tratamento. ANOVA de duas vias seguida por teste pos-hoc de Bonferroni.



Nota-se que, independente da dose de lectina utilizada, o padrão de distribuição das células pelas fases do ciclo celular é o mesmo nos diferentes grupos, indicando que ConA e DvioL não afetam o ciclo celular das células de glioma da linhagem C6. Portanto, a diminuição da viabilidade celular pelo teste de redução do MTT, deve-se provavelmente à morte das células. Comparando os gráficos de 6h com 24h, percebe-se que há maior quantidade de células em divisão celular com 6h (os picos G2/M são maiores). Como explicação a esse fato, a hipótese levantada é que no gráfico de 6h as células estejam ainda em fase exponencial de crescimento, e no de 24h, em fase estacionária.

Uma das características clássicas do câncer é a ativação da capacidade replicativa, ou seja, a proliferação celular descontrolada (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Desta maneira, a capacidade de inibir esta progressão contínua de tais células (efeito citostático) é uma característica desejável para um potencial fármaco anticâncer (SHERR, 1996). Embora a ConA não tenha afetado o ciclo das células C6, foi publicado que ela aumenta a população celular na fase G1 em células estromais de medula (CURRIE et al., 2007).

Proteínas conhecidas como cinases dependentes de ciclinas (CDKs do inglês *cyclin-dependent kinases*) são as principais controladoras da proliferação celular. Cada subtipo de CDK é ativado por uma ciclina diferente, e os pares individuais ciclina-CDK coordenam a progressão através de diferentes estágios do ciclo celular. Os pares ciclina-CDK são inibidos por inibidores de CDK (CDKIs), e a progressão do ciclo celular é o resultado do balanço entre sinais "liga" (ciclinas) e "desliga" (CDKIs) (CHERRY et al., 2014).

#### 4.3 ConA E Dvioleta INDUZEM MORTE CELULAR EM CÉLULAS C6

Com os resultados obtidos nos ensaios de ciclo celular, conclui-se que a redução da viabilidade celular observada pelo teste do MTT (Figura 4) não é decorrente de um atraso do ciclo das células C6, portanto, resta a hipótese de que as lectinas estejam induzindo morte nessas células tumorais. A fim de comprovar essa hipótese ensaios de citometria de fluxo foram realizados para determinar três tipos de mortes celulares: apoptose, necrose e autofagia.

O primeiro ensaio consistiu na dupla marcação com os fluorescentes anexina V-FITC e iodeto de propídio, que é utilizada para diferenciar células necróticas de apoptóticas, conforme preconizado e recomendado para a caracterização desses dois tipos de morte celular (TUSCHL e SCHWAB, 2005; KROEMER, et al., 2009). Os resultados são apresentados na forma de *Dot Plots* (gráfico de pontos, nos quais cada ponto representa uma célula). O eixo x representa a marcação com anexina V-FITC, ou seja, células que exteriorizaram a fosfatidilserina (indício de apoptose), enquanto que o eixo y mostra células marcadas com iodeto de propídio, ou seja, células com lesão de membrana (indício de necrose). Pelo controle, divide-se o gráfico de pontos em quatro quadrantes: inferior esquerdo, inferior direito, superior direito e superior esquerdo. O quadrante inferior esquerdo separa as células que não foram marcadas com nenhum dos fluorescentes, ou seja, células viáveis. O inferior direito representa as células marcadas apenas com anexina V-FITC, enquanto o superior esquerdo, aquelas marcadas apenas com iodeto de propídio. O quadrante superior direito é aquele que mostra as células duplo-marcadas, tanto com anexina V-FITC quanto com iodeto de propídio.

Os resultados são apresentados em porcentagem de células em cada quadrante, por *Dot Plots* representativos (Figuras 8 e 9) e pelas tabelas 2 e 3. Conforme o tratamento desloca as células para os

quadrantes direitos (aqueles marcados por anexina V-FITC) conclui-se que há processo apoptótico, sendo que algumas correntes classificam o quadrante inferior direito como apoptose recente e o superior direito como apoptose tardia. Tratamentos que deslocam a população de células para o quadrante superior esquerdo são aqueles ditos indutores de morte celular necrótica, visto que houve lesão de membrana nas células (TUSCHL e SCHWAB, 2005).

Figura 8: Dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio por citometria de fluxo de células C6 tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 ou 100 $\mu$ g/mL de ConA ou Dviol por 6 h. *Dot plots* representativos.

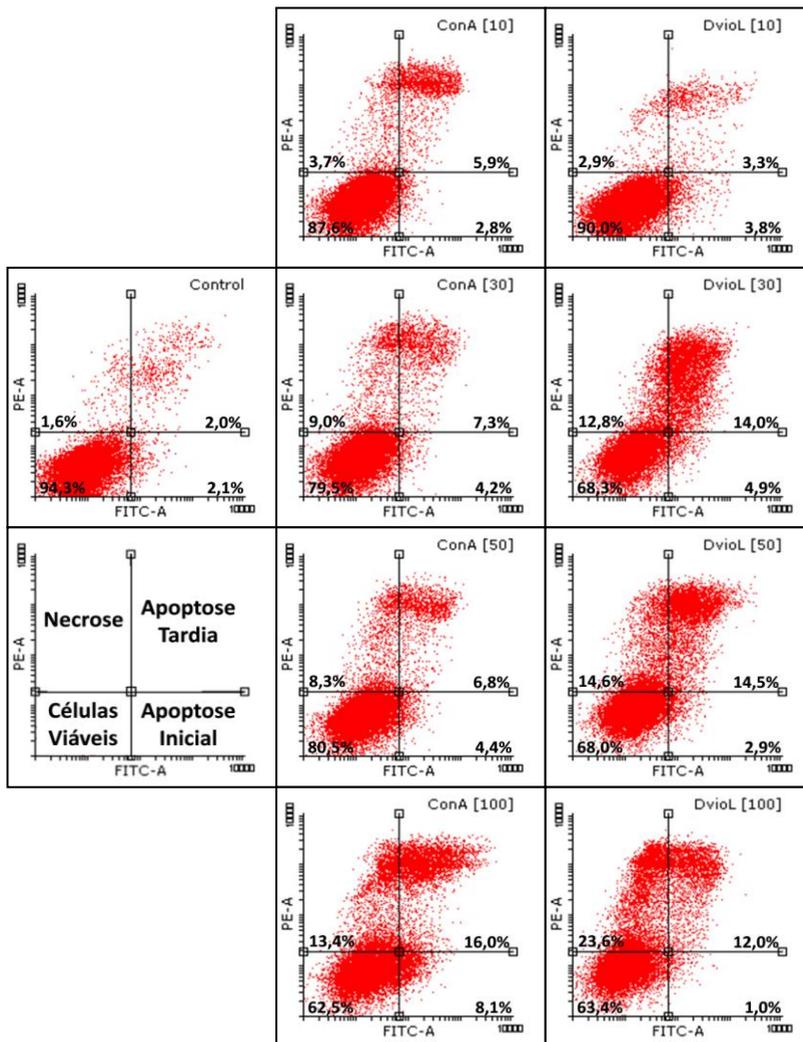


Figura 9: Dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio por citometria de fluxo de células C6 tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 ou 100 $\mu$ g/mL de ConA ou DvioL por 24 h. *Dot plots* representativos com a porcentagem de células em cada quadrante.

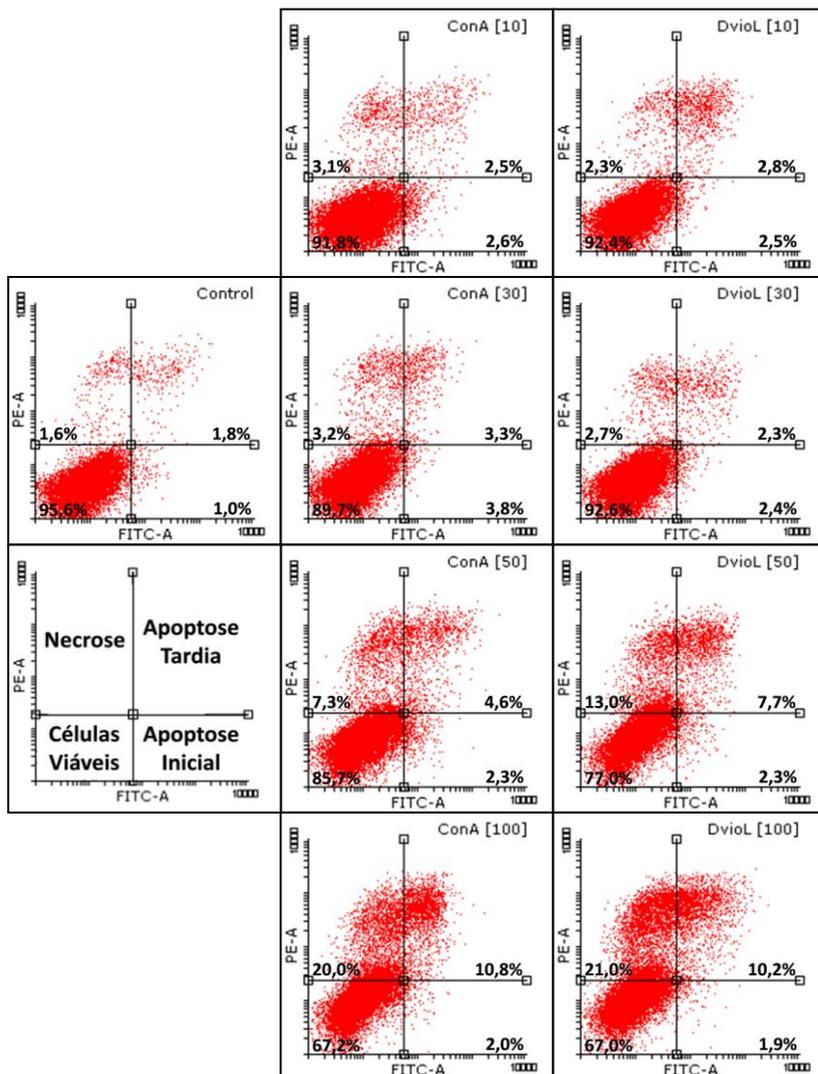


Tabela 2: Quantificação de três experimentos independentes da porcentagem celular em cada quadrante do ensaio de Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio por citometria de fluxo de células C6 tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 ou 100µg/mL de ConA ou DvioL por 6 h. ANOVA de duas vias seguida por teste pos-hoc de Bonferroni. \* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\* (p<0,001) em relação ao controle.

6 horas	Média±D.P.					
	Inf. Esq.	Inf. Dir.	Sup. Dir.	Sup. Esq.	Sup. Dir. + Inf. Dir.	Sup. Dir. + Inf. Esq.
Controle	94,37 ± 0,55	2,06 ± 0,78	1,99 ± 0,78	1,58 ± 0,77	4,05 ± 0,22	4,05 ± 0,22
ConA 10µg/mL	87,67 ± 5,27	2,76 ± 1,83	5,89 ± 3,45	3,69 ± 1,97	8,64 ± 3,39	8,64 ± 3,39
ConA 30µg/mL	79,44 ± 6,69***	4,23 ± 3,99	7,29 ± 2,84	9,03 ± 5,46	11,52 ± 2,87*	11,52 ± 2,87*
ConA 50µg/mL	80,52 ± 3,61***	4,43 ± 3,24	6,78 ± 0,79	8,28 ± 4,95	11,20 ± 2,45	11,20 ± 2,45
ConA 100µg/mL	62,60 ± 2,30***	8,08 ± 3,24	15,91 ± 3,79***	13,41 ± 3,69***	23,99 ± 3,77***	23,99 ± 3,77***
DvioL 10µg/mL	89,97 ± 2,10	3,85 ± 2,53	3,29 ± 0,55	2,89 ± 1,36	7,15 ± 1,98	7,15 ± 1,98
DvioL 30µg/mL	68,35 ± 4,63***	4,93 ± 6,42	13,96 ± 10,93*	12,75 ± 8,47*	18,89 ± 11,18**	18,89 ± 11,18**
DvioL 50µg/mL	68,03 ± 7,49***	2,90 ± 0,60	14,47 ± 6,69*	14,60 ± 4,16*	17,37 ± 6,21**	17,37 ± 6,21**
DvioL 100µg/mL	63,38 ± 5,84***	1,06 ± 0,28	11,92 ± 1,27	23,64 ± 4,46***	12,98 ± 1,39	12,98 ± 1,39

Tabela 3: Quantificação de três experimentos independentes da porcentagem celular em cada quadrante do ensaio de Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio por citometria de fluxo de células C6 tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 ou 100µg/mL de ConA ou Dviol por 24 h. ANOVA de duas vias seguida por teste pos-hoc de Bonferroni. \* (p<0,05); \*\* (p<0,01); \*\*\* (p<0,001) em relação ao controle.

24 horas	Média±D.P.					
	Inf. Esq.	Inf. Dir.	Sup. Dir.	Sup. Esq.	Sup. Dir. + Inf. Dir.	
Controle	95,63 ± 0,89	0,99 ± 0,29	1,75 ± 0,40	1,62 ± 0,24	2,75 ± 0,69	
ConA 10µg/mL	91,78 ± 1,76	2,58 ± 1,29	2,50 ± 0,49	3,14 ± 0,31	5,08 ± 1,76	
ConA 30µg/mL	89,65 ± 3,25	3,84 ± 2,88	3,33 ± 1,00	3,18 ± 1,36	7,17 ± 3,59*	
ConA 50µg/mL	85,71 ± 1,12***	2,33 ± 1,12	4,64 ± 0,70	7,33 ± 2,20*	6,96 ± 1,51*	
ConA 100µg/mL	67,19 ± 4,76***	1,96 ± 1,19	10,82 ± 0,23***	20,03 ± 3,39***	12,78 ± 1,41***	
Dviol. 10µg/mL	92,38 ± 1,99	2,52 ± 2,51	2,80 ± 1,27	2,29 ± 0,49	5,32 ± 1,50	
Dviol. 30µg/mL	92,62 ± 1,36	2,37 ± 2,53	2,30 ± 1,16	2,71 ± 0,92	4,67 ± 1,61	
Dviol. 50µg/mL	77,03 ± 3,65***	2,31 ± 0,96	7,65 ± 1,56***	13,00 ± 2,38***	9,97 ± 1,78***	
Dviol. 100µg/mL	66,95 ± 2,81***	1,92 ± 1,14	10,17 ± 1,31***	20,96 ± 2,45***	12,09 ± 1,44***	

A marcação para apoptose (FITC) é discreta, chegando ao máximo de 24% após 6 horas de tratamento com 100 $\mu$ g/mL de ConA. Interessantemente células expostas por 6h às concentrações 30 e 50 $\mu$ g/mL de Dviol tiveram maior marcação para Anexina V-FITC que a maior dose (Dviol 100 $\mu$ g/mL), isso pode ser decorrente do fato da dose ser um dos fatores que determina qual o tipo de morte celular induzida por um determinado agente (TAN e WHITE, 2008). A marcação apenas com iodeto de propídio (PE) que marca células com membrana lesada (fato que ocorre na necrose) passa de 20% mesmo com apenas 6h de tratamento. Comparando os tempo 6 e 24h, quase não há diferença entre os resultados, tendendo haver menos marcação por anexina V-FITC (apoptose) em 24h.

Trabalhos mostram que ConA é capaz de induzir apoptose em células A375 (melanoma humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) de forma dependente de mitocôndrias pela sinalização P73-Foxo1a-Bim (LI et al, 2010; LI et al., 2011). A apoptose induzida por ConA e Dviol sobre as células de glioma C6, poderia ainda estar relacionada com as vias das cinases JNK e/ou p38 (CHENG et al., 2013), ou então com a proteína cinase AKT, que é um fator de sobrevivência bem estabelecido, exercendo atividade antiapoptótica, por prevenir a liberação do citocromo c das mitocôndrias e inativar os fatores pró-apoptóticos e, desta maneira, contribuindo para o desenvolvimento e progressão do câncer (ALTOMARE e TESTA, 2005).

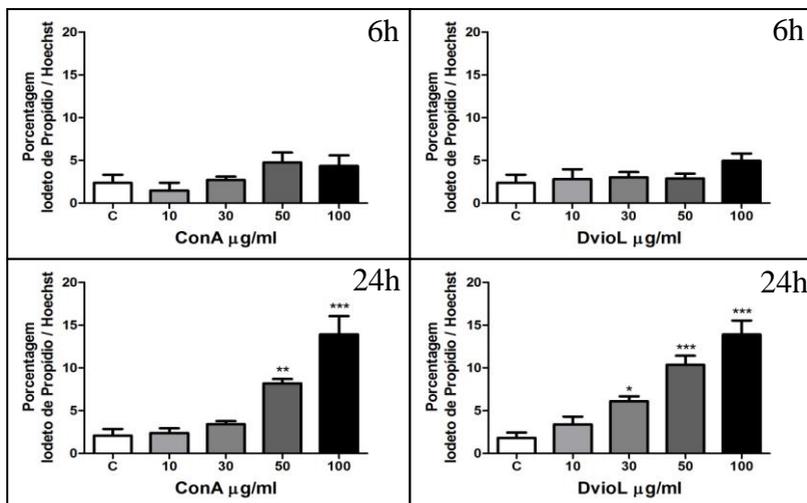
Nota-se também que, apesar da citometria de fluxo ser um método bastante preciso, os resultados (especialmente com 6h) mostram uma variação considerável entre eles. Isso acontece, pois quando se induz morte em uma cultura de células, o aparecimento das alterações (no caso, exteriorização de fosfatidilserina) ocorre de forma assíncrona entre a população de células ao longo de um período de várias horas (GOLDSTEIN et al., 2005).

Na citometria com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP) houve uma marcação significativa para IP, indicando lesão de membrana nessas células. Porém não há estudos indicando lectinas como indutoras de necrose e para a realização das citometrias as células passam por 4 centrifugações, o que pode levar a lesão da membrana. O controle não marca para IP, porém as células do controle não sofrem o insulto pelas lectinas como ocorre nos grupos tratados, o que poderia tornar os grupos tratados mais sensíveis à centrifugação. Para tirar a dúvida se essa marcação com IP deve-se a um processo necrótico ou ao procedimento da citometria, dois testes que avaliam lesão de

membrana/necrose foram executados: microscopia de fluorescência com IP e Hoechst e atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).

A marcação com IP e Hoechst para visualização da fluorescência por microscopia é uma metodologia que dispensa ressuspender as células. Os resultados são expressos em porcentagem de células com membrana rompida pelo total de células, ou seja, total de marcação com IP pelo total de marcação com Hoechst (Figura 10).

Figura 10: Porcentagem de fluorescência de IP por Hoechst em células C6 expostas ao veículo (controle) ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ConA ou Dvioleta após 6 e 24h de tratamento. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Newman-Keuls. \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle.

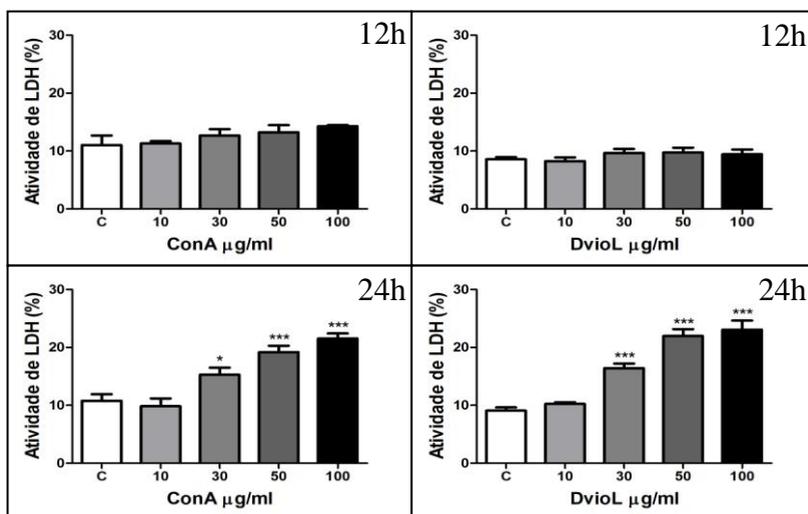


A quantificação da fluorescência de IP e Hoechst revelou que só há lesão de membrana celular significativa após 24h de exposição às lectinas, nas concentrações de 50 ( $p < 0,01$ ) e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,001$ ) de ConA e 30 ( $p < 0,05$ ), 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $p < 0,001$ ) de Dvioleta. Ressalta-se que esse aumento da marcação com IP não chega a 20% do total de células.

O outro teste utilizado para avaliar a lesão de membrana celular (indicativo de necrose) foi a determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura. LDH é uma enzima

citossólica que aumenta no meio de cultura se a membrana plasmática estiver lesada (MIRET et al., 2006; GAUCHER et al., 2014). A avaliação da atividade de LDH no meio de cultura é uma metodologia que também evita a manipulação das células (Figura 11).

Figura 11: Atividade de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura de células C6 expostas ao veículo (controle; C) ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL de ConA ou DvioL por 12 e 24h. A atividade foi expressa como percentual do controle positivo, Triton X-100 (0,2%), considerado 100%. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Newman-Keuls. \* ( $p < 0,05$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle (C).



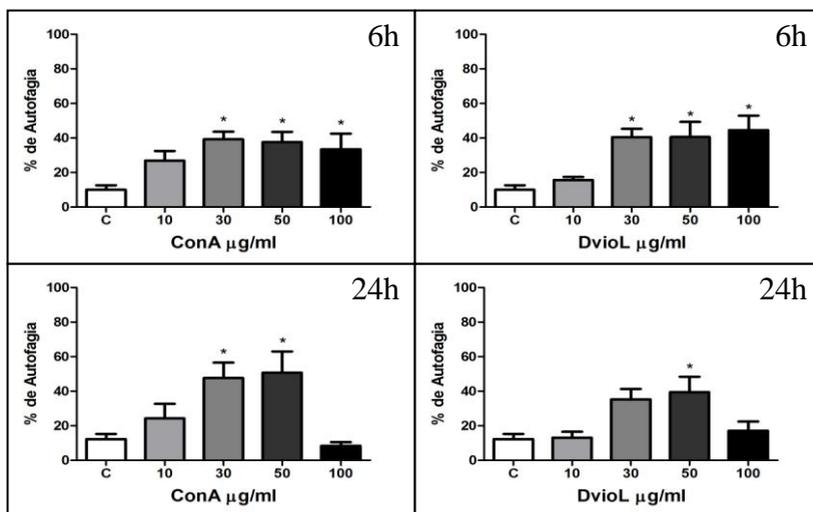
Assim como na quantificação da fluorescência de IP e Hoechst, só houve aumento significativo na atividade de LDH no meio de cultura após 24h de tratamento nas concentrações de 30 ( $p < 0,05$ ), 50 e 100 $\mu$ g/mL ( $p < 0,001$ ) de ConA e 30, 50 e 100 $\mu$ g/ml ( $p < 0,001$ ) de DvioL.

Com base nos resultados das figuras 10 e 11, conclui-se que só há rompimento de membrana significativo após 24h de tratamento e o percentual de células com essa característica de necrose não passa de 20% em relação ao controle. Esses dados sugerem que a marcação com IP obtida por citometria de fluxo, principalmente após 6h de tratamento, se deve em parte a manipulação das células e não a ação do tratamento com lectinas. Diante desse panorama, cria-se a hipótese de que a ruptura

de membrana ocorra como consequência da etapa final de alguma morte celular programada, como a apoptose ou autofagia, e/ou ao descolamento celular da placa por ação das lectinas (fato que será mostrado mais adiante), processo que pode romper a membrana plasmática.

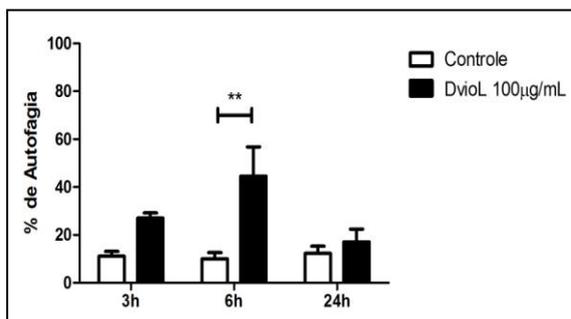
Por fim, avaliou-se o processo autofágico, já descrito para células U-87 de glioma humano tratadas com ConA (PRATT et al., 2012), por meio de coloração com laranja de acridina medido por citometria de fluxo (Figura 12). Laranja de acridina é uma base fraca que, quando não carregada, se move livremente através das membranas biológicas e emite fluorescência verde. A sua forma protonada se acumula em compartimentos acídicos, onde forma agregados que apresentam fluorescência alaranjada a vermelha (DEGTYAREV et al., 2014; SHEN et al., 2014). Durante o processo autofágico, há a formação de autofagossomos que se fundem com lisossomos formando autolisossomos. Do estágio de autofagossomo até autolisossomo, o compartimento vai gradualmente se tornando mais ácido (KOGA et al., 2010), portanto quando corado com laranja de acridina, ele vai passando pelas cores verde amarelado, amarelo, laranja e vermelho. A coloração com laranja de acridina tem sido aceita como um marcador para indicação de autofagia (FAN et al., 2008).

Figura 12: Porcentagem de células C6 marcadas com fluorescência para vesículas ácidas (PE e/ou PerCP) em relação ao total de células (FITC). Células expostas ao veículo (controle; C) ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL de ConA ou DvioL após 6 e 24h de tratamento. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Newman-Keuls. \* ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.



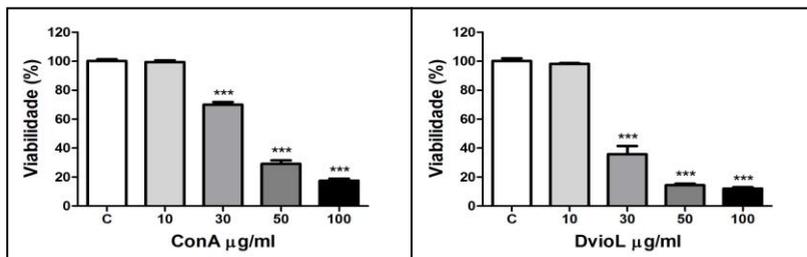
A figura 12 revela que há formação de vesículas ácidas (autofagossomos) nas células C6 em decorrência do tratamento, sendo os aumentos significativos com 6h nas concentrações de 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL tanto de ConA ( $p < 0,05$ ) quanto de DvioL ( $p < 0,05$ ). Porém em 24h, as doses de 100 $\mu$ g/mL de ConA e DvioL não apresentaram vesículas ácidas, e aumentos significativos ocorreram apenas nas concentrações 30 e 50 $\mu$ g/mL de ConA ( $p < 0,05$ ) e 50 $\mu$ g/mL de DvioL ( $p < 0,05$ ). A natureza da autofagia é dinâmica e, portanto, o fluxo de vida dos vacúolos autofágicos pode ser curto (DEGTYAREV et al., 2014). Para avaliar melhor essa redução dos autofagossomos após 24 horas, uma curva de tempo para a dose de 100 $\mu$ g/ml de DvioL foi construída (Figura 13).

Figura 13: Porcentagem de células C6 marcadas com fluorescência para vesículas ácidas (PE e/ou PerCP) em relação ao total de células (FITC). Células expostas a 100µg/mL de DvioL após 3, 6 e 24h de tratamento. ANOVA de duas vias seguida de teste pos-hoc de Bonferroni. \*\* (p<0,01) em relação ao controle.



A redução/extinção das vesículas autofágicas com 24h de tratamento na dose de 100µg/mL despertou duas hipóteses: (1) As células morreram, e por isso não mais se distingue autofagossomos; (2) As células se recuperaram do insulto. Para avaliar as hipóteses, um teste de viabilidade de 48h baseado no ensaio de redução do MTT foi realizado (Figura 14).

Figura 14: Viabilidade celular, pelo teste de redução do MTT, de células C6 expostas ao veículo (C) ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100µg/mL de ConA ou DvioL por 48 horas. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Newman-Keuls. \*\*\*(p<0,001) em relação ao controle.



Comparando a figura 14 com as figuras 3 e 4, percebe-se que a redução da viabilidade pelo teste do MTT é maior com 48 horas, chegando a valores menores que 20% de viabilidade (concentrações de 100µg/mL de ConA e 50 e 100 µg/mL de Dviolet) indicando que quanto mais tempo as células ficam expostas às lectinas, maior a perda de viabilidade. Esses dados corroboram com a hipótese de que a redução/extinção das vesículas autofágicas com 24h de tratamento na dose de 100µg/mL observada por citometria de fluxo (Figuras 12 e 13) ocorra pela morte das células.

Estudos mostraram ConA induzindo morte celular autofágica em células de carcinoma hepatocelular depois de se associar com a porção manose de glicoproteínas residentes na membrana das células. ConA foi preferencialmente internalizada para as mitocôndrias através de endocitose mediada por clatrina, e, em seguida, a morte celular autofágica foi iniciada (LEI e CHANG, 2009). Fortalecendo essa ideia, ConA aumentou BNIP3 (do inglês *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*), induziu formação de LC3-II e de vesículas ácidas de membrana dupla (vesículas autofágicas). Outras investigações demonstraram que a morte autofágica induzida por ConA é uma autofagia mitocondrial mediada por BNIP3, proteína esta que serve como um fator de indução de morte celular, determinando o estado ligado/desligado da permeabilidade dos poros de transição mitocondriais (CHANG et al., 2007).

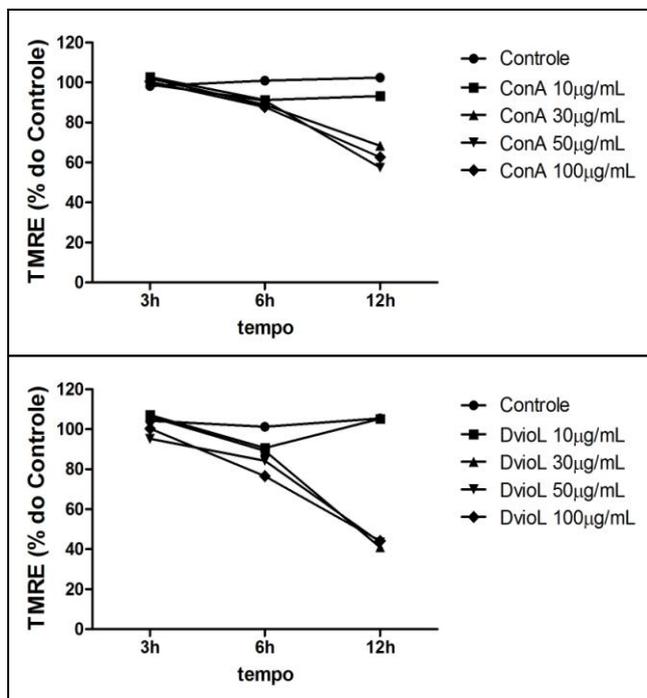
Trabalhos com células U-87 de glioma humano expostos a 30µg/mL de ConA mostraram um processo de morte celular autofágica similar ao encontrado nas células de carcinoma hepatocelular. Nas células U87, ConA aumentou a expressão de BNIP3 e dos genes relacionados a autofagia Atg3, Atg12 e Atg16 tipo 1, de forma dependente da expressão de MMP-14 (uma metaloproteinase de matrix ancorada na membrana plasmática), o que faz da MMP-14 um possível alvo de ligação com a ConA (PRATT et al., 2012).

Após todos esses ensaios de morte celular, conclui-se que ConA e Dviolet não causam necrose em células C6, porém induzem apoptose e, em maior grau, morte celular autofágica. Esses resultados estão de acordo com a literatura como já discutido acima, porém ressalta-se que tanto a apoptose, quanto a autofagia induzidos por ConA são mediadas por mitocôndria (GOLDSTEIN et al., 2005; CHANG et al., 2007; LEI e CHANG, 2009). Devido a essa informação, o próximo passo foi analisar a função mitocondrial.

#### 4.4 ConA E Dvioletil REDUZEM O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

A atividade mitocondrial pode ser monitorada observando o potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ). O  $\Delta\Psi_m$ , que é um dos componentes responsáveis pela força motriz para produção de ATP através da cadeia respiratória, é um indicador chave de saúde ou injúria celular (PERRY et al., 2011). O potencial de membrana foi visualizado corando as mitocôndrias com o fluorescente tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE). A intensidade da fluorescência do TMRE reflete sensivelmente as mudanças no  $\Delta\Psi_m$  (LI et al., 2015). Como é uma molécula carregada positivamente, TMRE se acumulara dentro da mitocôndria em proporção inversa ao  $\Delta\Psi_m$  e de acordo com a equação de Nernst. Ou seja, uma mitocôndria funcional apresenta  $\Delta\Psi_m$  negativo e acumula mais TMRE do que uma mitocôndria que perdeu sua função e despolarizou sua membrana. Porém, mudanças no sinal da sonda TMRE podem também ser devidas a mudanças da morfologia, localização ou massa mitocondrial (PERRY et al., 2011). Por isso que não se realizou o teste de TMRE no tempo de 24h, pois nesse tempo há redução da viabilidade celular (teste do MTT), ou seja, há menos células vivas nos poços com resultados significativos, logo não se poderia dizer se a redução da fluorescência do TMRE se deve a perda  $\Delta\Psi_m$  ou por haver menor número de células (consequentemente, menos mitocôndrias). Células C6 tratadas com ConA e Dvioletil foram submetidas à avaliação do potencial de membrana mitocondrial baseado na fluorescência de TMRE nos tempos de 3, 6 e 12h (Figura 15).

Figura 15: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial através da medida da fluorescência de TMRE em células C6 expostas às concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$  de ConA ou DvioL após 3, 6 e 12h de tratamento. ANOVA de duas vias seguida por teste pos-hoc de Bonferroni.



Células tratadas com ConA reduzem a fluorescência de TMRE somente após 12h de tratamento nas concentrações de 30 ( $p < 0,01$ ), 50 ( $p < 0,001$ ) e 100 $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, 50 ( $p < 0,05$ ) e 100 $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,01$ ) de DvioL reduzem o  $\Delta\Psi_m$  com 6h de tratamento e as concentrações de 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$  causam alterações significativas ( $p < 0,001$ ) com 12h de tratamento. Observa-se, portanto, que a perda do potencial de membrana mitocondrial ocorre em menor tempo nas células tratadas com DvioL em comparação ao tratamento com ConA.

Comparando com os resultados de viabilidade, percebe-se que a perda do  $\Delta\Psi_m$  antecede a redução da viabilidade celular pelo MTT. Quando a mitocôndria perde o seu potencial de membrana ela perde sua função, tornando-se incapaz de gerar energia. Essa perda de potencial de

membrana das mitocôndrias devido ao tratamento com as lectinas pode ser causa direta ou indireta da morte das células C6. Trabalhos mostram que a morte, seja apoptótica ou autofágica, de células tumorais induzida por ConA é desencadeada por sinalização dependente de mitocôndrias (CHANG et al., 2007; LEI e CHANG, 2009). Em células de melanoma A375, o tratamento com ConA resultou na diminuição do potencial de membrana mitocondrial e subsequente liberação de citocromo c no citoplasma seguido de apoptose (LIU et al., 2009). Em células de hepatocarcinoma tratadas com ConA, a lectina extracelular foi internalizada chegando a superfície da mitocôndria por meio de endocitose mediada por clatrina e essa internalização resultou em um decréscimo do potencial de membrana mitocondrial que iniciou a autofagia (CHANG et al., 2007). Deste modo, a perda do  $\Delta\Psi_m$  é descrita como iniciadora de ambos os processos: apoptose e autofagia.

Os dados aqui apresentados de perda do  $\Delta\Psi_m$  por TMRE (Figura 15) só mostraram diferença significativa em 6h com as concentrações de 50 ( $p<0,05$ ) e 100 $\mu\text{g/mL}$  ( $p<0,01$ ) de DvioL, enquanto as citometrias de fluxo revelaram apoptose e autofagia em doses menores tanto com ConA quanto DvioL. Acredita-se que essa diferença se deva a precisão do método, que é maior na citometria de fluxo comparado com a leitura de fluorescência na placa, como foi realizado com o TMRE. Portanto, um experimento utilizando TMRE por citometria de fluxo, poderia tornar os resultados mais próximos, uma vez que acredita-se que a redução do  $\Delta\Psi_m$  inicie os processos de apoptose e autofagia induzidos por ConA e DvioL.

#### 4.5 ConA E DvioL PROVOCAM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS C6

Células expostas a substâncias biologicamente prejudiciais podem sofrer alterações morfológicas (BONCLER et al., 2014) e, por conta disso, realizou-se acompanhamento por microscopia óptica de contraste de fase da morfologia das células C6 tratadas com ConA ou DvioL por 3, 6, 12, 24 e 48h. As imagens obtidas são exibidas nas figuras 16 e 17.

Figura 16: Acompanhamento morfológico por microscopia óptica de células C6 tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 ou 100 $\mu$ g/mL de ConA por 3, 6, 12, 24 ou 48h. Aumento 20x.

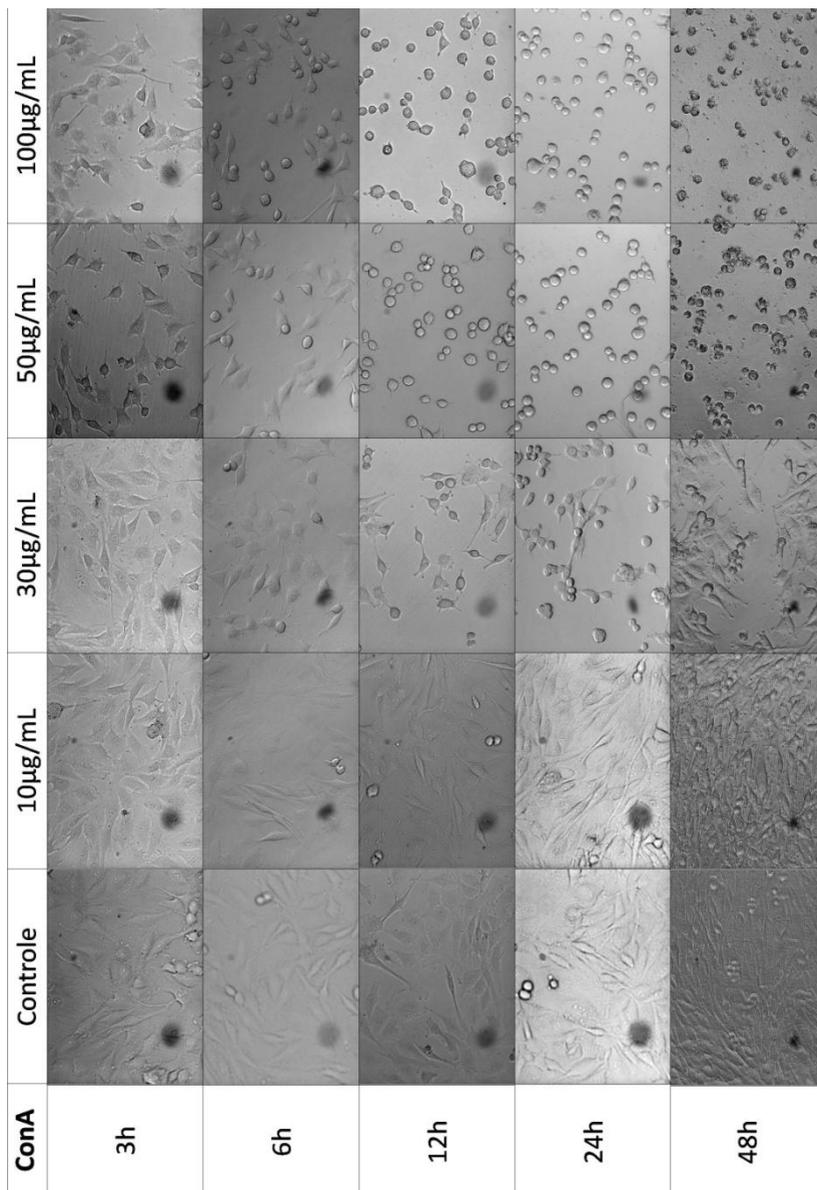
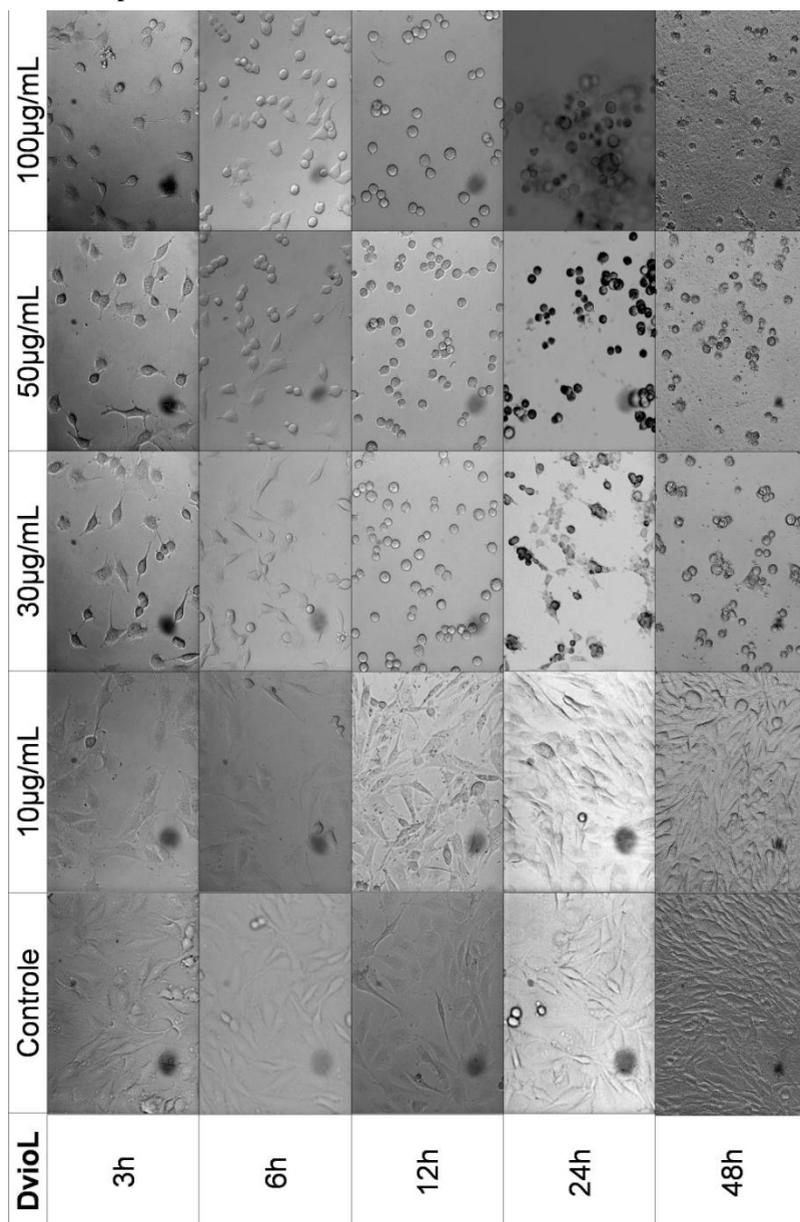


Figura 17: Acompanhamento morfológico por microscopia óptica de células C6 tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 ou 100 $\mu$ g/mL de DvioL por 3, 6, 12, 24 ou 48h. Aumento 20x.



Ao analisar a sequência de fotos das figuras 16 e 17, nota-se que a exposição das células C6 às lectinas promove a retração dos prolongamentos citoplasmáticos e a célula vai tornando-se esférica até o momento que se desprende da placa e fica suspensa no meio de cultura. A identificação de células suspensas no meio é facilmente detectada ao movimentar a placa para visualizar se as células estão acompanhando o movimento do líquido ou da placa. Apesar desse teste não ser possível de representar por meio impresso, a foto de 24h com Dviolet 100µg/mL (Figura 17) é capaz de mostrar células esféricas em vários planos, representando esse desprendimento da placa causada pelo tratamento com lectinas. Células suspensas já eram visualizadas em pequena quantidade após 6h de tratamento com 100µg/mL de Dviolet. Com 12h, essa suspensão foi visualizada para 30, 50 e 100µg/mL de Dviolet e 50 e 100µg/mL de ConA, de forma a ser mais expressiva à medida que a concentração aumenta. E por fim, 24h de tratamento resultou em células suspensas nas concentrações de 30, 50 e 100µg/mL de ConA e Dviolet, ressaltando que a quantidade de células não aderidas para Dviolet 100µg/mL após 24h chegava em torno de 90% do total de células, muito mais intenso do que no tratamento com ConA 100µg/mL. Após 48h de tratamento com as lectinas, além da perda morfológica, resultando em células esféricas, a membrana celular passa a ter aspecto enrugado, além de muitos debris celulares espalhados pela placa (50 e 100µg/mL de ConA e Dviolet).

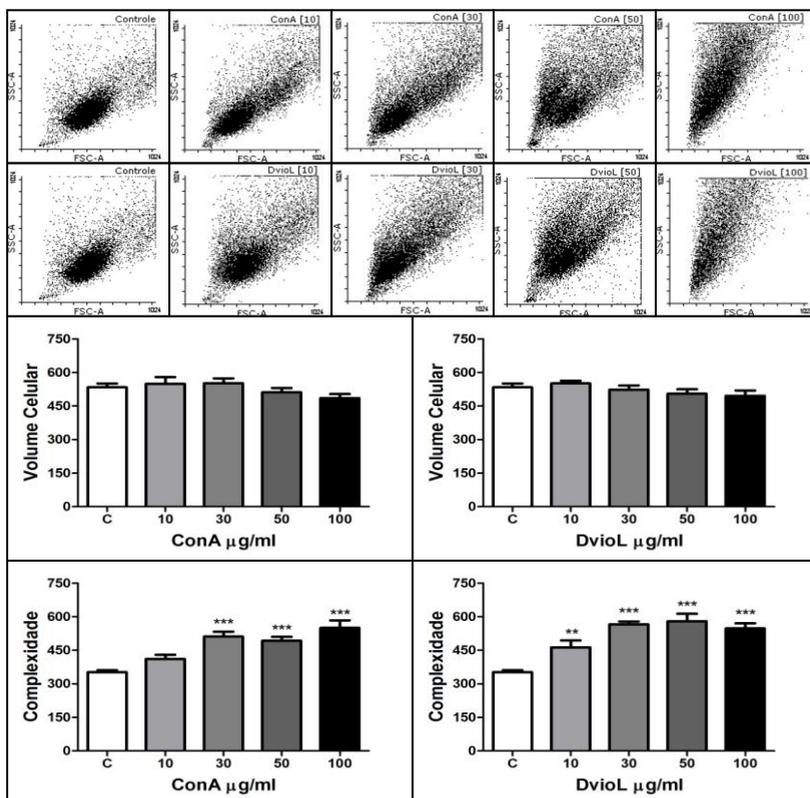
Além da modificação no formato celular, certo grau de aglutinação das células tratadas tanto com ConA como Dviolet foi observado de forma concentração e tempo dependente. Trabalhos mostram que ConA e WGA (lectina de *Triticum vulgare*) são capazes de aglutinar células normais e células tumorais de hepatócitos humanos (TAN et al., 2008). A aglutinação interfere no processo de adesão celular e também na sua capacidade proliferativa.

A partir de 3h de tratamento já é possível notar alterações marcantes na morfologia celular nas concentrações de 50 e 100µg/mL de ConA e 30, 50 e 100µg/mL de Dviolet. Ambas as lectinas não parecem alterar a estrutura celular na concentração de 10µg/mL, efeito que só é detectado a partir de 30µg/mL. Embora o processo seja igual para ambas as lectinas, é evidente que as alterações ocorrem antes e em concentrações menores de Dviolet comparando à ConA. Mais uma vez, Dviolet mostra ter um efeito mais potente sobre as células C6 do que ConA.

A fim de quantificar as alterações morfológicas, as células foram analisadas em citômetro de fluxo nos parâmetros "volume celular" e

"complexidade" (também conhecida como "granulosidade"). Este último parâmetro diz respeito à complexidade interna da célula, como forma do núcleo, quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e rugosidade da membrana, conforme figura 18.

Figura 18: Acompanhamento do volume celular (FSC) e granuloso/complexidade (SSC) por citometria de fluxo de células C6 tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 ou 100 $\mu$ g/mL de ConA ou Dviol por 6 h. Dot plots representativos, seguidos pela quantificação de 3 experimentos independentes. ANOVA de uma via seguida de teste pos-hoc de Newman-Keuls. \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle.

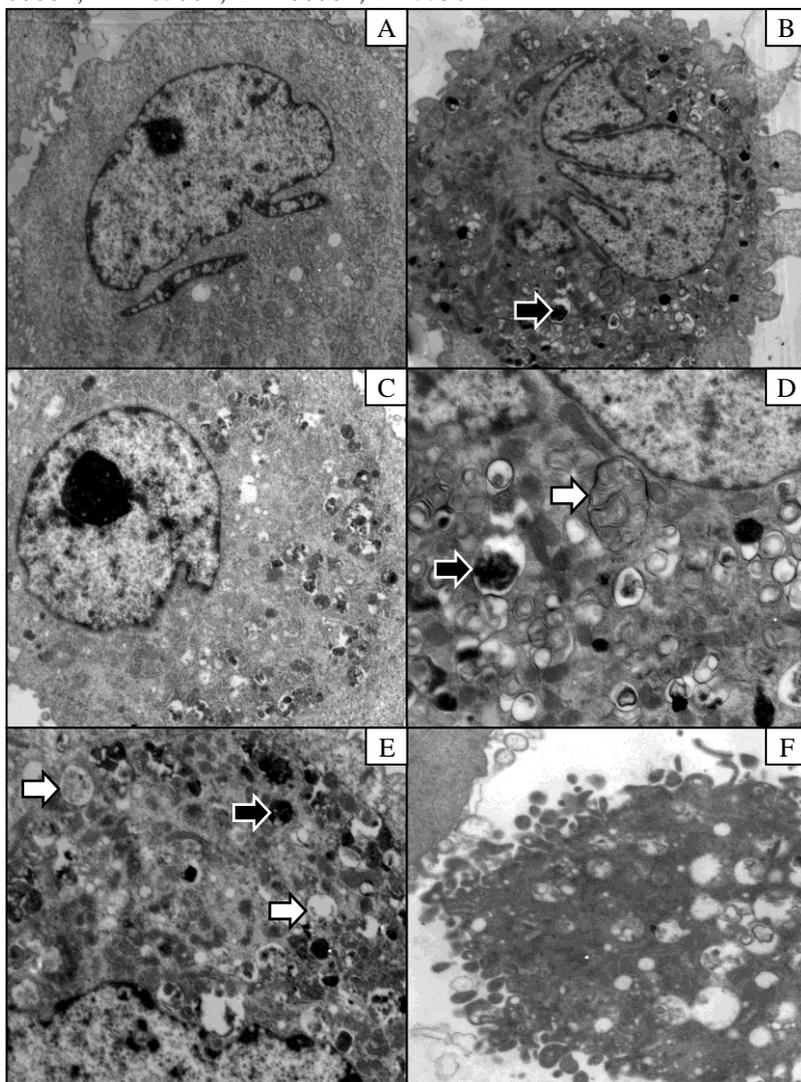


Analisando os *dot plots* representativos da figura 18, fica evidente que o tratamento com as lectinas desloca o padrão morfológico das células C6 (controle) pelo gráfico de pontos, alterando as células para um maior valor de SSC (complexidade). O tratamento com ConA ou DvioL não altera o volume celular após 6 horas de exposição às lectinas, porém a complexidade/granulosidade aumenta de forma significativa nas concentrações de 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL ( $p < 0,001$ ) de ConA e 10 ( $p < 0,01$ ), 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL ( $p < 0,001$ ) de DvioL. Esse foi o primeiro resultado em que a menor concentração (10 $\mu$ g/mL) diferiu do controle ( $p < 0,01$ ), porém apenas a lectina DvioL mostrou esse efeito com sua menor concentração, indicando, mais uma vez, que DvioL parece ser mais potente que ConA.

Por fim, análise ultraestrutural da morfologia celular foi realizado por meio de microscopia eletrônica. A análise morfológica ultraestrutural também serviu para a caracterização dos processos de morte celular a nível de organelas. A microscopia eletrônica foi realizada após 24h de tratamento com 30 $\mu$ g/mL de ConA ou DvioL (Figura 19).

Pela análise ultraestrutural fica evidente o processo autofágico intenso desencadeado pelas lectinas ConA e DvioL. Características de apoptose não foram encontradas nas condições avaliadas (24h, 30 $\mu$ g/mL de ConA ou DvioL), o que está de acordo com os dados de citometria de fluxo que revelam apoptose significativa após 24h de tratamento somente com doses superiores a 30 $\mu$ g/mL das lectinas. O grupo controle apresentou morfologia de núcleo normal com cromatina descondensada e mitocôndrias com aspecto característicos. Os grupos tratados com ConA e DvioL mostram intensa formação de vesículas autofágicas, caracterizadas tanto como autofagossomos como autolisossomos, que surgem após fusão com lisossomos e aparecem mais escuros na microscopia eletrônica. Células em fase final da morte celular autofágica também foram visualizadas.

Figura 19: Microscopia eletrônica de células C6 tratadas com 30 $\mu$ g/mL de ConA ou Dviol por 24h. O grupo controle apresenta morfologia de núcleo e mitocôndrias normais (A). Os grupos tratados com ConA (B, D e F) e Dviol (C e E) mostram intensa formação de vesículas autofágicas: autofagossomos (setas brancas) e autolisossomos (setas pretas). (F) Fase final da morte celular autofágica. Aumentos: A, B e C - 6000x; D - 16700x; E - 10000x; F - 7750x.



Anteriormente concluímos indução de autofagia por ConA e Dviolet em células de glioma C6 através de citometria de fluxo com o fluorocrom laranja de acridina. Como qualquer outro método, a caracterização da autofagia precisa de confirmação adicional por métodos paralelos (DEGTYAREV et al., 2014). Outras características morfológicas da indução de autofagia por um composto, como a formação de vacúolos característicos de autofagossoma devem ser identificadas através de microscopia eletrônica (KROEMER et al., 2009). Portanto, a análise ultraestrutural das células C6 comprova o processo autofágico quantificado por citometria de fluxo.

Muita discussão sobre a relação entre autofagia e apoptose existe na literatura. Embora a autofagia seja capaz de induzir apoptose quando as células não são viáveis, ela também é um mecanismo temporário de sobrevivência sob condições de estresse que pode impedir a morte celular (CHEN e WHITE, 2011). Sabe-se que, tanto a inibição quanto a ativação da autofagia na tumorigênese, podem ser benéficas, dependendo do tipo de tecido e estágio do tumor (KREUZALER e WATSON, 2012).

A autofagia pode promover ou regular a morte celular por apoptose, mas em certas circunstâncias, a autofagia poderia ser iniciada somente quando a apoptose estiver reprimida (THORBURN, 2008). Além disso, foi indicado que estes dois tipos de morte celular programada compartilham alguns fatores comuns e executam sobrepostamente as mesmas funções biológicas (LI et al., 2010). Especula-se que pode existir um interruptor molecular entre apoptose e autofagia. Portanto, essas duas formas de morte celular programada interconectam-se positiva ou negativamente (HUANG e KLIONSKY, 2007). As vias das cinases PI3K, AKT e mTOR são comuns aos circuitos regulatórios da autofagia, apoptose e necroptose (AMARAVADI et al., 2011; HANAHAN e WEINBERG, 2011; KREUZALER e WATSON, 2012). A relação intrínseca entre apoptose e autofagia pode variar dependendo do contexto biológico (LI et al., 2010).

Como mencionado acima, ConA pode induzir tanto apoptose como autofagia, ambas de forma mediada por mitocôndrias. Até agora, morte celular autofágica em células cancerígenas tratadas com ConA foi verificada sendo uma via pró-morte, e pode-se especular que a apoptose e autofagia podem compartilhar as mesmas vias de sinalização (Li et al., 2010).

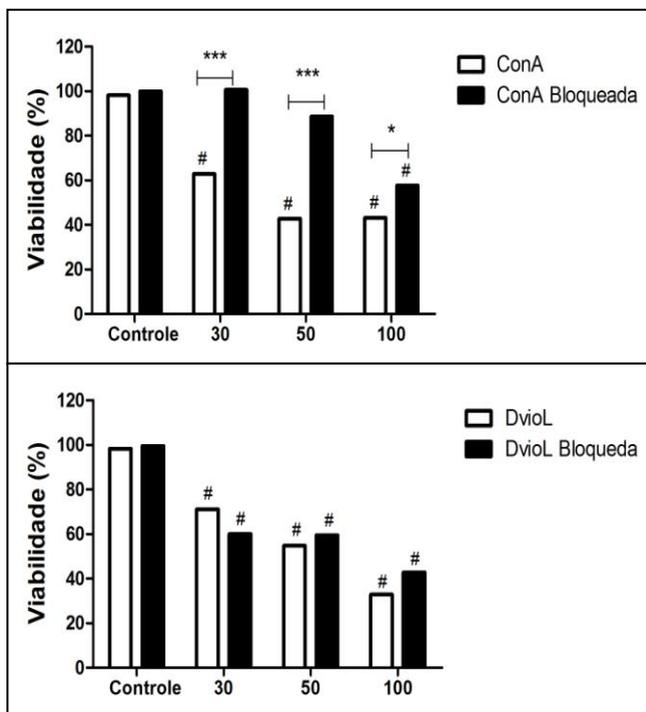
Durante muitos anos, a morte celular por apoptose correspondia ao mecanismo de ação da maioria dos fármacos usados na quimioterapia

do câncer. Contudo, mais recentemente, passou-se a investigar também outras vias de morte celular, tais como a autofagia (KREUZALER e WATSON, 2012). Indução de morte celular autofágica está se tornando uma alternativa para acionar a morte celular de glioma explorando vias de morte celular programada independente de caspase (KOGEL et al., 2010). Desta maneira, tendo em vista que a evasão à morte celular é uma das características clássicas do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2011), a compreensão de outros tipos de morte celular se faz necessária na busca por novas abordagens que superem, principalmente, a resistência à apoptose frente a determinados fármacos (TAN e WHITE, 2008).

#### 4.6 BLOQUEIO E DESNATURAÇÃO DE LECTINAS

Outro ponto do presente estudo foi caracterizar a importância da estrutura terciária e do sítio de ligação a glicano para o efeito de ConA e Dvioleta em células C6. Com esse objetivo as lectinas foram submetidas à desnaturação pelo calor e ao bloqueio do sítio de ligação a açúcar por pré-incubação das lectinas com  $\alpha$ -metil-D-manosídeo. A figura 20 apresenta o resultado do ensaio de viabilidade celular (MTT) após 24h de tratamento com as lectinas ConA e Dvioleta nativas ou submetidas ao protocolo de bloqueio do sítio de reconhecimento de carboidrato (CRD).

Figura 20: Viabilidade celular, pelo teste de redução do MTT, de células C6 expostas, por 24h, ao veículo (controle) ou às concentrações de 30, 50 e 100µg/mL de ConA e DvioL nativas ou bloqueadas com  $\alpha$ -metil-D-manosídeo. # ( $p<0,001$ ) em relação ao controle. ANOVA de duas vias seguida de teste pos-hoc de Bonferroni. \* ( $p<0,05$ ); \*\*\*( $p<0,001$ ) em relação a lectina nativa.



Após análise dos resultados mostrados na figura 20, escolheu-se a dose de 50µg/mL de ConA para os experimentos, uma vez que 30 e 50µg/mL de ConA bloqueada mantiveram a viabilidade celular igual ao controle, ou seja, impediram o efeito da lectina. Apesar de 100µg/mL de ConA bloqueada diferir de 100µg/mL de ConA, o bloqueio não impediu a redução da viabilidade celular. Os experimentos com DvioL bloqueada não foram realizados pois o bloqueio não teve efeito. A lectina DvioL, independente do protocolo de bloqueio, manteve sua capacidade de reduzir a viabilidade das células C6. O bloqueio com DvioL pode ter sido ineficaz pelo fato da ação de DvioL ocorrer de maneira

independente do sítio de ligação a glicano, ou porque a afinidade de Dvioleta com o sítio de ligação na célula C6 é mais forte do que com o  $\alpha$ -metil-D-manosídeo (açúcar usado para fazer o bloqueio).

Para avaliar o efeito das lectinas bloqueadas e desnaturadas utilizou-se a diferenciação de necrose e apoptose por citometria de fluxo (Figuras 21 e 22, Tabelas 4 e 5), quantificação de vesículas acídicas por citometria de fluxo (Figura 23), avaliação morfológica por microscopia óptica de contraste de fase (Figuras 24 e 25) e análise de volume celular e complexidade por citometria de fluxo (Figura 26).

Figura 21: Dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio por citometria de fluxo de células C6 tratadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de ConA (formas nativa, desnaturada e bloqueada por  $\alpha$ -metil-D-manosídeo) por 6 e 24h. *Dot plots* representativos.

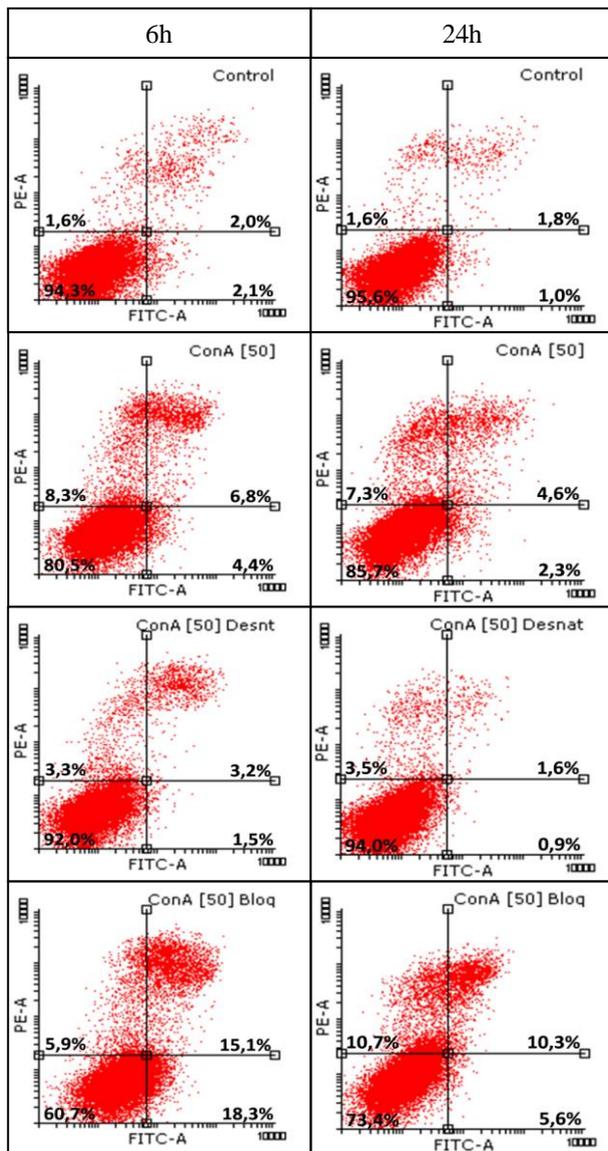


Figura 22: Dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio por citometria de fluxo de células C6 tratadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de Dviol (formas nativa e desnaturada) por 6 e 24h. *Dot plots* representativos.

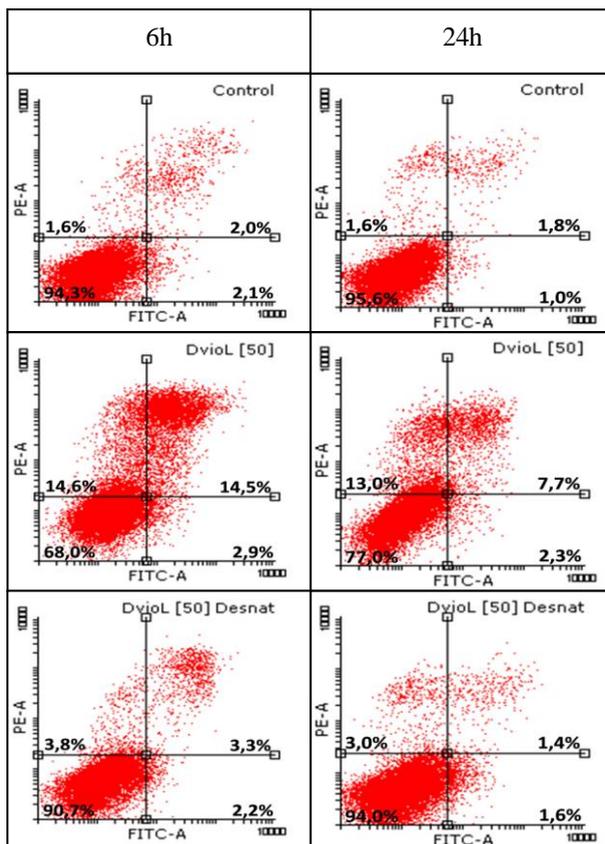


Tabela 4: Quantificação de três experimentos independentes da porcentagem celular em cada quadrante do ensaio de Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio por citometria de fluxo de células C6 tratadas com 50µg/mL de ConA (formas nativa, desnaturada e bloqueada com  $\alpha$ -metil-D-manosídeo) ou Dviol (formas nativa e desnaturada) por 6 h. ANOVA de duas vias seguida por teste pos-hoc de Bonferroni. \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle.

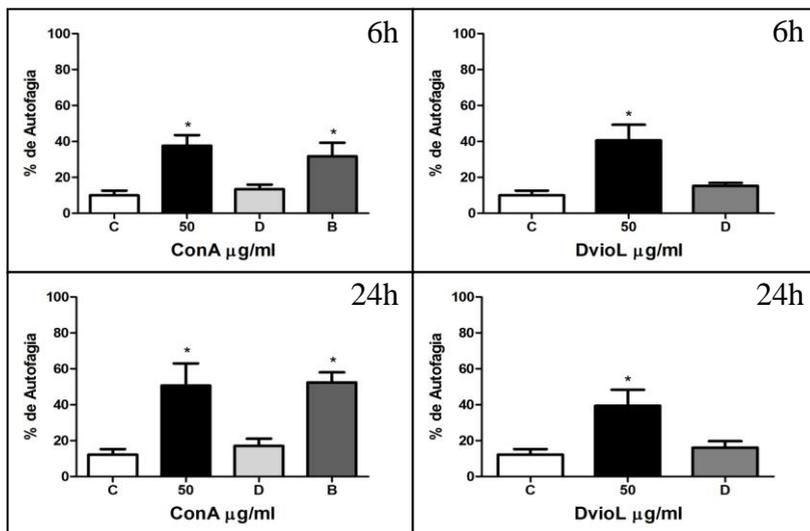
6 horas	Média±D.P.					
	Inf. Esq.	Inf. Dir.	Sup. Dir.	Sup. Esq.	Sup. Dir. + Inf. Dir.	
Controle	94,37 ± 0,55	2,06 ± 0,78	1,99 ± 0,78	1,58 ± 0,77	4,05 ± 0,22	
ConA 50µg/mL	80,52 ± 3,61**	4,43 ± 3,24	6,78 ± 0,79	8,28 ± 4,95	11,20 ± 2,45	
ConA 50µg/mL Desnat.	92,06 ± 1,70	1,49 ± 0,86	3,16 ± 1,36	3,30 ± 1,51	4,65 ± 0,52	
ConA 50µg/mL Bloq.	60,7 ± 11,30***	18,25 ± 10,82***	15,13 ± 6,01**	5,93 ± 4,51	33,38 ± 10,01***	
Dviol. 50µg/mL	68,03 ± 7,49***	2,90 ± 0,60	14,47 ± 6,69***	14,60 ± 4,16***	17,37 ± 6,21***	
Dviol. 50µg/mL Desnat.	90,74 ± 3,28	2,18 ± 1,00	3,27 ± 1,31	3,81 ± 3,32	5,45 ± 0,37	

Tabela 5: Quantificação de três experimentos independentes da porcentagem celular em cada quadrante do ensaio de Anexina V-FITC vs. Iodeto de Propídio por citometria de fluxo de células C6 tratadas com 50µg/mL de ConA (formas nativa, desnaturada e bloqueada com α-metil-D-manosídeo) ou Dviol (formas nativa e desnaturada) por 24 h. ANOVA de duas vias seguida por teste pos-hoc de Bonferroni. \*\* (p<0,01); \*\*\*(p<0,001) em relação ao controle.

24 horas	Média±D.P.					
	Inf. Esq.	Inf. Dir.	Sup. Dir.	Sup. Esq.	Sup. Dir. + Inf. Dir.	
Controle	95,63 ± 0,89	0,99 ± 0,29	1,75 ± 0,40	1,62 ± 0,24	2,75 ± 0,69	
ConA 50µg/mL	85,71 ± 1,12***	2,33 ± 1,12	4,64 ± 0,70	7,33 ± 2,20	6,96 ± 1,51	
ConA 50µg/mL Desnat.	93,99 ± 1,71	0,87 ± 0,56	1,65 ± 0,64	3,49 ± 0,54	2,52 ± 1,19	
ConA 50µg/mL Bloq.	73,40 ± 7,86***	5,64 ± 4,34	10,26 ± 3,43**	10,69 ± 2,01**	15,91 ± 6,99***	
Dviol. 50µg/mL	77,03 ± 3,65***	2,31 ± 0,96	7,65 ± 1,56***	13,00 ± 2,38***	9,97 ± 1,78***	
Dviol. 50µg/mL Desnat.	94,01 ± 1,22	1,58 ± 1,51	1,43 ± 0,28	2,99 ± 0,82	3,01 ± 1,78	

Pelos resultados da citometria para anexina V-FITC e iodeto de propídio, novamente as formas desnaturadas de ConA e Dvioleta não induziram alterações, apresentando resultados estatisticamente iguais ao grupo controle. Diferente dos outros resultados para bloqueio, ConA bloqueada teve um efeito único, distinto tanto do controle quanto da forma nativa após 6h ( $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) e 24h ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) de tratamento. Por alguma razão a forma bloqueada induziu mais apoptose do que 50 $\mu\text{g/mL}$  de ConA nativa. Como já discutido acima, a autofagia pode atuar inibindo a apoptose. O panorama estudado, revela que a forma bloqueada não impede, mas talvez atenua, o efeito da ConA nativa, portanto o bloqueio poderia estar induzindo menor carga de autofagia, o que permitiria a ocorrência da apoptose.

Figura 23: Porcentagem de células C6 marcadas com fluorescência para vesículas ácidas (PE e/ou PerCP) em relação ao total de células (FITC). Células expostas as doses de 50 $\mu\text{g/mL}$  de ConA (formas nativa, desnaturada e bloqueada com  $\alpha$ -metil-D-manosídeo) ou Dvioleta (formas nativa e desnaturada) após 6 e 24h de tratamento. ANOVA de uma via seguida por teste pos-hoc de Newman-Keuls. \* ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle.



A figura 23 mostra que as formas desnaturadas não induziram a formação de vesículas ácidas, assim como o controle. O bloqueio de ConA não foi capaz de impedir os efeitos de ConA 50µg/mL. Tanto a forma nativa quanto a bloqueada de ConA desencadearam a formação de vesículas autofágicas de forma significativa ( $p < 0,05$ ).

Figura 24: Acompanhamento morfológico por microscopia óptica de células C6 tratadas com 50 µg/mL de ConA (formas nativa, bloqueada ou desnaturada) por 6, 12 ou 24h.

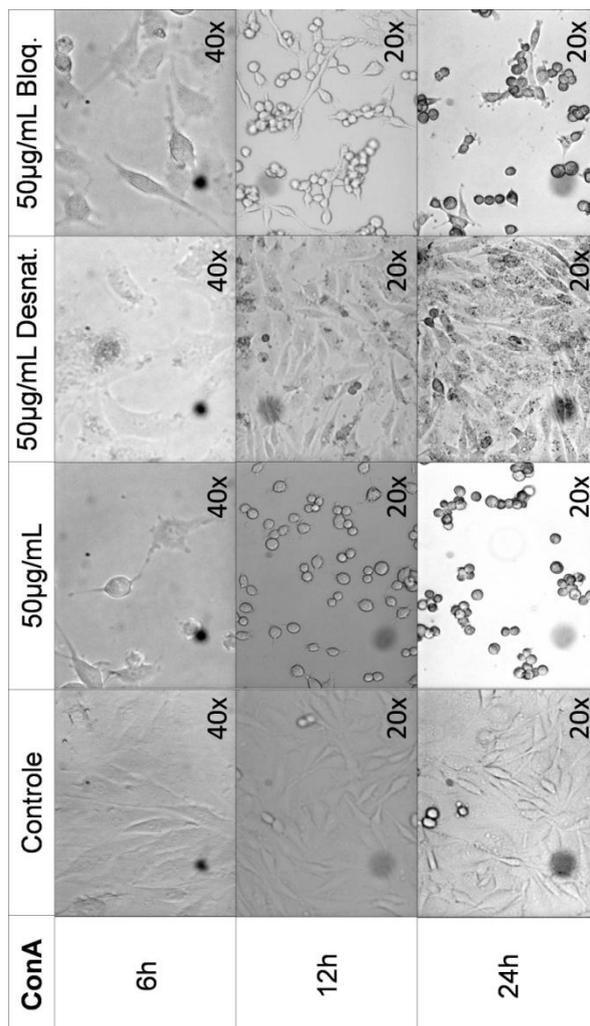
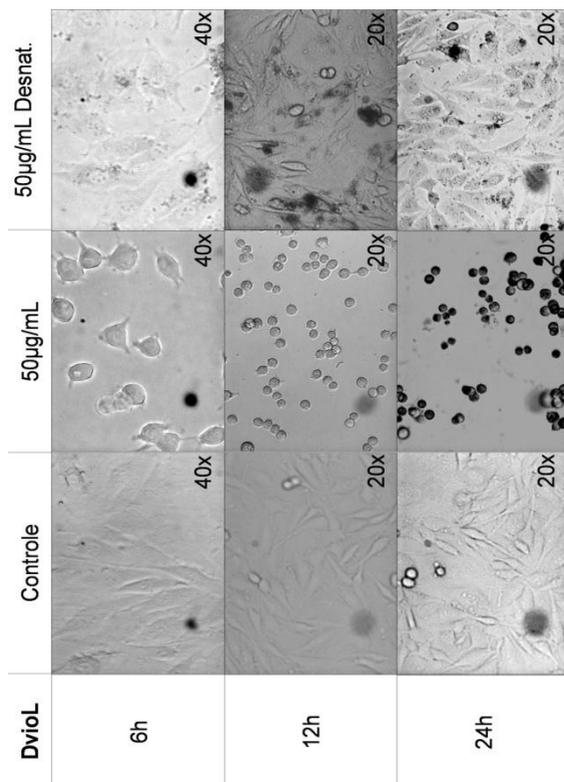
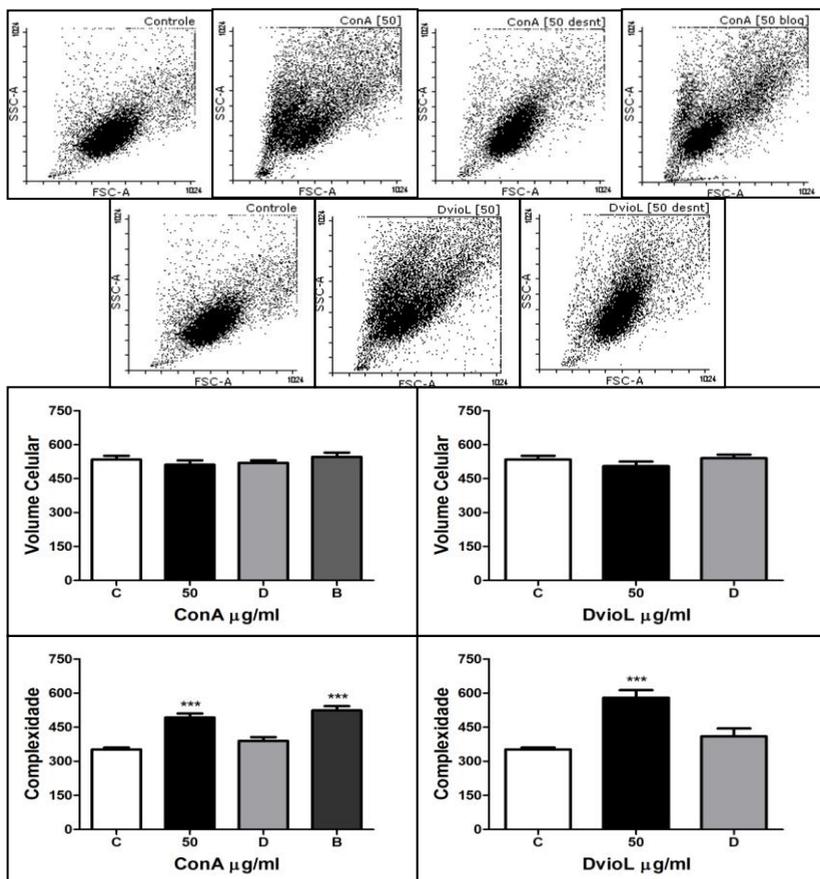


Figura 25: Acompanhamento morfológico por microscopia óptica de células C6 tratadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de Dvioleta (formas nativa ou desnaturada) por 6, 12 ou 24h.



Morfológicamente as células tratadas com as lectinas desnaturadas apresentam características semelhantes ao controle, mantendo a aparência estrelada e os prolongamentos, porém possuem um aspecto "sujo", devido a presença de grânulos no meio. Acredita-se que esses grânulos decorram do processo de desnaturação da lectina, que quando submetida ao aquecimento apresenta aspecto turvo em solução. Quanto as células tratadas com ConA bloqueada, elas sofreram alteração morfológica com retração dos prolongamentos, porém de uma forma menos intensa que a forma nativa. Especula-se que o bloqueio dificulte o efeito de ConA, mas não o impeça.

Figura 26: Acompanhamento do volume celular (FSC) e granuloso/complexidade (SSC) por citometria de fluxo de células C6 tratadas com 50 de ConA (formas nativa, desnaturada e bloqueada) ou DvioL (formas nativa e desnaturada) por 6h. Dot plots representativos, seguidos pela quantificação de 3 experimentos independentes. ANOVA de uma via seguida por teste pos-hoc de Newman-Keuls. \*\*\*( $p < 0,001$ ) em relação ao controle (veículo).



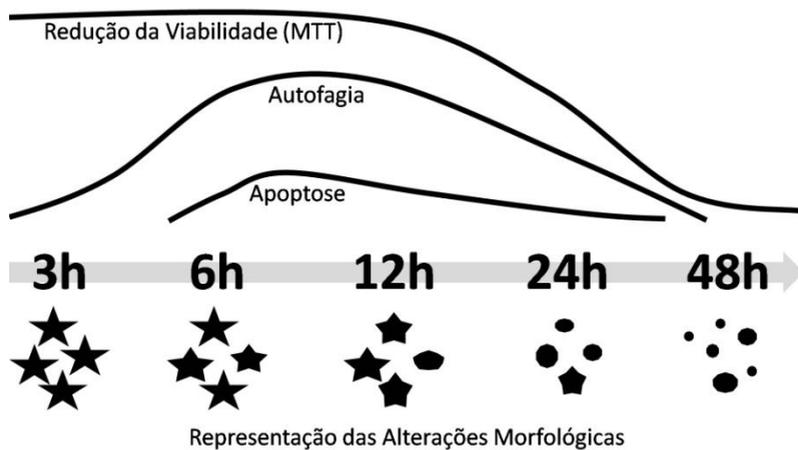
Os *dot plots* revelam que as formas desnaturadas de ConA e DvioL não descolam o padrão das células C6 no gráfico de pontos complexidade vs. volume celular, fato comprovado pela estatística que não foi significativa entre os grupos controle e lectinas desnaturadas tanto

no volume celular, quanto na complexidade. Conclui-se que a desnaturação impede as modificações de complexidade causadas pelo tratamento com lectinas. Quanto ao bloqueio de ConA, este foi quantitativamente diferente do controle ( $p < 0,001$ ) e igual ao grupo  $50\mu\text{g/mL}$  de ConA nativa, ou seja, o bloqueio da lectina não evitou as alterações na complexidade celular induzidas pelo tratamento com ConA.

#### 4.7 ConA E DvioL INDUZEM MORTE CELULAR AUTOFÁGICA EM CÉLULAS DE GLIOMA C6

Diante dos resultados apresentados ao longo dessa dissertação, temos um processo, desencadeado por ConA e DvioL, que leva a morte de células de glioma C6. Com 3h de tratamento já se observa alterações morfológicas nas células e vesículas acídias começam a serem formadas no citoplasma celular. Com 6h de exposição às lectinas do estudo o processo autofágico está bem estabelecido e de 10 a 20% das células começam a desencadear apoptose, processo que continua sendo observado com 24h, porém em menor porcentagem. No tempo de 24h as células tratadas com as concentrações mais elevadas testadas,  $100\mu\text{g/mL}$  de ConA e DvioL, não mostram mais vesículas ácidas no citoplasma, embora as concentrações de 30 e  $50\mu\text{g/mL}$  continuem apresentando um processo autofágico. Nesse tempo de 24h ocorre marcação de 20% de células com membranas rompidas, provavelmente decorrente dos estágios finais das mortes apoptóticas e autofágicas iniciadas com 6h de tratamento. Com 48h observa-se intensa redução da viabilidade com membranas celulares de aspecto rugoso, debris espalhados pela placa e ausência de células com prolongamentos nas concentrações de 50 e  $100\mu\text{g/mL}$  de ConA e 30, 50 e  $100\mu\text{g/mL}$  de DvioL (Figura 27).

Figura 27: Representação esquemática dos processos induzidos por ConA e DvioL sobre células de glioma C6.



## 5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados podemos concluir que tanto ConA quanto Dviol provocam a morte de células C6. Esse efeito é conseguido apenas nas concentrações a partir de 30 $\mu$ g/mL. Dentre os mecanismos de morte avaliados, apesar de existir pequena marcação para apoptose após 6h de tratamento, a microscopia eletrônica destacou a autofagia como o responsável pelo efeito citotóxico dessas duas lectinas sobre células de glioma C6. Além do mais, esse efeito das lectinas depende de sua estrutura terciária, pois a desnaturação resulta na ausência de indução de morte. Quanto à função do sítio de ligação a carboidrato, ainda permanece obscuro o seu envolvimento no processo, pois houve resultados que mostram que o bloqueio de ConA funciona de forma plena (ensaio de redução do MTT) ou parcial (morfologia), resultados que dizem que o bloqueio é ineficaz (quantificação de vacúolos acídicos) e resultados que mostram um efeito distinto aos demais grupos (indução de apoptose).

ConA tem muitos estudos sobre o seu papel anti-tumoral, inclusive com ensaios pré-clínicos. E esse trabalho traz a lectina Dviol como uma potencial droga anti-neoplásica, inclusive com possível eficiência maior que a ConA, visto que, pelo menos em células C6, Dviol mostrou-se mais potente.

## **6 PERSPECTIVAS**

Os próximos passos desse trabalho serão o estudo molecular do processo autofágico induzido por ConA e Dvioleta sobre células C6, buscando encontrar a via ou as vias de sinalização envolvidas no processo, e a realização dos mesmos experimentos, porém em células diferentes. Pretende-se testar as lectinas na linhagem celular de glioma humano U-87 e em cultura primária de astrócitos, com o intuito de saber se o efeito de ConA e Dvioleta ocorre seletivamente em células tumorais ou não.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABBATE, A.; DE FALCO, M.; MORALES, C.; GELPI, R. J.; PRISCO, M.; DE LUCA, A.; PALLEIRO, J.; FEDELE, V.; FEROCCE, F.; BALDI, F.; VETROVEC, G. W.; BALDI, A. Electron microscopy characterization of cardiomyocyte apoptosis in ischemic heart disease. **International Journal of Cardiology**. V. 114, p. 118-120, 2007.
- AGRAWAL, B. B. L.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochemical Journal**. V. 96, p. 23c-25c, 1965.
- AL-MEHDI, A. B.; TOZAWA, K.; FISHER, A. B.; SHIENTAG, L.; LEE, A.; MUSCHEL, R. J. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. **Nature Medicine**. V. 6, p. 100-102, 2000.
- ALDAPE, K. D.; BALLMAN, K.; FURTH, A.; BUCKNER, J. C.; GIANNINI, C.; BURGER, P. C.; SCHEITHAUER, B. W.; JENKINS, R. B.; JAMES, C. D. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. V. 63, p. 700-707, 2004
- ALENCAR, N. M.; MOTA, M. R.; RODRIGUES, N. V.; MARTINS, J. L.; DO NASCIMENTO, K. S.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S. Neutrophil-infiltrated paw edema induced by mannose-binding Dioclea violacea lectin. **Pharmacological Reports**. **Pharmacological Reports**. V. 65, n. 1, p. 220-225, 2013.
- ALTOMARE, D. A.; TESTA, J. R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene**. V. 24, p. 7455-7464, 2005.
- AMARAVADI, R. K.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; YIN, X. M.; WEISS, W. A.; TAKEBE, N.; TIMMER, W.; DIPAOLO, R. S.; LOTZE, M. T.; WHITE, E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. **Clinical Cancer Research**. V.17, n. 4, p. 654-666, 2011.
- APARICIO, S. J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The crystal structure of Canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**. V. 405, p. 114-118, 1997
- ASSREUY, A. M.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; SOUZA, M. L.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**. V. 6, p. 201-210, 1997.
- BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R. E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A. B.; DEWHIRST, M. W.; BIGNER, D. D.; RICH, J. N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**. V. 444, p. 756-760, 2006.
- BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. **Science**. V. 161, p. 370-371, 1968.
- BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**. V. 11, p. 127-152, 2005.

BEZERRA, M. J. B.; RODRIGUES, N. V. F. C.; PIRES, A. F.; BEZERRA, G. A.; NOBRE, C. B.; ALENCAR, K. L. L.; SOARES, P. M. G.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; MARTINS, J. L.; GRUBERC, K.; SAMPAIO, A. H.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S. Crystal structure of Dioclea violacea lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with Dioclea rostrata lectin. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. V. 45, p. 807-815, 2013.

BHUTIA, S. K.; MUKHOPADHYAY, S.; SINHA, N.; DAS, D. N.; PANDA, P. K.; PATRA, S. K.; MAITI, T. K.; MANDAL, M.; DENT, P.; WANG, X. Y.; DAS, S. K.; SARKAR, D.; FISHER, P. B. Autophagy: cancer's friend or foe? **Advances in Cancer Research**. V. 118, p. 61-95, 2013.

BONCLER, M.; RÓZALSKI, M.; KRAJEWSKA, U.; PODSĘDEK, A.; WATALA, C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. V. 69, p. 9-16, 2014.

BORSIG, L.; WONG, R.; FERAMISCO, J.; NADEAU, D. R.; VARKI, N. M.; VARKI, A. Pictures in molecular medicine: three dimensional visualization of intravascular tumor cells in mice. **Trends in Molecular Medicine**. V. 7, p. 377, 2001.

BORSIG, L.; WONG, R.; HYNES, R. O.; VARKI, N. M.; VARKI, A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. V. 99, p. 2193-2198, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. INCA estima quase 600 mil casos novos de câncer para 2016 / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/>. Acesso em 08 de janeiro de 2016.

CALATOZZOLO, C.; CANAZZA, A.; POLLO, B.; DI PIERRO, E.; CIUSANI, E.; MADERNA, E.; SALCE, E.; SPONZA, V.; FRIGERIO, S.; DI MECO, F.; SCHINELLI, S.; SALMAGGI, A. Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. **Cancer Biology & Therapy**. V. 11, p. 242-253, 2011.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. 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 Peptides Science**. V. 2, p. 1-13, 2001.

CHANG, C. P.; YANG, M. C.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; LEI, H. Y. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**. V. 45, p. 286-296, 2007.

CHEN, J.; LIU, B.; JI, N.; ZHOU, J.; BIAN, H. J.; LI, C. Y.; CHEN, F.; BAO, J. K. A novel sialic acid-specific lectin from Phaseolus coccineus seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. **Phytomedicine**. V. 16, p. 352-360, 2009.

CHEN, H. Y.; WHITE, E. Role of autophagy in cancer prevention. **Cancer Prevention Research**. V. 4, p. 973-983, 2011.

CHENG, L.; HUANG, Z.; ZHOU, W.; WU, Q.; DONNOLA, S.; LIU, J. K.; FANG, X.; SLOAN, A. E.; MAO, Y.; LATHIA, J. D.; MIN, W.; MCLENDON, R. E.; RICH, J. N.; BAO, S. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. **Cell**. V. 153, p. 139-152, 2013. (a)

CHENG, P.; ALBERTS, I.; LI, X. The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**. V. 31, p. 783-789, 2013.

CHERRY, A. E.; STELLA, N. G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: emerging therapeutic avenues. **Neuroscience**. V. 278, p. 222-236, 2014.

CRIBBS, D. H.; KRENG, V. M.; ANDERSON, A. J.; COTMAN, C. W. Crosslinking of concanavalin A receptors on cortical neurons induces programmed cell death. **Neuroscience**. V. 75, p. 173-185, 1996.

CURRIE, J. C.; FORTIER, S.; SINA, A.; GALIPEAU, J.; CAO, J.; ANNABI, B. MT1-MMP Down-regulates the Glucose 6-Phosphate Transporter Expression in Marrow Stromal Cells. **Journal of Biological Chemistry**. V. 282, p. 8142-8149, 2007.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**. V. 28, p.118-129, 2005.

DEGTYAREV, M.; DE MAZIERE, A.; KLUMPERMAN, J.; LIN, K. Autophagy, an Achilles' heel AKTing against cancer? **Autophagy**. V. 5, p. 415-418, 2009.

DEGTYAREV, M.; REICHEL, M.; LIN, K. Novel Quantitative Autophagy Analysis by Organelle Flow Cytometry after Cell Sonication. **Plos One**. V. 9, p. 1-14 (e87707), 2014.

DEMARIA, S.; PIKARSKY, E.; KARIN, M.; COUSSENS, L. M.; CHEN, Y. C.; EL-OMAR, E. M.; TRINCHIERI, G.; DUBINETT, S. M.; MAO, J. T.; SZABO, E. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. **Journal of Immunotherapy**. V. 33, p. 335-351, 2010.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**. V. 16, p. 663-669, 2004.

EGEA, J.; MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D.; PARADA, E.; ROMERO, A.; BARRIO, L. D.; ROSA, A. O. Galantamine elicits neuroprotection by inhibiting iNOS, NADPH oxidase and ROS in hippocampal slices stressed with anoxia/reoxygenation. **Neuropharmacology**. V. 62, n. 2, p. 1082-90, 2011.

EHTESHAM, M.; MAPARA, K. Y.; STEVENSON, C. B.; THOMPSON, R. C. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. **Cancer Letters**. V. 274, p. 305-312, 2009.

EHTESHAM, M.; MIN, E.; ISSAR, N. M.; KASL, R. A.; KHAN, I. S.; THOMPSON, R. C. The role of the CXCR4 cell surface chemokine receptor in glioma biology. **Journal of Neuro-Oncology**. V. 113, p. 153-162, 2013.

ESMEKAYA, M. A.; SEYHAN, N.; OMEROGU, S. Pulse modulated 900 MHz radiation induces hypothyroidism and apoptosis in thyroid cells: A light, electron

microscopy and immunohistochemical study. *International Journal of Radiation Biology*. V. 86, n. 12, p. 1106-1116, 2010.

FAN, C. D.; ZHAO, B. X.; ZHANG, G. H.; DONG, W. L.; MIAO, J. L. Synthesis and discovery of autophagy inducers for A549 and H460 lung cancer cells, novel 1-(2'-hydroxy-3'-aroxypopyl)-3-aryl-1H-pyrazole-5-carbohydrazide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. V. 18, p. 3860-3864, 2008.

FELSHER, D. W. Reversibility of oncogene-induced cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. V. 14, p. 37-42, 2004.

FUSTER, M. M.; BROWN, J. R.; WANG, L.; ESKO, J. D. A disaccharide precursor of sialyl Lewis X inhibits metastatic potential of tumor cells. *Cancer Research*. V. 63, p. 2775-2781, 2003.

FUSTER, M. M.; ESKO, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*. V. 5, p. 526-542, 2005.

GALLI, R.; BINDA, E.; ORFANELLI, U. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*. V. 64, p. 7011-7021, 2004.

GAUCHER, S.; JARRAYA, M. Technical note: comparison of the PrestoBlue and LDH release assays with the MTT assay for skin viability assessment. *Cell Tissue Bank*. V. x, p. 1-5, 2014.

GERVASI, N. M.; KWOK, J. C.; FAWCETT, J. W. Role of extracellular factors in axon regeneration in the CNS: implications for therapy. *Regenerative Medicine*. V. 3, p. 907-923, 2008.

GHOBRIAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Cancer Journal for Clinicians*. V. 55, p. 178-194, 2005.

GOLDSTEIN, J. C.; MUÑOZ-PINEDO, C.; RICCI, J. E.; ADAMS, S. R.; KELEKAR, A.; SCHULER, M.; TSIEN, R. Y.; GREEN, D. R. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. V. 12, p. 453-462, 2005.

HAIL, J. N.; CARTER, B.Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. V. 11, p. 889-904, 2006.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. V. 144, p. 646-674, 2011.

HARDELL, L.; CARLBERG, M.; SODERQVIST, F.; HANSSON MILD, K. Meta-analysis of long-term mobile phone use and the association with brain tumours. *International Journal of Oncology*. V. 32, p. 1097-1103, 2008.

HARTMANN, C.; HENTSCHEL, B.; WICK, W.; CAPPER, D.; FELSBURG, J.; SIMON, M.; WESTPHAL, M.; SCHACKERT, G.; MEYERMANN, R.; PIETSCH, T.; REIFENBERGER, G.; WELLER, M.; LOEFFLER, M.; VON DEIMLING, A. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*. V. 120, p. 707-718, 2010.

- HASHIMOTO, Y. A brief overview of apoptosis. **Human Cell**. V. 9, p. 194-196, 1996.
- HAYAKAWA, K.; TAKEMURA, G.; KODA, M.; KAWASE, Y.; MARUYAMA, R.; LI, Y.; MINATOBUCHI, S.; FUJIWARA, T.; FUJIWARA, H. Sensitivity to apoptosis signal, clearance rate, and ultrastructure of Fas ligand-induced apoptosis in *in vivo* adult cardiac cells. **Circulation**. V. 105, p. 3039-3045, 2002.
- HUANG, J.; KLIONSKY, D. J. Autophagy and human disease. **Cell Cycle**. V. 6, p. 1837-1849, 2007
- HUSSEIN, M. R.; HAEMEL, A. K.; WOOD, G. S. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. **Journal of Pathology**. V. 199, 275-288, 2003.
- INTERPHONE Study Group. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. **International Journal of Epidemiology**. V. 39, n. 3, p. 675-694, 2010.
- JOHNSON, B. E.; MAZOR, T.; HONG, C.; BARNES, M.; AIHARA, K.; MCLEAN, C. Y.; FOUSE, S. D.; YAMAMOTO, S.; UEDA, H.; TATSUNO, K.; ASTHANA, S.; JALBERT, L. E.; NELSON, S. J.; BOLLEN, A. W.; GUSTAFSON, W. C.; HARRON, E.; WEISS, W. A.; SMIRNOV, I. V.; SONG, J. S.; OLSHEN, A. B.; CHA, S.; HAO, Y.; MOORE, R. A.; MUNGALL, A. J.; JONES, S. J.; HIRST, M.; MARRA, M. A.; SAITO, N.; ABURATANI, H.; MUKASA, A.; BERGER, M. S.; CHANG, S. M.; TAYLOR, B. S.; COSTELLO, J. F. Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. **Science**. 2014 343, p. 189-193, 2014.
- KOGA, H.; KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. **FASEB Journal**. V. 24, p. 3052-3065, 2010.
- KOGEL, D.; FULDA, S.; MITTELBRONN, M. Therapeutic exploitation of apoptosis and autophagy for glioblastoma. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. V. 10, p.438-449, 2010.
- KOHN, M.; BENITO, J. M.; ORTIZ MELLET, C.; LINDHORST, T. K.; GARCÍA FERNÁNDEZ, J. M. Functional evaluation of carbohydrate-centred glycoclusters by enzyme-linked lectin assay: ligands for concanavalin A. **ChemBiochem**. V. 5, n. 6, p. 771-777, 2004.
- KOMATSU, M.; JEPSON, S.; ARANGO, M. E.; CAROTHERS CARRAWAY, C. A.; CARRAWAY, K. L. Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. **Oncogene**. V. 20, p. 461-470, 2001.
- KREUZALER, P.; WATSON, C. J. Killing a cancer: what are the alternatives? **Nature Reviews Cancer**. V. 12, p. 411-424, 2012.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.;ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**. V. 16, p. 3-11, 2009.

- KULKARNI, G. V.; MCCULLOCH, C. A. Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: the role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. **Journal of Cellular Physiology**. V. 165, p. 119-133, 1995.
- LAZEBNIK, Y. What are the hallmarks of cancer? **Nature Reviews Cancer**. V. 10, p. 232-233, 2010.
- LEI, H. Y.; CHANG, C. Lectin of Concanavalin A as an antihepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**. V. 16, p. 10, 2009.
- LI, C. Y.; XU, H. L.; LIU, B.; BAO, J. K. Concanavalin A, from an Old Protein to Novel Candidate Anti-Neoplastic Drug. **Current Molecular Pharmacology**. V. 3, p. 123-128, 2010.
- LI, W. W.; YU, J. Y.; XU, H. L.; BAO, J. K. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and antiangiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 414, p. 282–286, 2011.
- LI, Y.; HONDA, S.; IWAMI, K.; OHTA, Y.; UMEDA, N. Analysis of mitochondrial mechanical dynamics using a confocal fluorescence microscope with a bent optical fibre. **Journal of Microscopy**. V. 0, p. 1-12, 2015.
- LIN, J. D. The role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders and thyroid cancer. **British Medical Journal**. V. 322, p. 1525-1527, 2001.
- LIU, B.; MIN, M. W.; BAO, J. K. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. **Autophagy**. V. 5, p. 432-433, 2009.
- LIU, B.; BIAN, H. J.; BAO, J. K. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**. V. 287, p. 1-12, 2010.
- LIU, W. T.; LIN, C. H.; HSIAO, M.; GEAN, P. W. Minocycline inhibits the growth of glioma by inducing autophagy. **Autophagy**. V. 7 p. 166-175, 2011.
- LIU, Z.; LUO, Y.; ZHOU, T. T.; ZHANG, W. Z. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? **Cell Proliferation**. V. 46, p.509-515, 2013
- LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy and more. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. V. 36, p. 2405-2419, 2004.
- MAIESE, K.; CHONG, Z. Z.; SHANG, Y. C.; WANG, S. Targeting disease through novel pathways of apoptosis and autophagy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. V. 16, p. 1203-1214, 2012.
- MAJNO, G.; JORIS, L. Apoptosis, oncosis and necrosis. **Am J Pathol**. V. 146, p. 3-15, 1995.
- MARTÍN, V.; SANCHEZ-SANCHEZ, A. M.; PUENTE-MONCADA, N.; GOMEZ-LOBO, M.; ALVAREZ-VEGA, M. A.; ANTOLÍN, I.; RODRIGUEZ, C. Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells. **Journal of Pineal Research**. V. 57, p. 308-316, 2014.
- MIRET, S.; DE GROENE, E. M.; KLAFFKE, W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. **Journal of Biomolecular Screening**. V. 11, p. 184-193, 2006.

- MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biol Plant Praga – Czechoslov.** V. 26, n. 26, p. 113-20, 1984.
- MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, J. T. A. Isolation and partial characterization of a lectin from seeds of *Dioclea violacea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.* V. 8, p. 23–29, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** V. 65, p. 55-63, 1983.
- MUKERJEE, S. **O imperador de todos os males** – Uma biografia do câncer. São Paulo: Companhia da Letras, 2012, 634 p.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products.** V. 70, p. 461-477, 2007.
- OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer.** V. 4, p. 592-603, 2004.
- OKAZAKI, T.; KAGEJI, T.; KUWAYAMA, K.; KITAZATO, K. T.; MURE, H.; HARA, K.; MORIGAKI, R.; MIZOBUCHI, Y.; MATSUZAKI, K.; NAGAHIRO, D. Upregulation of endogenous PML induced by a combination of interferon-beta and temozolomide enhances p73/YAP-mediated apoptosis in glioblastoma. **Cancer Letters.** V. 323 (2), p. 199-207, 2012.
- OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **Journal of the American Medical Association.** V. 310, p. 1842-1850, 2013.
- OSTROM, Q. T.; GITTLEMAN, H.; FULOP, J.; LIU, M.; BLANDA, R.; KROMER, C.; WOLINSKY, Y.; KRUCHKO, C.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro-Oncology.** V. 17, p. 1-62, 2015.
- PAGENSTECHER, A.; WUSSLER, E. M.; OPDENAKKER, G.; VOLK, B.; CAMPBELL, I. L. Distinct expression patterns and levels of enzymatic activity of matrix metalloproteinases and their inhibitors in primary brain tumors. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.** V. 60, p. 598-612, 2001.
- PERRY, S. W.; NORMAN, J. P.; BARBIERI, J.; BROWN, E. B.; GELBARD, H. A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. **BioTechniques.** V. 50, p. 98-115, 2011.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology.** V. 109, p. 347-352, 1995.
- PORTER, A. G.; JANICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation.** V. 6, p. 99-104, 1999.
- 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, 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, p. 917-924, 2014.
- PREUSSER, M.; DE RIBAUPIERRE, S.; WOHRER, A.; ERRIDGE, S. C.; HEGI, M.; WELLER, M.; STUPP, R. Current concepts and management of glioblastoma. **Annals of Neurology**. V. 70, p. 9-21, 2011.
- RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and metabolism. *Science*. V. 330, p. 1344-1348, 2010.
- RAJAGOPALAN, V.; VAIDYANATHAN, M.; JANARDHANAM, V. A.; BRADNER, J. E. Pre-Clinical Analysis of Changes in Intra-cellular Biochemistry of Glioblastoma Multiforme (GBM) Cells Due to c-Myc Silencing. **Cellular and Molecular Neurobiology**. V. 34, p. 1059-1069, 2014
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**. V. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.
- RICHARD, D. E.; VOURET-CRAVIARI, V.; POUYSSEGUR, J. Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. **Oncogene**. V. 20, p. 1556-1562, 2001.
- RÍOS-MARCO, P.; RÍOS, A.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M.; CARRASCO, M. P.; MARCO, C. Cholesterol homeostasis and autophagic flux in perifosine-treated human hepatoblastoma HepG2 and glioblastoma U-87 MG cell lines. **Biochemical Pharmacology**. V. 96, p. 10-19, 2015.
- ROSA, R.; SANFELIU, C.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.; FRANSEN, A.; SCHOUSBOE, A.; SUÑOL, C. Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. **Journal of Neuroscience Research**. V.47, p.27-33, 1997.
- RUBIN, J. B.; KUNG, A. L.; KLEIN, R. S.; CHAN, J. A.; SUN, Y.; SCHMIDT, K.; KIERAN, M. W.; LUSTER, A. D.; SEGAL, R. A. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. V. 100, p. 13513-13518, 2003
- RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- RUBINSZTEIN, D. C.; GESTWICKI, J. E.; MURPHY, L. O.; KLIONSKY, D. J. Potential therapeutic applications of autophagy. **Nature Reviews Drug Discovery**. V. 6, p. 304-312, 2007.
- SALGIA, R. Fibroblast growth factor signaling and inhibition in non-small cell lung cancer and their role in squamous cell tumors. **Cancer Medicine**. V. 3, p. 681-692, 2014.
- SAMPSON, J. H.; KAMINSKI, T. J.; SCHULMAN, K. A. Our failure to advance new treatments for glioma to market. **Journal of Neurosurgery**. V. 115, p. 245-247, 2011.
- SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The Crystal Structure of Canavalia Brasiliensis Lectin Suggests a

Correlation between Its Quaternary Conformation and Its Distinct Biological Properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**. V. 405, p. 114–118, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**. V. 246, p. 227-234, 1989.

SHEN, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, R.; TU, X.; GONG, X. Ursolic acid induces autophagy in U87MG cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress. **Chemico-Biological Interactions**. V. 218, p. 28-41, 2014.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**. V. 274, p. 1672-1677, 1996.

SINHA, S.; GUPTA, G.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**. V. 17, p. 498-505, 2007.

SRINIVAS, V. R.; REDDY, G. B.; AHMAD, N.; SWAMINATHAN, C. P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1527, p. 102-111, 2001.

STEVENSON, C. B.; EHTESHAM, M.; MCMILLAN, K. M.; VALADEZ, J. G.; EDGEWORTH M. L.; PRICE, R. R.; ABEL, T. W.; MAPARA, K. Y.; THOMPSON, R. C. CXCR4 expression is elevated in glioblastoma multiforme and correlates with an increase in intensity and extent of peritumoral T2-weighted magnetic resonance imaging signal abnormalities. **Neurosurgery**. V. 63, p. 560-570, 2008.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CANETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**. V. 114, p. 785-796, 2012

STUPP, R.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDHORN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J. G.; EISENHAEUER, E.; MIRIMANOFF, R. O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**. V. 352, p. 987-996, 2005.

SUEN, Y. K.; FUNG, K. P.; CHOY, Y. M.; LEE, C. Y.; CHAN, C. W.; KONG, S. K. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. **Apoptosis**. V. 5, p. 369-377, 2000.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**. V. 32, p. 227-237, 1936.

TAN, T. T.; WHITE, E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 615, p. 81-104, 2008.

TAN, L.; JIA, X.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; TANG, H.; YAO, S.; XIE, Q. Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. **Analytical Biochemistry**. V. 383, p. 130-136, 2008.

TAYLOR, B. S.; LADANYI, M. Clinical cancer genomics: how soon is now? **Journal of Pathology**. V. 223, p.318-326, 2011.

THORBURN, A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. **Apoptosis**. V. 13, p. 1-9, 2008.

TONÉ, S.; SUGIMOTO, K.; TANDA, K.; SUDA, T.; UEHIRA, K.; KANOUCI, H.; SAMEJIMA, K.; MINATOGAWA, Y.; EARNSHAW, W. C. Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. **Experimental Cell Research**. V. 313, p. 3635-3644, 2007.

TUSCHL, H.; SCHWAB, C. E. The use of flow cytometric methods in acute and long-term in vitro testing. **Toxicology in vitro**. V. 19, p. 845-852, 2005.

VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**. V. 17, p. 575-692, 1998.

VAN DE MARK, K. L.; GUIZZETTI, M.; GIORDANO, G.; COSTA, L. G. The activation of M1 muscarinic receptor signaling induces neuronal differentiation in pyramidal hippocampal neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 329, n. 2, 532-542, 2009.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**. V. 731, p. 237-245, 2011.

VERHAAK, R. G.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E.; WANG, V.; QI, Y.; WILKERSON, M. D.; MILLER, C. R.; DING, L.; GOLUB, T.; MESIROV, J. P.; ALEXE, G.; LAWRENCE, M.; O'KELLY, M.; TAMAYO, P.; WEIR, B. A.; GABRIEL, S.; WINCKLER, W.; GUPTA, S.; JAKKULA, L.; FEILER, H. S.; HODGSON, J. G.; JAMES, C. D.; SARKARIA, J. N.; BRENNAN, C.; KAHN, A.; SPELLMAN, P. T.; WILSON, R. K.; SPEED, T. P.; GRAY, J. W.; MEYERSON, M.; GETZ, G.; PEROU, C. M.; HAYES, D. N. Cancer Genome Atlas Research Network (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**. V. 17, p. 98-110, 2010.

XU, J. H.; YANG, H. P.; ZHOU, X. D.; WANG, H. J.; GONG, L.; TANG, C. L. Autophagy Accompanied with Bisdemethoxycurcumin-induced Apoptosis in Non-small Cell Lung Cancer Cells. **Biomed Environ Sci**. V. 28, p. 105-115, 2015.

WILHELMSSON, U.; FAIZ, M.; DE PABLO, Y.; SJOQVIST, M.; ANDERSSON, D.; WIDESTRAND, A.; POTOKAR, M.; STENOVEC, M.; SMITH, P.L.; SHINJYO, N.; PEKNY, T.; ZOREC, R.; STAHLBERG, A.; PEKNA, M.; SAHLGREN, C.; PEKNY, M. Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated notch pathway. **Stem Cells**. V. 30, p. 2320-2329, 2012.

WHITE, M. K.; CINTI, C. A Morphologic Approach to Detect Apoptosis Based on Electron Microscopy. **Methods in Molecular Biology**. V. 285, p. 105-111, 2004.

YAN, G. N.; YANG, L.; LV, Y. F.; SHI, Y.; SHEN, L. L.; YAO, X. H.; GUO, Q. N.; ZHANG, P.; CUI, Y. H.; ZHANG, X.; BIAN, X. W.; GUO, D. Y. Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating hedgehog pathway. **Journal of Pathology**. V. 234, p. 11-22, 2014.

YIN, J. J.; LI, Y. B.; WANG, Y.; LIU, G. D.; WANG, J.; ZHU, X. O.; PAN, S. H. The role of autophagy in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic  $\beta$  cell death. **Autophagy**. V. 8, p. 158-164, 2012.

YOSHIDA, H.; NAGAI, K. Induction of apoptotic cell death preferentially in reactive astrocytes by concanavalin A. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V. 108, p. 248-251, 2009.

ZHANG, H.; BEREZOV, A.; WANG, Q.; ZHANG, G.; DREBIN, J.; MURALI, R.; GREENE, M. I. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. **Journal of Clinical Investigation**. V. 117, p. 2051-2058, 2007.

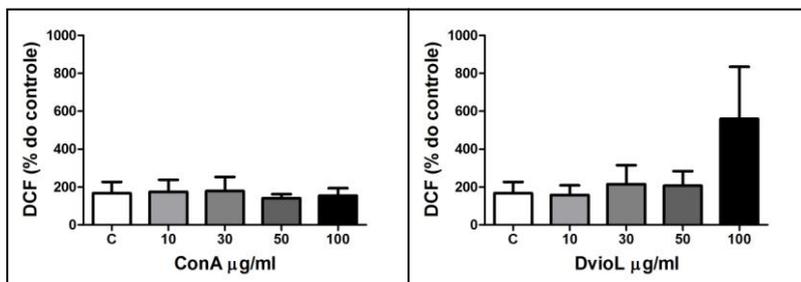
ZHANG, X.; CHEN, L. X.; OUYANG, L.; CHENG, Y.; LIU, B. Plant natural compounds: targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. **Cell Proliferation**. V. 454, p. 466-476, 2012.

ZHANG, X.; GUO, M.; SHEN, L.; HU, S. Combination of photodynamic therapy and temozolomide on glioma in a rat C6 glioma model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. V. 11, p. 603-612, 2014.

ZIEGLER, D. S.; KUNG, A. L. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. **Current Opinion in Oncology**. V. 20, p. 97-103, 2008.

## APÊNDICE 1

Células C6, após 6h de exposição ao veículo ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$  de ConA ou DvioL, foram incubadas com a sonda fluorescente DCF para avaliar estresse oxidativo por citometria de fluxo. Nesse tempo, não houve diferença significativa entre os grupos. Foram realizados 4 experimentos independentes para ConA e 6, para DvioL. Das seis repetições do teste para 100 $\mu\text{g/ml}$  de DvioL, duas tiveram valores muito alto (acima de 1000) e as outras quatro mantiveram o padrão do controle, isso explica o alto erro apresentado no gráfico.



O estresse oxidativo é um indutor de autofagia. ConA e DvioL após 6h de ação sobre células C6, já estabeleceram um número significativo de vacúolos autofágicos, portanto, o estresse oxidativo deve ser avaliado em um período de tempo menor.

## APÊNDICE 2

Células U-87 de glioblastoma humano também foram tratadas com veículo ou com as lectinas ConA e DvioL nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL por 6, 12 e 24h, seguido da avaliação da viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT. Os resultados mostram que a redução da viabilidade celular é maior nos tempos 6 e 12h. A suspeita é que as células U-87 se recuperaram do insulto. Isso é confirmado pela morfologia celular registrada por meio de microscopia óptica (aumento 20x), na qual é possível ver uma agregação das células com 12 horas de tratamento nas concentrações 50 e 100 $\mu$ g/mL de ConA e 30, 50 e 100 $\mu$ g/mL de DvioL. No tempo 24h, as células tenderam a estar mais espalhadas pela placa. A agregação de células foi mais intensa nos tratamentos de DvioL do que ConA. Esses grupos também foram submetidos as teste de atividade de LDH, mas nenhuma diferença estatística foi encontrada.

