

Flávia Garcia Lopes

**ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS
DO CAROTENÓIDE FUcoxANTINA EM CÉLULAS
DE GLIOBLASTOMA HUMANO**

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

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar.

Florianópolis
2018

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

Lopes, Flávia Garcia

Estudo dos efeitos antitumorais do carotenóide fucoxantina em células de glioblastoma humano / Flávia Garcia Lopes ; orientador, Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar, 2018.

112 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Glioblastoma. 3. Fucoxantina. 4. Apoptose. 5. Angiogênese. I. Aguiar, Cláudia Beatriz Nedel Mendes de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

“Estudo dos efeitos antitumorais do carotenóide Fucoxantina em células de glioblastoma humano”

Por

Flávia Garcia Lopes

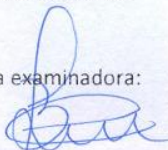
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (23/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



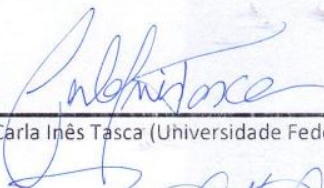
Prof. Dr. Geison de Souza Izídio

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

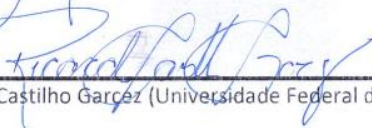
Banca examinadora:



Dr.ª Cláudia Beatriz N. Mendes de Aguiar (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora



Dr.ª Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Ricardo Castilho Garcez (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Norma Garcia Lopes e Aldemar Lopes por sempre me apoiarem, darem força em qualquer escolha que eu faça e por sempre me receberem de braços abertos quando algumas dessas escolhas dão errado. Acima de tudo agradeço por terem me ensinado a ser uma pessoa educada e principalmente honesta, queria dizer para vocês que tenho um imenso orgulho e sorte de ter vocês como pais.

Ao Rafael Garcia Lopes, pois, além de meu irmão mais velho, durante esse mestrado ele foi também meu orientador. Sem você mano, esse projeto nem existiria. Muito obrigada por aguentar as minhas reclamações e preocupações durante esses longos dois anos de mestrado.

A minha irmã do meio Fernanda Garcia Lopes, por ser minha melhor amiga e confidente e me apoiar durante todo esse período sempre se preocupando comigo e me ajudando.

A minha professora orientadora Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar por ter me acolhido há 6 anos atrás como aluna de I.C e insistir na loucura de me aceitar como aluna de mestrado. Muito obrigada por ter aceito a ideia desse projeto sem pestanejar e por ter me apoiado e contribuído demais nas ideias mirabolantes que tive ao longo do mesmo. Sua confiança em mim e no meu trabalho foi essencial para que esse projeto tenha vingado. Acima de tudo agradeço por muitas vezes ser uma segunda mãe para mim, sempre me perguntando se eu estava bem e se preocupando de verdade com meu bem-estar. Sempre vou ser grata por isso e te levarei para sempre na minha vida.

A Dra. Karen Andrinéia de Oliveira, eu não sei nem como agradecer por tudo que fizeste por mim, tudo que sei sobre gliomas, laboratório, cultura celular é graças à paciência e atenção que você teve em me ensinar, você foi essencial não só para que esse trabalho existisse, mas também para os demais trabalhos que eu realizarei durante minha vida. Muito obrigada de coração.

A Profa. Dra. Carla Inês Tasca, por me ter recebido e me acolhido na família Neuroquímica 4, por ter me deixado usar o seu Laboratório para realizar os meus experimentos, por sempre mostrar interesse nos meus resultados, me ajudar a interpreta-los e analisados. Sua ajuda foi muito importante para realização desse trabalho, eu sempre serei grata por sua generosidade.

Ao meu namorado Lucas Gordon, por me apoiar e me acalmar nos momentos de pânico durante esses dois anos de mestrado, por ter interesse em aprender sobre o meu trabalho e ficar ouvindo eu falar sobre os meus resultados sem muitas vezes entender o que eu estava falando. Acima de tudo por me incentivar e acreditar nesse trabalho tanto quanto eu, você não sabe o quão importante foi para mim esse incentivo.

A todos os meus amigos do Laboratório de Neuroquímica 4: Caio, Leandra, Luisa Débora, Daniel, Tetsade, Beatriz, Victor, Gabriela, e João Vitor. Obrigada por terem me aceitado no grupo, me ajudado nos experimentos e na elaboração desse trabalho.

As minhas melhores amigas, minhas irmãs, que me aturam a tanto tempo, Tuany, Ana Carolina Bello, Ana Júlia, Débora, Haruka, Jéssica, Mirvat, Renata e ao meu melhor amigo Marcelo.

Aos amigos da Biologia; Letícia, Jonata, Bruno, Mariana, Gabriela, Renato, Thyago, Beatriz ao melhor presente que a biologia me deu Guilherme Xuxa Mulinari.

Aos amigos que o mestrado me presenteou, Anderson, Natan, Maiara, Andressa, Madson, Thiciane, Rachel, Fernanda, Thiago. Especialmente para o Gabriel por ter disponibilizado seu tempo e atenção para me ajudar nos experimentos que constam nesse trabalho. Muito obrigada.

Ao Laboratório de Biologia Celular Vegetal, especialmente Dra Carmen Simioni por ter disponibilizado o seu tempo e reagentes para me ajudar no preparo das amostras para os experimentos de microscopia. Agradeço demais a sua generosidade e sua atenção.

Ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal especialmente a Me. Cláudia Bauer por ter gentilmente fornecido a Fucoxantina, sem você esse trabalho não teria acontecido, sou extremamente grata pela sua ajuda.

À CAPES pelo financiamento da bolsa auxílio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

Por fim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, de forma direta ou indireta.

RESUMO

Os gliomas são neoplasias do SNC que afetam tanto o cérebro quanto a medula espinhal. Os gliomas são categorizados histopatologicamente pela OMS em diferentes subtipos e graus (I a IV). O grau IV é reservado para um subtipo de astrocitoma, denominado glioblastoma (GBM). GBMs correspondem ao tipo mais agressivo e maligno de glioma sendo o tumor primário mais comum dentre os cerebrais. O tratamento padrão para pacientes com GBM recém-diagnosticado é a cirurgia, seguida de radioterapia e quimioterapia concomitante e adjuvante com TMZ. Porém, apesar dos tratamentos existentes, os pacientes GBM possuem uma sobrevida média de aproximadamente 14 meses. O tratamento para esta doença permanece relativamente ineficaz devido a uma série de desafios, quem incluem as altas taxas de evasão da apoptose pelas células GBM, de migração e invasão das células tumorais em tecidos cerebrais saudáveis e a capacidade das células tumorais de GBM induzirem a angiogênese. Portanto, é importante estudar outras opções alternativas de tratamento mais eficazes para GBM. Numerosos medicamentos anticancerígenos eficazes foram descobertos a partir de fontes naturais, como algas marinhas comestíveis e diatomáceas marinhas. Um dos componentes dessas algas, é a Fucoxantina. Fx é um abundante carotenóide marinho, sendo o pigmento mais importante na geração da cor marrom nas algas pardas. Este pigmento mostrou ter várias funções biológicas, que incluem efeitos anticancerígenos. Portanto, o uso de compostos naturais de alimentos, como Fx, é uma estratégia promissora para um tratamento alternativo para GBM. Devido a, este composto estar relacionado à atividade antitumoral e estar presente na dieta diária de regiões onde há baixa taxa de incidência de GBM. Então, o objetivo deste estudo foi determinar as atividades anticancerígenas de Fx em células GBM. Os efeitos destes compostos na viabilidade celular, migração, invasão e proliferação foram avaliados usando os ensaios MTT, *Wound Healing*, Transwell e Ki-67. Em relação aos resultados a Fx diminuiu a viabilidade celular de maneira concentração dependente em células GBM1, A172 e C6, mas não foi citotóxica em astrócitos murinos. Concentrações até 100 de Fx diminuíram 40% da proliferação celular da GBM1, 70% de migração da GBM1 e 90% de invasão das células GBM1. Além disso, o Fx induziu apoptose em células GBM1 sendo este efeito foi associado a perda de potencial de membrana mitocondrial, aumentando os níveis de EROs e induzindo o estresse do RER. Também analisamos que a exposição ao meio condicionado das

células GBM1 tratadas com 100 μ M de Fx inibiu a diferenciação e a formação de tubos das HUVECs e reduziu drasticamente a densidade vascular da membrana vitelínica da codorna. Esses resultados sugerem que a Fx induz a apoptose, reduz a proliferação celular, migração, invasão das células GBM e o tratamento com esse cartenoide nas células GBM1 inibe a angiogênese.

Palavras Chaves: Glioblastoma. Fucoxantina. Apoptose. Migração. Invasão. Angiogênese.

ABSTRACT

Gliomas are central nervous system neoplasms that affect both the brain and the spinal cord. Gliomas are histopathologically categorized by the WHO into different subtypes and grades (I to IV). Grade IV is reserved for a subtype of astrocytoma, glioblastoma (GBM). GBM are the most malignant glioma and the most common malignant primary brain tumor. GBM are very difficult to treat, and the standard treatment for patients with newly diagnosed GBM is surgery, followed by concomitant and adjuvant TMZ plus radiotherapy. Despite the treatments the patients with GBM median survival time is only approximately 14 months. The treatment for this disease remains relatively ineffective because of a number of challenges, including evasion of apoptosis by the GBM cells, the migration and invasiveness of GBM tumor cells into normal brain tissues and the ability of GBM tumor cells to induce angiogenesis. Therefore, it is important to study other alternative treatment options for GBM. Numerous effective anticancer drugs have been discovered from natural sources, such as edible seaweeds and marine diatoms. One of the algae biomass components is Fucoxanthin. Fx is an abundant marine carotenoid, and it is the most important pigment in generating the brown color in brown seaweeds. This pigment has been shown to have several biological functions, that include anticancer effects. Thus, the use of natural compounds from food, such as Fx, is a promising strategy for an alternative treatment for GBM. Due to, these compound is relate to antitumor activity and are present in the daily diet of regions where there is low incidence rate gliomas. Then, the aim of this study was to determine the anticancer activities of Fx on GBM cells. Effects of these compounds on cell viability, migration, invasion and proliferation were evaluated using MTT, Wound Healing, Transwell and Ki-67 assays. Fx decreased cell viability in a concentration-dependent manner in GBM1, A172 and C6 cells but was not cytotoxic in murine astrocytes. Concentrations up to 100 of Fx decreased 40% of GBM1 cell proliferation, 70% of GBM1 migration and 90% of GBM1 invasion. In addition, Fx induced apoptosis in GBM1 cells and this effect was associated with a loss of mitochondrial membrane potential, increased levels of ROS and RER stress. Besides that, exposure to the condition media of GBM1 cells treated with Fx 100 μ M inhibits the differentiation and tube formation of HUVECs and drastically reduced the vascular density of the quail yolk membrane. Taken together, these findings

suggest that Fx augments apoptosis, and reduces cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis on GBM.

Keywords: Glioblastoma. Fucoxanthin. Apoptosis. Migration. Invasion. Angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática do processo de diferenciação de células tronco neurais em diferentes linhagens celulares do SNC e células progenitoras dos gliomas | 20 |
| Figura 2 - Diagrama conceitual da transição molecular, fenotípica e comportamental de células submetidos a EMT | 26 |
| Figura 3 - Nova formação dos vasos sanguíneos | 28 |
| Figura 4 - Mecanismo de Angiogenesis Tumoral | 29 |
| Figura 5 - Angiogenese em glioblastoma | 30 |
| Figura 6 - Representação das três vias ativadoras de apoptose | 32 |
| Figura 7 - Estrutura química da fucoxantina | 34 |
| Figura 8 - Efeitos anticancerígenos de Fucoxantina (Fx) e Fucoxantíol (Fxol) de acordo com diferentes tipos de câncer e as vias moleculares mais importantes envolvidas nas suas ações. A eficiência Fx/Fxol contra qualquer tipo de câncer foi igual em ambos os sexos. | 36 |
| Figura 9 - Ensaio de <i>wound healing</i> | 43 |
| Figura 10 - Esquema ensaio Transwell® | 44 |
| Figura 11 - Gráfico de pontos obtido em citometria de fluxo após indução de apoptose e marcação das células com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo | 47 |
| Figura 12 - Fucoxantina diminui a viabilidade das células de glioblastoma | 54 |
| Figura 13 - Tratamento com Fucoxantina diminui o número de células GBM1 | 55 |
| Figura 14 - Fucoxantina inibe a proliferação das células de glioblastoma humano | 57 |
| Figura 15 - Fucoxantina diminui o potencial clonogênico das células de glioblastoma humano..... | 58 |
| Figura 16 - Fucoxantina diminuiu a migração celular em glioblastoma humano | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 17 - Fucoxantina diminui a invasão de células GBM1 | 63 |
| Figura 18 - Fucoxantina induz apoptose em células de glioblastoma humano | 64 |
| Figura 19 - Fucoxantina induz a formação de corpos apoptóticos em célula do glioblastoma..... | 66 |
| Figura 20 - Fucoxantina induz condensação do núcleo celular e estresse do RER..... | 67 |
| Figura 21 - Fucoxantina causa diminuição do potencial de membrana mitocondrial e diminui a produção de ATP em células GBM1..... | 69 |
| Figura 22 - Fucoxantina induz aumento de espécies reativas de oxigênio em células GBM1..... | 70 |
| Figura 23 - O meio condicionado de células de glioblastoma tratadas com Fucoxantina não impede a migração das células HUVECs | 72 |
| Figura 24 - O meio condicionado de células de glioblastoma tratadas com Fucoxantina impede a tubulogênese das células HUVECs | 73 |
| Figura 25 - O meio condicionado de células de glioblastoma tratadas com Fucoxantina inibe a angiogênese <i>ex vivo</i> | 75 |

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Graduação de gliomas e suas características segundo a OMS ..21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| BAK | <i>BCL2 Antagonist/Killer</i> |
| BAX | <i>BCL2-associated X protein</i> |
| BHC | <i>Barreira Hematoencefálica</i> |
| BH3 | <i>BCL-2 homologous 3</i> |
| BID | <i>BH3-interacting domain death agonist</i> |
| CBTRUS | Centro de Registro de Tumores no Cérebro dos Estados Unidos |
| CSC | <i>Cancer Stem Cells</i> |
| DCFH-DA | 2'-7'-diacetado diclorofluoresceína |
| DCFH | Diclorofluoresceína |
| DMSO | Dimetil-Sufóxido |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FCCP | Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone |
| FGF | Fator de Crescimento de Fibroblastos |
| Fx | Fucoxantina |
| Fxol | Fucoxantíol |
| H2O2 | Peróxido de Hidrogênio |
| HUVEC | Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana |
| GBM | Glioblastoma Multiforme |
| IAP | Proteínas Inibitórias-De-Apoptose |
| MEC | Matriz Extracelular |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MET | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| MMP | Metaloproteinase |
| MTT | 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazol brometo |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | Salina Tamponada por Fosfato |
| PFA | Paraformaldeído |
| RER | Retículo Endoplasmático Rugoso |

| | |
|-------------|--|
| SBF | Soro Bovino Fetal |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TEM | Transição Epitélio-Mesenquimal |
| TMRE | Trimetilrodamina Etil Éter |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| VEGF | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1 | GLIOMAS | 19 |
| 1.2 | GLIOBLASTOMA MULTIFORME..... | 22 |
| 1.3 | MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR | 24 |
| 1.4 | ANGIOGÊNESE | 27 |
| 1.5 | APOPTOSE | 31 |
| 1.6 | FUCOXANTINA..... | 33 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 37 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 37 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 37 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 3.1 | CULTURA PRIMÁRIA DE GLIOBLASTOMA HUMANO... 39 | 39 |
| 3.2 | CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS DE RATOS | 39 |
| 3.3 | CULTURA DAS LINHAGENS CELULARES | 39 |
| 3.4 | FUCOXANTINA..... | 40 |
| 3.5 | VIABILIDADE CELULAR | 40 |
| 3.6 | ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR | 41 |
| 3.7 | ANÁLISE DA CLONOGENICIDADE CELULAR | 41 |
| 3.8 | MIGRAÇÃO CELULAR..... | 42 |
| 3.9 | INVASÃO CELULAR | 44 |
| 3.10 | ANÁLISE DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) | 45 |
| 3.11 | ANÁLISE DO EFEITO DA FUCOXANTINA NAS MITOCÔNDRIAS DAS CÉLULAS GBM1 | 45 |
| | 3.11.1 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) | 45 |
| | 3.11.2 Quantificação dos níveis de ATP..... | 46 |
| 3.12 | DETECÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE: IODETO DE PROPÍDEO E ANEXINA..... | 46 |
| 3.13 | ANÁLISE DO EFEITO DA FUCOXANTINA NA MORFOLOGIA, SUPERFÍCIE E NA ULTRAESTRURA DAS CÉLULAS GBM..... | 47 |
| | 3.13.1 Análise do núcleo celular por coloração com Hoechst | 47 |
| | 3.13.2 Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 48 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.13.3 | Microscopia Eletrônica de Transmissão | 48 |
| 3.14 | AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-ANGIOGÊNICO DA FUCOXANTINA..... | 49 |
| 3.14.1 | Ensaio de Tubulogênese..... | 49 |
| 3.14.2 | Ensaio de migração quimiotática..... | 49 |
| 3.14.3 | Ensaio de angiogênese <i>ex ovo</i> por membrana vitelínica de codorna | 50 |
| 4 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 51 |
| 5 | RESULTADOS | 53 |
| 5.1 | FUCOXANTINA DIMINUI A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA..... | 53 |
| 5.2 | FUCOXANTINA INIBE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO..... | 56 |
| 5.3 | FUCOXANTINA DIMINUIU O POTENCIAL CLONOGÊNICO DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO | 56 |
| 5.4 | FUCOXANTINA DIMINUIU A MIGRAÇÃO CELULAR EM GLIOBLASTOMA HUMANO | 59 |
| 5.5 | FUCOXANTINA DIMINUI A INVASÃO DE CÉLULAS GBM1 | 61 |
| 5.6 | FUCOXANTINA INDUZ APOPTOSE EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO..... | 62 |
| 5.7 | FUCOXANTINA INDUZ CONDENSAÇÃO DO NÚCLEO CELULAR E FORMAÇÃO DE CORPOS APOPTÓTICOS EM CÉLULA DO GLIOBLASTOMA..... | 65 |
| 5.8 | FUCOXANTINA INDUZ A PERDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E DIMINUI A PRODUÇÃO DE ATP EM CÉLULAS GBM1..... | 68 |
| 5.9 | FUCOXANTINA INDUZ AUMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS GBM1 | 70 |
| 5.10 | FUCOXANTINA INIBE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVECS)..... | 71 |
| 5.11 | FUCOXANTINA INIBE A ANGIOGÊNESE <i>IN VIVO</i> | 74 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 77 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 87 |
| | REFERÊNCIAS..... | 89 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS

Os gliomas são tumores primários que atingem o Sistema Nervoso Central (SNC), e podem ser originários de células não neurais chamadas de células gliais (JIANG; UHRBOM, 2012). No SNC, existem quatro tipos de células gliais, astrócitos, oligodendrócitos, células microgliais e ependimárias. Os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização, enquanto as células microgliais são derivadas de células estaminais hematopoiéticas e protegem o SNC fagocitando patógenos. As células ependimárias revestem os ventrículos cerebrais e são responsáveis pela manutenção da homeostase no cérebro e no meio extracelular da retina. Os astrócitos, o tipo mais abundante de células gliais no SNC, são células em forma estrelada que estabelecem a homeostase metabólica (BARRES, 2003; 2008; DEL BIGLIO, 2010).

Os tumores gliais correspondem a cerca de 77 % de todas as neoplasias do SNC. Mais de 19.000 novos casos são diagnosticados a cada ano, com uma taxa de 6,24 a cada 100.000 adultos e 0,71 a cada 100.000 crianças (OSTROM et al., 2015; OSTROM et al., 2017). Os tumores diagnosticados variam consideravelmente em morfologia, localização e resposta às mais variadas terapias (OHGAKI; KLEIHUES, 2009).

As regiões com as maiores taxas relatadas de tumores cerebrais malignos primários, são no Norte da Europa, nos Estados Unidos e em Israel, com taxas de incidência de 11 a 20 por 100.000 habitantes. Por outro lado, essas taxas são expressivamente mais baixas no Japão e na África (LIU et al., 2011; OSTROM et al., 2015; OSTROM et al., 2017).

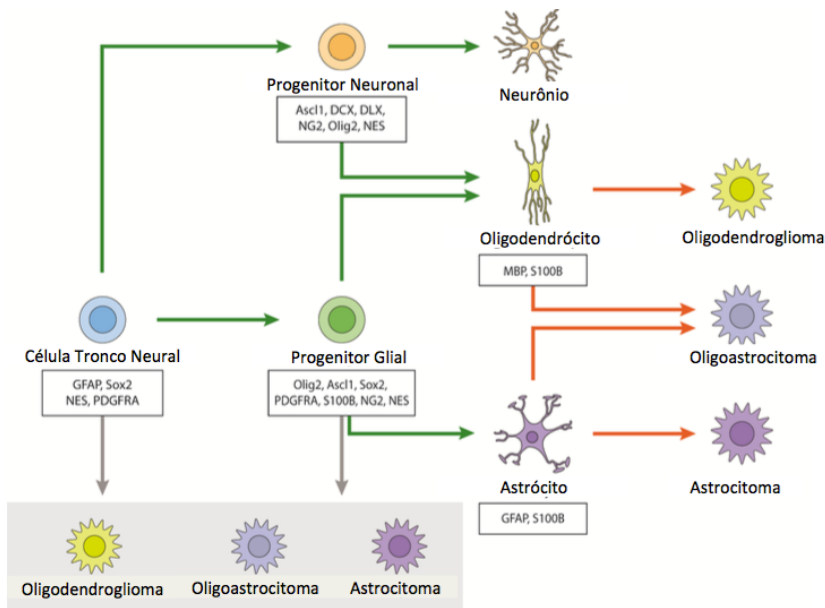
O Centro de Registro de Tumores no Cérebro dos Estados Unidos (CBTRUS) indica que as taxas de incidência de gliomas são duas vezes maiores em pessoas caucasianas do que em pessoas afro-americanas e asiáticas. Além disso, ocorre uma maior taxa de incidência em homens em relação a mulheres, sendo o risco de 1,5 vezes maior no sexo masculino (OSTROM et al., 2015; OSTROM et al., 2017).

O tipo celular precursor do glioma ainda permanece controverso. A hipótese clássica postula que as células tumorais são resultado do acúmulo de alterações que ocorrem em células maduras diferenciadas, sendo que essa ação promoveria a desdiferenciação dessas células ao longo do processo cancerígeno. Este conceito é suportado, por exemplo, pelas semelhanças histológicas entre células gliais funcionais

diferenciadas e células tumorais de gliomas (SINGH et al., 2004; ALCANTARA; LLAGUNO; PARADA, 2016).

A segunda e mais recente hipótese, pressupõe que as células tumorais se originam do acúmulo de alterações que ocorrem diretamente nas células tronco ou células indiferenciadas progenitoras (multipotentes), que se encontram em diferentes tecidos (células-tronco neurais ou células progenitoras gliais, no caso dos gliomas). De acordo com essa lógica, o processo tumorigênico não seria acompanhado por um mecanismo de dediferenciação, pois as alterações moleculares se acumulariam diretamente em células indiferenciadas (DIRKS, 2010; HEYWOOD et al., 2012; ALCANTARA; LLAGUNO; PARADA, 2016) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do processo de diferenciação de células tronco neurais em diferentes linhagens celulares do SNC e células progenitoras dos gliomas



Os marcadores de proteínas para células tronco neurais, células progenitoras e células diferenciadas são indicados em caixas. A hipótese clássica sobre a origem das células de glioma é representada por setas laranjas. A hipótese mais recente é representada por setas cinzas.

Fonte: adaptado de Gonçalves et al. (2013).

Os gliomas podem ser categorizados com base no tipo de células gliais que são mais histologicamente semelhantes, à localização do tumor e ao grau de agressividade das células tumorais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece sete tipos distintos de gliomas, conforme listado no Quadro 1, os quais são divididos de acordo com a malignidade em níveis de I a IV (OHGAKI; KLEIHUES, 2009).

Quadro 1 - Graduação de gliomas e suas características segundo a OMS

| Graduação dos astrocitomas | Características patológicas | Tipos de tumores | Características dos tumores |
|----------------------------|--|---|---|
| Grau I | Lesões não infiltrativas, com baixo potencial proliferativo, sem atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose. | Astrocitoma pilocítico, astrocitoma de células gigantes subependimais, xantastrocitoma pleomórfico e subependimona. | Apresentam células bem diferenciadas, biologicamente benignos, passíveis de cura por cirurgia. |
| Grau II | Lesões em geral infiltrativas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose. | Astrocitoma difuso, oligodendroma, ependimona e oligoastrocitoma misto. | Considerados malignos, com infiltração precoce nos tecidos adjacentes, bem diferenciado, crescimento lento, pode progredir para astrocitoma anaplásico, incurável por cirurgia. |
| Grau III | Lesões infiltrativas, com atipias nucleares e alto índice mitótico. | Astrocitoma anaplásico, oligodendroma anaplásico, ependimoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico. | Apresenta altas taxas de anaplasia e proliferação, com características histológicas malignas e prognósticos desfavoráveis. |
| Grau IV | Lesões infiltrativas, atipias nucleares, alto índice mitótico, células gigantes multinucleadas, necrose e proliferação endotelial. | Glioblastoma multiforme | Exibem muitas características de malignidade, alta ocorrência de angiogênese e necrose, elevada invasibilidade e baixos prognósticos. |

Fonte: adaptado de Kleihues et al. (2002).

1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

O glioblastoma multiforme (GBM) é considerado o mais maligno entre os tipos de tumores do SNC. O prognóstico é ruim na maioria das vezes, visto que apenas aproximadamente 32 % dos pacientes sobrevivem por mais de 12 meses após o diagnóstico (OSTROM et al., 2017).

Os glioblastomas primários se desenvolvem sem que haja um histórico de lesões anteriores, sendo mais comuns em pacientes na faixa etária entre 55 a 60 anos. Já os glioblastomas secundários provêm da progressão tumoral de astrocitomas difusos (grau II) e astrocitomas anaplásicos (grau III), se desenvolvendo geralmente em pacientes considerados jovens, com menos de 45 anos (REIFENBERGER et al., 2012).

Os dados epidemiológicos mostram que o número de casos de GBM registrados na Europa e na América do Norte é de 2 a 3 por 100.000 adultos a cada ano, e a taxa de incidência em homens em relação às mulheres é de 1,26:1 (VERDECCHIA et al., 2002). Casos de GBM em crianças e neonatos também são relatados. Estima-se que a incidência deste tumor seja de 1,1 a 3,6 por 100.000 crianças, com a proporção de 3,3 crianças do sexo masculino com glioblastoma para uma criança do sexo feminino (MAHVASH et al., 2011).

A etiologia do GBM primário não foi totalmente elucidada. Acredita-se que a origem desse subtipo de glioma seja de forma espontânea, apesar da clínica descrever o desenvolvimento dessa neoplasia em pessoas da mesma família (1 % dos casos) (HOUBEN et al., 2005; SCHWARTZBAUM et al., 2006). No entanto, o contexto genético para o desenvolvimento deste tipo de glioblastoma é diferente dos que ocorrem espontaneamente (DANIELS et al., 2007).

Por mais que o surgimento desse tumor seja espontâneo, estudos relatam que a radiação ionizante, a exposição a pesticidas, compostos aromáticos policíclicos, solventes, campos eletromagnéticos e a certos metais são fatores que aumentam a probabilidade de desenvolver esse tipo de tumor. Acredita-se que o uso de telefone móvel não aumenta o risco de desenvolver GBM, porém o uso ao longo prazo ainda é indeterminado (SPINELLI et al., 2010). O GBM também pode ser considerado uma doença ocupacional. Pessoas empregadas na indústria de borracha e petromecânica são consideradas com maior risco de incidência a essa neoplasia (WRENSCH et al., 2002).

Em relação às características citopatológicas do GBM, as células são pleomórficas, com alta atividade mitótica e com presença de mitose

atípica. Morfológicamente, consistem em células pequenas, caracterizadas por polimorfismo, anaplasia e anisocariose significativa, além de possuírem o formato poligonal, difuso, com citoplasma acidófilo e fronteiras celulares distintas (SCHULTZ et al., 2005).

Analisando as características histopatológicas, os GBMs podem ser considerados tumores heterogêneos em sua composição celular, onde se encontram células tronco tumorais, células mesenquimais e células do estroma. Acompanhando as células neoplásicas, também estão presentes monócitos e macrófagos, que contribuem diretamente para a progressão tumoral, através da liberação de fatores pró-inflamatórios e angiogênicos (REIFENBERGER et al., 2012).

Os focos necróticos também são uma das características histopatológicas mais marcantes desse tipo de tumor. Dois tipos de necrose são tipicamente encontrados nos tecidos tumorais. O primeiro consiste em grandes áreas de necrose na área central do tumor, resultantes do fornecimento sanguíneo insuficiente em todos os glioblastomas primários. O outro tipo contém pequenos focos necróticos de forma irregular observados em glioblastomas primários e secundários. O aumento da malignidade desses tumores é proporcional à presença de áreas necróticas (RAZA et al., 2002; URBÁŃSKA et al., 2014).

Recentemente, a OMS apresentou uma nova forma de classificação, onde o GBM é subdividido de acordo com a expressão da Isocitrato desidrogenase (IDH) - enzima do ciclo do ácido tricarbóxico que catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato em α -cetoglutarato, com subsequente liberação de NADPH/NADH. Mutações na IDH ocorrem no início da gliomagenese, alterando a função da enzima, fazendo com que ela produza 2-hidroxil-glutarato e não produza NADPH. Entretanto, como a mutação IDH contribui para a transformação oncogênica, continua a ser controversa (COHEN et al., 2013).

Em relação a essa nova classificação, os GBMs se dividem em: (1) GBM, IDH-*wildtype* (cerca de 90 % dos casos), correspondendo aos casos mais frequentes de tumor primário ou *de novo*, sendo predominante em pacientes com mais de 55 anos de idade; (2) GBM, IDH-mutante (cerca de 10 % dos casos), correspondente a tumores secundários que surgem em pacientes mais jovens; e (3) GBM, NOS (*Not Otherwise Specified*), reservado para os tumores nos quais a avaliação completa do IDH não pode ser realizada (LOUIS et al., 2016).

Os GBMs também podem ser classificados por alterações cromossômicas, genéticas e epigenéticas complexas, que afetam uma

variedade de genes supressores de tumor e proto-oncogenes (DEIMILING et al., 2011). Devido a essas anormalidades gênicas apresentadas, somando-se à alteração do número de cópias e no perfil de expressão gênica, é possível classificar o GBM em quatro subtipos - Proneural, Neural, Clássico e Mesenquimal (VERHAAK et al., 2010). Essas novas classificações podem ajudar futuramente no diagnóstico e consequentemente na escolha do tratamento adequado para o paciente, pois não classifica apenas o tumor em GBM, mas também o subdivide em relação às suas diferentes características biológicas.

A terapia padrão para o GBM, diagnosticado em estágio inicial, inclui ressecção cirúrgica quando viável (paciente com idade até 70 anos e em boas condições gerais e neurológicas), associada à radioterapia e quimioterapia (STUPP et al., 2005; LIN; KLEINBERG, 2008).

O quimioterápico mais comumente utilizado na clínica para o tratamento do GBM é a Temozolomida (TMZ). Esse composto é um agente alquilante que atravessa a barreira hematoencefálica (BCH) (c) e em relação aos demais quimioterápicos, é o mais eficaz no tratamento pra GBM, aumentando a sobrevida mediana dos pacientes (FRIEDMAN et al., 2000; STUPP et al., 2005).

No entanto, apesar da existência desses tratamentos, a sobrevivência por mais de 36 meses é alcançada por apenas 12 % dos pacientes após o diagnóstico (SCHNEIDER et al., 2010). A baixa sobrevida dos pacientes é devido ao fato do GBM possuir alta taxa de progressão tumoral, pois suas células têm alta capacidade proliferativa, migratória, invasiva e de evasão à apoptose.

1.3 MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR

Uma das características mais marcantes do GBM é o seu comportamento invasivo (DEMUTH; BERENS, 2004; PAW et al., 2015). Estudos mostram que o tempo médio para a recidiva do GBM é de aproximadamente 32 a 36 semanas após o tratamento multimodal inicial, e que os tumores reaparecem predominantemente a 1 cm da cavidade de ressecção. Isto é devido principalmente ao fato de que, no momento da cirurgia, as células da massa tumoral, por possuírem alta capacidade migratória já invadiram o tecido peritumoral (HOU et al., 2006).

Embora as células de GBM possuam características invasivas, raramente realizam metástase. Todavia, quando ocorre, as células migram pelo líquido cefalorraquidiano ou sangue visando o baço, pleura, pulmão, linfonodos, fígado, ossos, pâncreas e intestino delgado

(WALLACE et al., 1996; AL-RIKABI et al., 1997; JAMJOOM et al., 1997; WIDJAJA et al., 2000; MUJIC et al., 2006; ROBERT; WASTIE, 2008; BIRBILIS et al., 2010; LUN et al., 2011).

A primeira hipótese que discute o baixo potencial metastático do GBM, sugere que as células tumorais não fariam a metástase devido à presença da barreira hematocefálica, pois a mesma impediria as células tumorais de migrarem para fora do SNC e colonizarem outros tecidos. Já a segunda hipótese, considera o fato do GBM ser extremamente agressivo acarretando ao paciente uma sobrevida muito baixa, levando-o a óbito antes mesmo das células migrarem e se estabelecerem em outro sistema (TYSNES; MAHESPARAN, 2001). Além disso, o cérebro é desprovido de vasos linfáticos, então as metástases através deste caminho são impossíveis (ROBERT; WASTIE, 2008).

Apesar de não causarem metástase, as células de GBM invadem ativamente o cérebro, utilizando dois tipos de espaços extracelulares: o espaço perivascular que é encontrado ao redor dos vasos sanguíneos e o espaço entre os neurônios e as células da glia, que compõem o parênquima cerebral e as fibras da massa branca (PAW et al., 2015).

Outra forma de invasão tumoral é via liberação de glutamato. Devido à sua localização, os GBMs possuem uma limitação espacial ao seu crescimento. Tal limitação parece ser contornada através da morte do tecido peritumoral. Sugere-se que esta morte ocorra, em parte, pela liberação de altas concentrações de glutamato pelas células tumorais, diminuindo a viabilidade das células saudáveis e por conseguinte abrindo espaço e possibilitando a invasão das células cancerígenas nos tecidos saudáveis adjacentes (DE GROOT; SONTHEIMER, 2011; OLIVEIRA et al., 2017).

Para que as células de GBM consigam realizar esse processo migratório, essas células tumorais devem sofrer uma transição epitélíomesenquimal (TEM). A TEM consiste em um programa molecular que permite que a célula passe por múltiplas modificações bioquímicas, para atingir um fenótipo mesenquimal associado à migração, capacidade de invasão, aumento da resistência à apoptose e à secreção amplificada dos componentes de matriz extracelular (MEC) (TURLEY et al., 2008).

Nesse processo, as células de tumores primários perdem suas características básicas. Essas alterações incluem a perda da polaridade apical-basal, o rompimento de junções célula-célula, junções de ancoragem, desmossomos e filamentos de queratina, produção de metaloproteinases (MMPs) de MEC e outras proteases (MICALIZZI et al., 2010). Durante esse processo também ocorre a baixa expressão da caderina endotelial (E-caderina) acompanhada pelo aumento da

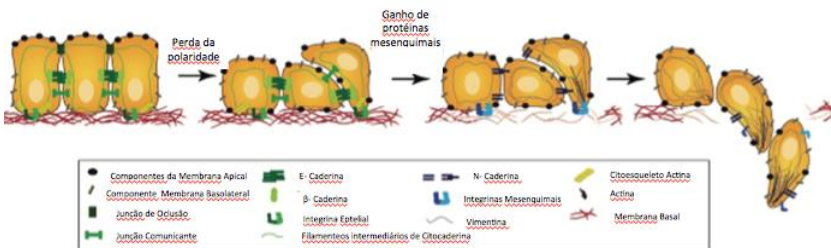
expressão da caderina neural mesenquimal (N-caderina), resultando em um "interruptor de caderina", alterando a adesão celular e consequentemente induzindo um caráter invasivo nas células (LAMOUILLE et al., 2014) (Figura 2).

Além de adquirirem a capacidade migratória, as células de glioma precisam invadir a barreira física da MEC. Essa ação inicia-se através da degradação das proteínas presentes na MEC pelas MMPs criando assim, um caminho para a invasão. Muitos estudos relataram o envolvimento e a super expressão das MMPs em vários tipos de células tumorais em comparação às células normais, incluindo células de glioma (TONN; GOLDBRUNNER, 2003). Portanto, não é surpreendente que muitos dos caminhos que promovem a invasão de células de GBM também reforcem a expressão de várias MMPs (KOUL et al., 2001; KUBIATOWSKI et al., 2001; LEE et al., 2013).

Embora a MEC seja uma barreira física que as células de glioma devem atravessar, ela também fornece ligantes onde as células tumorais podem ancorar, para que elas possam se locomover. Além dessas interações físicas, a MEC também interage quimicamente com células de glioma. Vários estudos demonstraram que os tumores influenciam as células do estroma próximas, causando reorganização da estrutura e composição da MEC. Essas mudanças na MEC favorecem ainda mais o crescimento e invasão de tumores (FRIEDL; ALEXANDER, 2011).

Apesar de existirem diversos tipos de tratamentos para o GBM, o problema da recorrência do tumor não foi resolvido. Como o GBM é tão invasivo, essas células tumorais podem se mover para o tecido cerebral normal, onde escapam à cirurgia e/ou à terapia de radiação. Portanto, existe uma necessidade urgente de desenvolver novas opções de tratamento que possam suprimir a invasividade das células GBM.

Figura 2 - Diagrama conceitual da transição molecular, fenotípica e comportamental de células submetidas a EMT



Fonte: adaptado de Micalizzi et al (2010).

1.4 ANGIOGÊNESE

Além da alta capacidade invasiva das células de GBM, uma das razões que rege a recidiva dessa neoplasia e um prognóstico ruim é a sua natureza altamente angiogênica. Uma característica patológica dessa neoplasia que a distingue de tumores de baixo grau de malignidade é a proliferação microvascular, sendo esse tumor altamente vascularizado (DAS; MARSDEN, 2013).

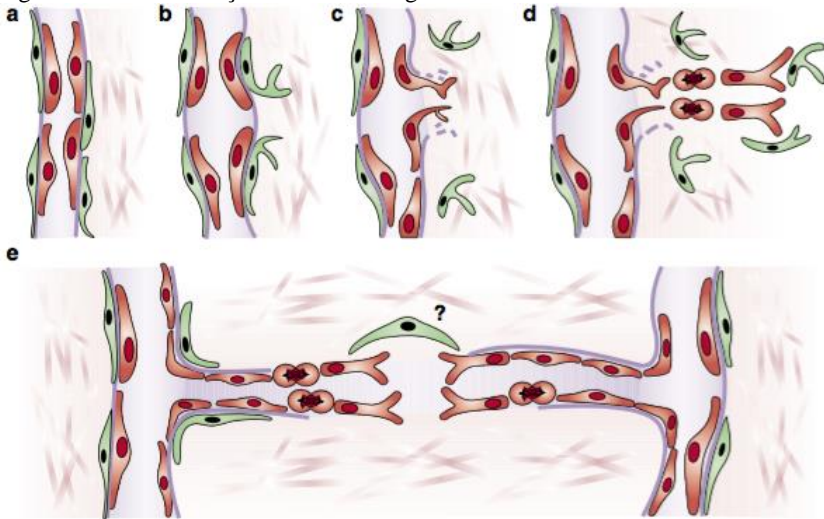
A angiogênese corresponde à formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, caracterizando-se por um processo complexo, dependente de vários fatores e proteínas extracelulares mediadoras e responsáveis por muitos processos fisiológicos, como adaptação do tecido à hipóxia e manutenção do crescimento e da sobrevivência de células neoplásicas (FUS; GÓRNICKA, 2016).

Na angiogênese fisiopatológica, um vaso sanguíneo inicialmente dilata, tornando-se mais permeável. No local onde o estímulo pró-angiogênico é mais forte, a membrana basal é degradada parcialmente, por onde as células endoteliais migram para os tecidos circundantes. Estas células então se agrupam, em uma estrutura tubular, formando um lúmen, diferenciando-se e aderindo firmemente umas às outras, num processo chamado tubulogênese (KURZ, 2000; BERGERS; SONG, 2005; GAO et al., 2008).

Após esse processo, as células endoteliais proliferam na parede vascular permitindo a ampliação do diâmetro do vaso sanguíneo e então o capilar recém-formado é coberto por pericitos (KURZ, 2000; BERGERS; SONG, 2005; GAO et al., 2008). No cérebro, os pericitos desempenham um papel crítico na regulação da função dos vasos sanguíneos - eles controlam o fluxo sanguíneo local, da permeabilidade da BCB, e se comunicam diretamente com as células endoteliais através de junções e sinais parácrinos solúveis (BERGERS; SONG, 2005; WINKLER et al., 2011) (Figura 3).

Os principais fatores que regulam esse mecanismo são o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (YANCOPOULOS, 2010; FUS; GÓRNICKA, 2016). Esses fatores interagem com glicosaminoglicanos e proteoglicanos, como proteoglicanos de sulfato de heparana, presentes na MEC, na lâmina basal e em receptores de superfície celular, regulando o crescimento, a proliferação, a migração, a diferenciação e a sobrevivência das células endoteliais e outros tipos celulares (CHIPPERFIELD et al., 2002).

Figura 3 - Nova formação dos vasos sanguíneos



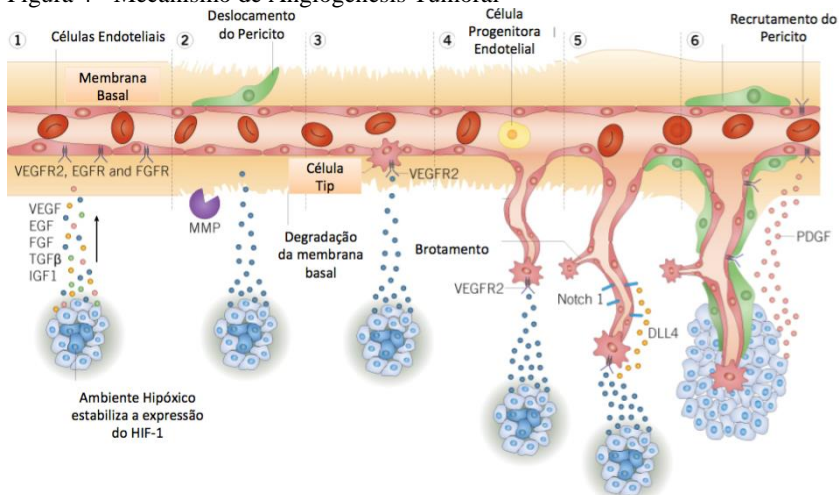
A) Os vasos sanguíneos surgem a partir de capilares preexistentes. b) Os pericitos (verde) separam-se e os vasos sanguíneos dilatam, antes da membrana basal e matriz extracelular serem degradadas. C) As células endoteliais (vermelho) migram para o espaço perivascular no sentido dos estímulos angiogênicos d) As células endoteliais proliferam e são guiadas pelos pericitos. E) As células endoteliais aderem umas às outras e criam um lúmen. Os vasos sanguíneos se fundirão com outros brotos para construir novos sistemas circulatórios. Pouco se sabe sobre este mecanismo de fusão

Fonte: adaptado de Bergers et al (2005).

No estado fisiológico, existe nos tecidos um equilíbrio constante entre os indutores endógenos angiogênicos (fatores pró-angiogênicos) e inibidores (fatores anti-angiogênicos). Nos tumores, quando o equilíbrio é rompido e desloca-se a favor dos fatores pró-angiogênicos, o chamado interruptor angiogênico (*angiogenesis switch*) é ativado e uma nova vasculatura começa a se formar (FOLKMAN, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2000; BERGERS; BENJAMIN, 2003).

O mecanismo mais conhecido de angiogênese tumoral (Figura 4) é a germinação capilar, onde ocorre o desenvolvimento de novos brotos de capilares do tecido pré-existent. Um tumor, geralmente, não pode crescer mais do que alguns milímetros, a menos que o desenvolvimento de um novo suprimento de vasos sanguíneos seja induzido, de modo a invadir e vascularizar a massa tumoral (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

Figura 4 - Mecanismo de Angiogenesis Tumoral



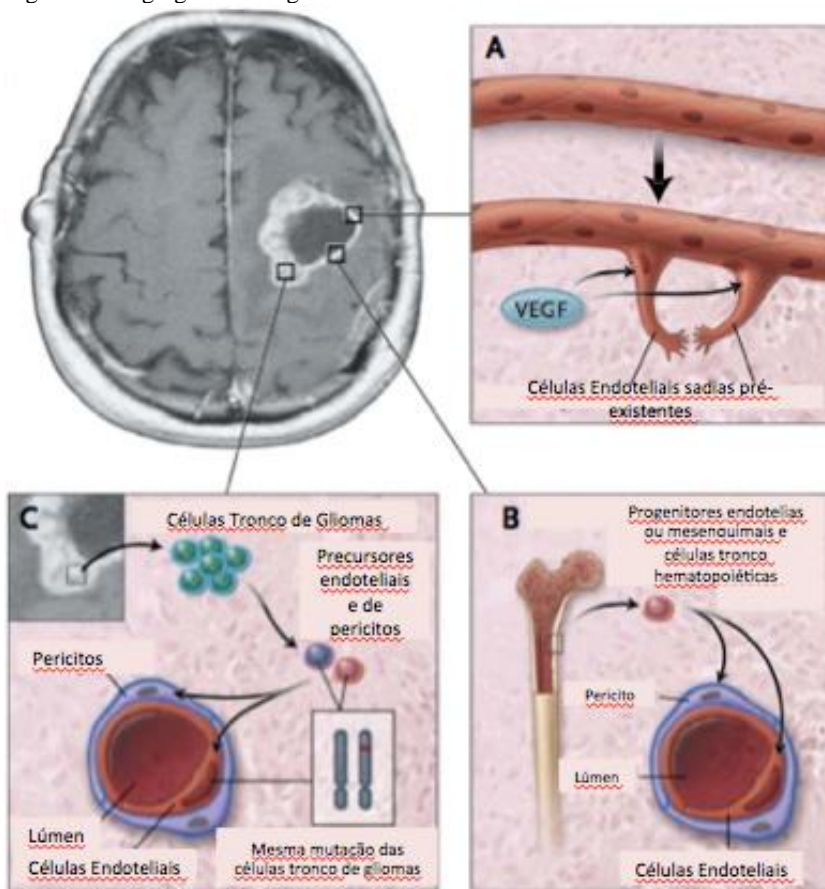
| 1. Hipóxia | 2. Degradação Proteolítica | 3. Migração das células Tip | 4. Formação dos Tubos | 5. Regulação do tamanho do vaso | 6. Vascularização do Tumor |
|---|--|--|--|---|--|
| Hipóxia induz a expressão de HIF-1 e a liberação dos fatores pró-angiogênicos, sendo o VEGF o mais importante | Hipóxia regula também a expressão de proteases levando a degradação da membrana basal e o deslocamento do pericito | Células endoteliais especializadas- Células Tip, migram em conjunto com o gradiente dos fatores angiogênicos | Células endoteliais se diferenciam e formam o molde do novo vaso | VEGF estimula a secreção do DLL4 que se liga aos receptores Notch-1, que diminui a expressão do VEGFR | PDGF estimula a ligação do pericito e reduz a proliferação. O fornecimento sanguíneo induz crescimento tumoral |

Fonte: adaptado do Guia de pesquisa sobre Pesquisa do Câncer (TOCRIS, 2016).

Algumas vias tem sido descritas na formação de novos vasos sanguíneos em GBM. Uma dessas vias envolve a liberação do VEGF pelas células hipóxicas tumorais, especialmente as do núcleo necrótico, que estimulam a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células sadias do endotélio pré-existente, para que através desse processo as células que se encontram no núcleo tumoral possam ter acesso a nutrientes e oxigênio. Este processo pode incitar também a proliferação de células endoteliais vasculares, células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea ou através de células mesenquimatosas e células tronco hematopoiéticas. Conjuntamente, ocorre a nova formação dos vasos sanguíneos através do recrutamento da circulação sistêmica para os tumores. Trabalhos recentes mostram que as células tronco de glioma contribuem para a formação de vasos sanguíneos do tumor por se diferenciarem em células endoteliais ou em pericitos (SODA et al., 2011; CHENG et al., 2013; DAS; MARSDEN, 2013) (Figura 5).

Em relação à característica da vascularização do GBM, os vasos recém desenvolvidos são morfologicamente semelhantes aos glomérulos renais e suas células endoteliais são fenotipicamente diferentes das células endoteliais normais, hiperplásticas e heterogêneas em tamanho e forma. Múltiplos corpos de Weibel-Palade, normalmente ausentes nas células endoteliais do cérebro, podem ser encontrados nas células dos vasos recém formados. A superfície destes vasos é coberta com uma camada descontínua de pericitos, sem qualquer contato com os processos de astrócitos (ROJANI; DOROVINI-ZIS, 1996).

Figura 5 - Angiogênese em glioblastoma



Fonte: adaptado de Das e Mardsen (2013).

Uma interessante abordagem para o tratamento do GBM seria a utilização de drogas com ação anti-angiogênica, inibindo, desta forma, a distribuição de nutrientes no tumor e, conseqüentemente, impedindo o crescimento, sobrevivência e acarretando a morte destas células através da indução de apoptose.

1.5 APOPTOSE

Cada vez mais pesquisas vem focando na compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais os gliomas se tornam resistentes a tratamento atuais, para assim, desenvolver estratégias terapêuticas inovadoras e mais eficazes. Uma série de evidências sugere que as alterações nas vias apoptóticas nos gliomas são modificações importantes da gliomagenese e ocasionam uma resposta ruim às terapias. Várias vias que são conhecidas por estarem implicadas na gliomagenese funcionam, pelo menos em parte, pela inibição da apoptose (ZIEGLER et al., 2008).

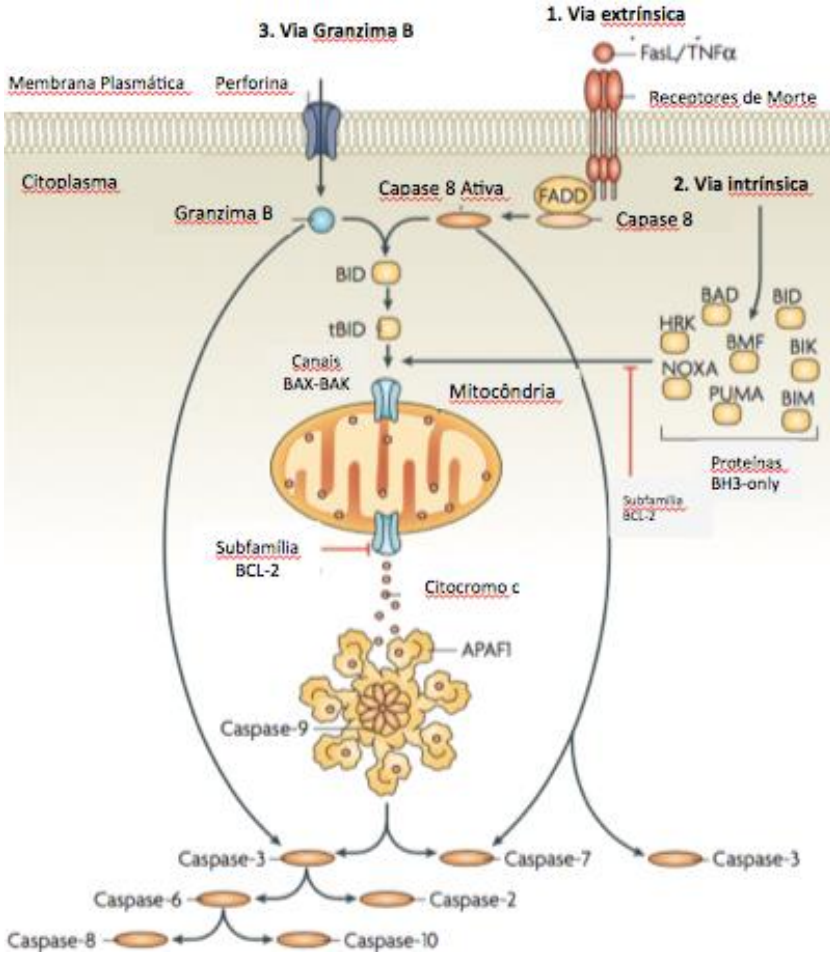
A apoptose é uma via estreitamente regulada, multipasso, responsável pela morte celular não só durante o desenvolvimento, mas também em vários processos de organismos multicelulares adultos. Esse mecanismo celular é tipicamente caracterizado pelo encolhimento celular, condensação de cromatina, fragmentação nuclear e celular, culminando na formação de corpos apoptóticos que serão englobados por células fagocíticas vizinhas (COTTER, 2009).

A apoptose pode ocorrer através de três vias alternativas: via extrínseca, via intrínseca e via da Granzima B. A via extrínseca inicia-se pela ativação das caspases (*cysteine aspartyl-specific proteases*) envolvendo a ligação de ligantes extracelulares de morte (por exemplo, FasL ou Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α)) a um receptor transmembrana de morte, culminando na ativação de caspases que promovem a proteólise do substrato e a morte celular (CREAGH et al., 2003).

Na via intrínseca, diversos estímulos que provocam o estresse ou dano celular, ativam um ou mais membros da família BH3 (*BCL2 homologous 3*), permitindo a montagem dos oligômeros BAK (*BCL2 Antagonist/Killer*), BAX (*BCL2-associated X protein*) nas membranas externas mitocondriais. Estes oligômeros permitem o efluxo de proteínas (como o citocromo C) do espaço intermembranar da mitocôndria para o citosol, promovendo a montagem do apoptossomo. Em seguida, ocorre a ativação da Caspase-9, resultando em uma cascata proteolítica (CREAGH et al., 2003; TAYLOR et al., 2008).

A terceira via ativadora da apoptose, via dependente de granzima B, inicia-se com a entrada desta protease na célula alvo através de grânulos especializados que são secretados pelos linfócitos T citotóxicos (CTL) e células assassinas naturais (NK). A granzima B, semelhante às caspases, também cliva os seus substratos e pode também ativar a BID (*BH3-interacting domain death agonist*), caspases-3 e 7 para iniciar a apoptose (BROWNE et al., 2000) (Figura 6).

Figura 6 - Representação das três vias ativadoras de apoptose



Fonte: adaptado de Taylor e colaboradores (2008).

Um corpo humano adulto gera cerca de milhares de células por dia, e, como consequência, um número igual de células deve morrer por apoptose para manter a homeostase tecidual. Portanto, a desregulação da apoptose pode eventualmente conduzir a um acúmulo de células vivas defeituosas ou senis, induzindo a formação e/ou expansão de uma neoplasia (COTTER, 2009).

Por conseguinte, uma característica essencial para a progressão tumoral é a inibição do mecanismo de apoptose (IGNEY; KRAMMER, 2002). Considerando que a expressão de proteínas anti-apoptóticas é uma importante salvaguarda fisiológica para prevenir a destruição celular, essas proteínas desempenham um papel patológico em muitas doenças malignas (DEBATIN, 2004).

Semelhante a outros tipos de câncer, as vias essenciais que regulam a apoptose também são interrompidas em gliomas malignos, como por exemplo, os mecanismos de controle do ciclo celular regulados pela proteína p53 (STEINBACH; WELLER, 2004), alta expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) (KRAJEWSKI et al., 1997), baixa expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax) e elevados níveis de expressão de proteínas inibitórias de apoptose (IAP). Estes fatores resultam na inativação de caspases pelas células de glioma, em resposta a estímulos apoptóticos.

Em vista disso, a ativação da via da apoptose é um mecanismo chave pelo qual os fármacos citotóxicos e a radiação eliminam células tumorais. Os agentes que visam o caminho apoptótico demonstraram ter um efeito anticancerígeno em uma ampla gama de neoplasias malignas, e muitas dessas novas terapias são aprovadas nos ensaios clínicos (DEBATIN, 2004). Como tal, a atenção crescente se concentra no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que especificamente direcionam a via apoptótica em gliomas para assim melhorar as respostas ao tratamento do paciente (ZIEGLER et al., 2008).

Recentemente vários estudos averiguam a possibilidade de incluir compostos naturais como forma de tratamento antitumoral, especialmente aqueles provenientes da alimentação diária. Um desses compostos estudados, por exemplo, é a Fucoxantina.

1.6 FUCOXANTINA

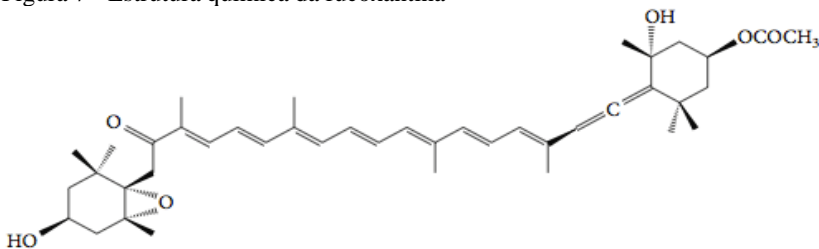
Pesquisas epidemiológicas demonstraram que a baixa incidência de câncer em determinadas regiões, pode estar relacionada ao consumo de diversos alimentos orgânicos e naturais. Muitos compostos de diferentes origens, como plantas terrestres, fontes marinhas e

microbianas, possuem diversos efeitos terapêuticos. Dentre esses três tipos de fontes destaca-se a marinha, pois a diversidade da vida marinha é mais variada do que outras duas. Fitonutrientes, que incluem os pigmentos carotenóides amarelos, laranjas e vermelhos estão sendo recentemente investigados. Estudos demonstram que a ingestão desses tipos de carotenóides dietéticos, especialmente provenientes de frutas e vegetais, está correlacionado a um risco reduzido de câncer (POTTER, 1997; WARGOVICH, 1997; EASTWOOD, 1999; TANAKA et al., 2012).

A Fucoxantina (Fx) é um carotenóide encontrado em macro (faeófitas) e micro algas (e.g., *bacillariofitas*, *bolidofitas*, *crisofitas*, *silicoflagellados*, *pinguiofitas*) (PENG et al., 2011), e é um dos mais abundantes da natureza, contribuindo em cerca de 10 % da reserva total do planeta (DEMBITSKY et al., 2007). Além disso, é o principal pigmento responsável por gerar a cor característica das algas marrons (DORAZIO et al., 2012).

Esse carotenóide possui uma estrutura molecular única (Figura 7) devido a uma ligação alênica, 5,6-mono-epóxido e 9 ligações duplas conjugadas (YAN et al., 1999). A ligação alênica é característica dessa molécula, pois não está presente em mais nenhum carotenóide das algas marrons (ASAI et al., 2004).

Figura 7 - Estrutura química da fucoxantina



Fonte: adaptado de Martin et al (2015).

Vem especulando-se que uma das razões para elevada longevidade de certas populações ocidentais é devido ao consumo regular de algas marinhas, como por exemplo, as algas marrons como wakame (*Undaria pinnatifida*) e kombu (*Laminaria japonica*), principais fontes de Fx nos alimentos (SHO, 2001).

Essa molécula exerce inúmeras funções biológicas como, atividades anti-oxidantes, antidiabéticas (MAEDA et al., 2007), antimutagênicas (NISHINO et al., 2002), anti-inflamatórias (KIM et al.,

2010), antiobesidade (JEON et al., 2010) e anticancerígenas (LIU et al., 2016).

Estudos *in vitro* demonstram que a Fx induz apoptose e inibe o crescimento em várias linhagens celulares cancerígenas incluindo linhagem de leucemia promielocítica humana (PENG et al., 2011), carcinoma de cólon humano (HOSOKAWA et al., 2004), câncer de pulmão (MOREAU et al., 2006), câncer de próstata (KOTAKE-NARA et al., 2001), câncer de fígado (DAS et al., 2008), adenocarcinoma gástrico (ZHANG et al., 2015), neuroblastoma (OKUZUMI et al., 1990) e recentemente em glioblastoma (LIU et al., 2016).

Além disso, a Fx é encontrada em diversos alimentos e ao ser digerida é convertida em Fucoxantol (Fxl), que também exerce efeito supressor sobre as células cancerígenas ainda mais eficiente do que Fx, *in vivo* (MARTIN, 2015).

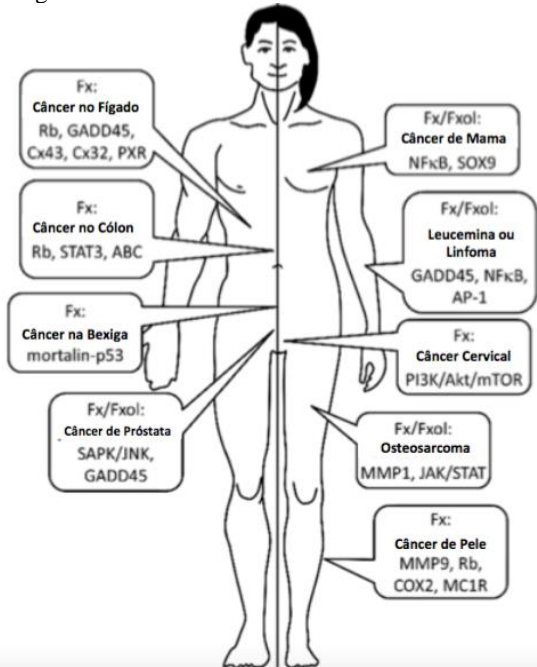
Os efeitos anticancerígenos de Fx e Fxl são mediados através de vários mecanismos, incluindo a inibição da proliferação, migração e invasão celular, indução de apoptose, e bloqueio do ciclo celular (Figura 8). No entanto, as concentrações eficazes diferem entre os tumores, e os mecanismos moleculares detalhados permanecem por ser elucidados (MARTIN, 2015).

Porém, esse efeito citotóxico é apenas restrito para as células tumorais. Pesquisadores japoneses realizaram estudos de toxicidade utilizando dosagens únicas e repetidas de Fx para avaliar a segurança desse carotenóide *in vivo*, e em ambos os estudos a Fx não acarretou nenhuma anormalidade ou fatalidade, e a aparência física dos ratos permaneceu inalterada (BEPPU et al., 2009).

Desse modo, a Fx seria uma excelente forma alternativa de tratamento para o GBM. Além de ser um composto natural, Fx não apresenta ação citotóxica frente a células saudáveis e está presente na dieta de populações onde há baixa incidência de GBM. Outra característica importante da Fx, é que a BHC é permeável esse composto (XIANG et al., 2017). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas celulares de GBM tratados com Fx.

Ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia são os tratamentos convencionais utilizados para o tratamento de gliomas. Na maioria das vezes esses compostos são utilizados com intuito de diminuir os níveis de mortalidade ocasionados por esse tipo de doença. No entanto, a utilização somente desses tratamentos não tem diminuído significativamente os níveis de recorrência e/ou morbidade acarretados por essa patologia, no qual a sobrevida dos pacientes diagnosticados é por volta de 12 a 15 meses devido à sua alta malignidade.

Figura 8 - Efeitos anticancerígenos de Fucoxantina (Fx) e Fucoxantol (FxoI) de acordo com diferentes tipos de câncer e as vias moleculares mais importantes envolvidas nas suas ações. A eficiência Fx/FxoI contra qualquer tipo de câncer foi igual em ambos os sexos.



Fonte: adaptado de Martin (2015)

Assim, é essencial buscar tratamentos alternativos, mais eficazes e menos agressivos que possam impedir o desenvolvimento desses tumores. A utilização de compostos naturais, provenientes da alimentação, como por exemplo, a Fucoxantina, é uma estratégia promissora, sendo esse composto relacionado a atividade antitumoral que por sua vez está presente na alimentação diária de regiões onde há baixa taxa incidência de gliomas.

Até o presente estudo há apenas um trabalho disponível na literatura demonstrando atividade antitumoral de Fucoxantina em gliomas, embora este efeito tenha sido observado em outros tipos de tumores. Logo, são necessários mais trabalhos que abordem e destrinchem o potencial anti-tumorogênico da Fucoxantina em gliomas, portanto tornando esse trabalho justificado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos antitumorais e citotóxicos da Fucoxantina (Fx) em células de glioblastoma humano (GBM1).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade das células de glioblastoma humano (GBM1) e de astrócitos murinos após o tratamento com Fx;
- Analisar o efeito da Fx na proliferação das células GBM1;
- Analisar o potencial clonogênico e proliferativo das células GBM1 após o tratamento com Fx;
- Determinar a migração das células GBM1 após o tratamento com Fx;
- Analisar a invasão em Matrigel® das células GBM1 após o tratamento com Fx;
- Verificar o efeito pró-apoptótico induzido pela Fx em células GBM1;
- Analisar alterações na morfologia, na ultraestrutura e na superfície das células GBM1 após exposição a Fx;
- Quantificar os níveis de espécies reativas de oxigênio em células GBM1 após tratamento com Fx;
- Medir o potencial de membrana mitocondrial e os níveis de ATP das células GBM1 após tratamento com Fx;
- Avaliar o potencial anti-angiogênico in vitro e ex vivo do tratamento com Fx em GBM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA PRIMÁRIA DE GLIOBLASTOMA HUMANO.

A amostra de glioblastoma multiforme (GBM1) foi obtida através de ressecção cirúrgica realizada em paciente do hospital Celso Ramos, em Florianópolis, Santa Catarina. A amostra coletada por cirurgiões foi colocada em tubos cônicos de 15ml contendo DMEM-F12 e 10% de soro bovino fetal (SBF) e transportada para a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para posterior processamento. Uma vez em fluxo laminar, o fragmento de tumor foi dissecado com remoção das meninges cerebrais e vasos sanguíneos. O tecido foi dissociado mecanicamente com tripsina e auxílio de uma pipeta Pasteur. Então as células foram lavadas com salina tamponada por fosfato (PBS) e plaqueadas em garrafas de cultura de 25cm², contendo DMEM-F12 acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e penicilina/estreptomicina (1U/1µg) e suplementado com 10% de SBF. As células foram mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Todos os procedimentos e formulários de autorização para obtenção das amostras foram aprovados pelo comitê de ética de pesquisa com seres humanos da UFSC (CEPSH – 108.286).

3.2 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS DE RATOS

Como descrito por Mendes-de-Aguiar e colaboradores (2008), após a decapitação dos ratos Wistar neonatos (0-3 dias) o córtex foi removido e foram retiradas as meninges. O tecido foi dissociado em salina tamponada por fosfato (PBS) suplementada com glicose (0,6%), centrifugado e plaqueado em placas de 24 poços (3,5 x 10⁵ células/poço) em DMEM- F12 10% SBF. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. As análises bioquímicas foram realizadas cerca de 10 dias após o início das culturas, que foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO₂.

3.3 CULTURA DAS LINHAGENS CELULARES

A linhagem de células de glioblastoma humano A172 e murina C6 foram cultivadas em DMEM F-12 acrescido de glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (0,06%), penicilina/estreptomicina e suplementadas com 10% de SBF.

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) foram gentilmente fornecidas pela Prof^a Dr^aTânia Beatriz Creczynski Pasa, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS/UFSC. As HUVECs foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SBF.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² a 37°C numa atmosfera humidificada a 5% de CO₂. Quando 80% da confluência celular foi alcançada, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 e 96 poços (1 x 10⁴ células/poço) para os experimentos.

3.4 FUCOXANTINA

A fucoxantina foi gentilmente cedida pelo Prof. Marcelo Maraschin e a Me. Cláudia Marlene Bauer, do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC.

Para realização da extração da fucoxantina primeiramente as biomassas da espécie *P. tricornutum*, gentilmente fornecidas pelo Prof. Roberto Bianchini Derner e Dr. Rafael Garcia Lopes, foram dissolvidas utilizando solvente orgânico (MeOH). Após, os extratos metanólicos foram filtrados em suporte de celulose, sob vácuo e foram purificados conforme Bauer (2016). Ao final das etapas de purificação foi obtido um extrato com grau de pureza de 97%.

3.5 VIABILIDADE CELULAR

A avaliação do potencial citotóxico da Fx e a sua capacidade em alterar a viabilidade em células de GBM e células sadias (astrócitos murinos), foi realizada através do ensaio da redução do MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazol brometo). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido a um formazana púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Jacobsson, 1999).

Para realização desse ensaio, as células tumorais GBM1, A172, C6 e os astrócitos murinos foram semeados em placas de 96 poços (1 x 10⁵ células/poço), e após a confluência (80%) foi realizado o tratamento com diferentes concentrações de Fx (10, 40, 70, 100 e 150µM) por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio de cultura foi removido e as células incubadas com MTT (0,2mg/ml em PBS) por duas horas a 37°C. Após o tempo de incubação, o MTT foi removido e os cristais de

formazana reduzidos foram solubilizados pela adição de dimetil-sufóxido (DMSO). Após esse procedimento foram escolhidas as concentrações ideais para dar a continuidade ao estudo. A viabilidade celular foi proporcional à leitura da absorbância, obtida em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) em comprimento de onda de 550nm.

3.6 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para analisar o efeito de Fx na proliferação de GBM1 foi realizado o teste imunocitoquímico de proliferação celular, Ki-67. Ki-67 é uma proteína nuclear que serve como marcador de proliferação pois está presente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular.

Para realização do experimento, primeiramente as células foram cultivadas em lamínulas estéreis (1×10^5 células/lamínula) e após a confluência foram tratadas com $100\mu\text{M}$ de Fx por 24 horas. Após o tempo de tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% durante 20 minutos e incubadas com anticorpo Ki-67 (Millipore) durante a noite (1:500 a 4°C). Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo secundário de IgG *anti-rabbit* conjugado com Alexa Fluor-488 à temperatura ambiente durante 60 minutos (1:500; Abcam).

Por fim, o núcleo das células GBM1 foi corado com Hoechst 33258 ($5\mu\text{g/mL}$, Sigma) durante 10 minutos. Dez campos aleatórios foram fotografados utilizando o microscópio invertido Olympus IX83, e as células foram contadas. O número de células positivas para Ki-67 foi dividido pelo número de células totais coradas por Hoechst para estabelecer a taxa de proliferação celular. Cada grupo teve três replicatas, e o experimento foi repetido três vezes de forma independente.

3.7 ANÁLISE DA CLONOGENICIDADE CELULAR

Para analisar o efeito da Fx sobre o potencial clonogênico e replicativo de uma única célula GBM1, foi realizado o ensaio de clonogenicidade (*singlecell cloning by serial dilution*). O ensaio clonogênico é um método *in vitro* bem estabelecido que visa testar a capacidade de sobrevivência e proliferatividade das células (FRANKEN et al., 2006). Para tal, as células GBM1 foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^4 células/poço), e após a confluência foram tratadas com Fx (40, 70 e $100\mu\text{M}$) por 24 horas. Posterior ao tratamento, as células

foram lavadas com PBS, tripsinizadas e contadas com auxílio da câmara de *Neubauer*. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada das células em DMEM-F12. Após a diluição, foram semeadas aproximadamente 1 célula por poço (placa de 96 poços) e as placas foram incubadas por 12 dias. Após o período de incubação, foram tiradas fotos das placas com auxílio do Microscópio Invertido Olympus IX83 e realizado o ensaio de viabilidade (MTT) para a quantificação do número de clones. O número de clones foi proporcional à leitura da absorbância, obtida em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) em comprimento de onda de 550nm.

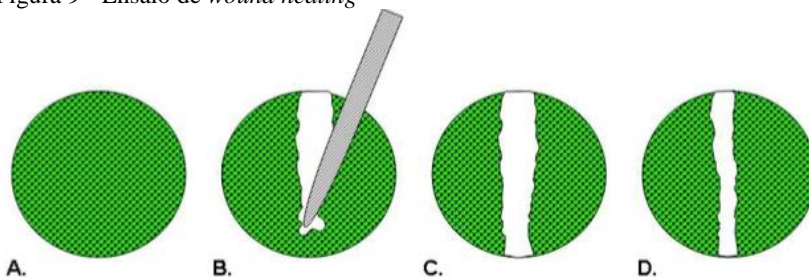
3.8 MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar o efeito da Fx na migração das células GBM1 foram utilizados dois ensaios; *scratch/woundhealing* (DECAESTECKER, 2007) e o ensaio quimiotático com Transwell®.

O primeiro ensaio baseia-se no monitoramento da migração celular na “cicatrização” de uma “lacuna/ferida” artificial (*scratch zero*), feita por uma ponteira de pipeta estéril, em uma monocamada confluyente de células (MENON et al., 2009).

Para realização do ensaio as células GBM1, foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de 2×10^5 células por poço, cultivadas a 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas em uma estufa. Após, uma ferida artificial (*scratch*) foi gerada na monocamada celular. Para realização do *scratch* foi feito um risco em linha reta, na posição vertical, no meio do poço, na monocamada de células, com auxílio de uma ponteira estéril de 200µL (Figura 9). Por conseguinte, as células foram incubadas com meio DMEM-F12, na ausência e presença da Fx em diferentes concentrações (40, 70 e 100µM) por 24 horas. Posterior ao tempo de tratamento, as células foram fixadas com PFA 4%, durante 20 minutos, coradas com laranja de acridina e observadas no Microscópio Invertido Olympus IX83. Após a fixação e coloração das células, os poços foram fotografados para quantificação (seis fotos por poço ao longo do arranjo criado). Em seguida a largura de cada foto foi medida no software ImageJ®. A medição foi feita horizontalmente do final da borda de células de um lado para o outro do risco. Para a determinação da largura inicial do *scratch*, foram utilizadas as medidas feitas nos poços do *scratch zero*, logo após a realização da ferida.

Figura 9 - Ensaio de *wound healing*

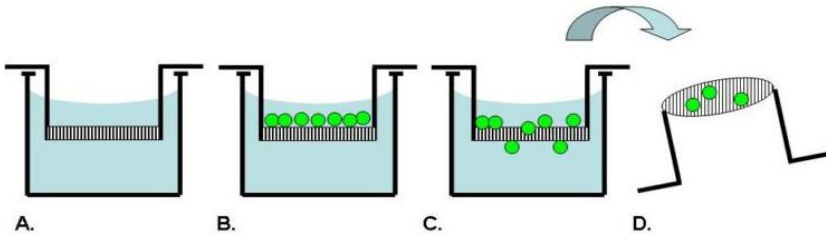


Um risco é feito em uma monocamada confluyente de células (A) com auxílio de uma ponteira (B). A área sem células é utilizada para medir a largurado risco na pré-migração 0H (C) e também para após a migração das células ao longo do risco(D).

Fonte: adaptado de Hulkover e Herber (2011).

O segundo experimento realizado para analisar o efeito da Fx na mobilidade das células GBM1 foi o ensaio quimiotático de migração Transwell®. Primeiramente, as células GBM1 foram tripsinizadas e colocadas na parte superior do Transwell®, com ou sem Fx (40,70 e 100µM) e incubadas durante 10 minutos a 37°C e 5% de CO₂, para que as células se estabeleçam no fundo do inserto. Posterior, foi colocada uma solução de DMEM-F12 mais SBF a 20% na parte inferior da placa de 24 poços, como quimioatraente (Figura 10). Após 24 horas de incubação, as células localizadas na parte superior do inserto, que não migraram, foram retiradas com auxílio de uma haste flexível de algodão, as células localizadas na parte inferior da membrana do inserto foram coradas com Hoescht (5µg/mL) durante 10 minutos e contadas num Microscópio Invertido Olympus IX83. O número de células que migrou foi contado em 10 campos selecionados aleatoriamente de cada membrana. Cada grupo teve três repetições, e o experimento foi repetido três vezes de forma independente.

Figura 10 - Esquema ensaio Transwell®



Um inserto é utilizado para estabelecer dois compartimentos em uma cavidade (A); As células são adicionadas no compartimento superior (B); e migram através da membrana (C); A migração celular é medida pela contagem do número de células na parte inferior da membrana (D).

Fonte: adaptado de Hulkover e Herber (2011).

3.9 INVASÃO CELULAR

Neste trabalho, foi avaliada a capacidade anti-invasiva da Fx em células de GBM, pelo ensaio com placas/insertos Transwell® (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), no qual foram utilizados insertos com filtros de policarbonato (tamanho do poro 8 μm), recobertos por Matrigel® (uma preparação solubilizada de membrana basal extraída do sarcoma murino *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS)), em placas de 24 poços. Inicialmente o Matrigel® foi colocado na parte superior do inserto e incubado por 1 hora para polimerizar. Após, as células GBM1 foram semeadas em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ no compartimento apical do poço Transwell®, com ou sem tratamento com Fx (40, 70 e 100 μM). No compartimento basolateral foi adicionado DMEM-F12 mais SBF 20% (quimiotaxia). As células foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO_2 . Posteriormente, as células que não invadiram foram removidas com o auxílio de um haste flexível de algodão, e as células que invadiram a membrana com Matrigel® e alcançaram a parte inferior da membrana do inserto (Cavidade 1) foram coradas com Hoescht (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 10 minutos e contadas num microscópio invertido Olympus IX83. O número de células que migrou foi contado em 10 campos selecionados aleatoriamente de cada membrana. Cada grupo teve três repetições, e o experimento foi repetido três vezes de forma independente.

3.10 ANÁLISE DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Para a detecção dos níveis de EROS intracelulares foi utilizado o componente permeável não fluorescente 2'-7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA). Esse reagente penetra na célula e é hidrolisado por esterases intracelulares em diclorofluoresceína (DCFH), que permanece no interior da célula e emite fluorescência. Após o tratamento com 100 μ M de Fx por 6, 12 e 24 horas, o DCFH-DA (10 μ M) foi adicionado, e as culturas incubadas por 30 minutos a 37°C. Decorrido o tempo, as células foram lavadas com PBS. A fluorescência foi medida em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) com excitação de comprimento de onda de 485 nm e emissão de 520nm. Peróxido de Hidrogênio foi utilizado como controle positivo para a sonda.

3.11 ANÁLISE DO EFEITO DA FUCOXANTINA NAS MITOCÔNDRIAS DAS CÉLULAS GBM1

3.11.1 Análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para análise do $\Delta\Psi_m$ foi utilizada a sonda trimetilrodamina etil éter (TMRE), a qual serve para rotular mitocôndrias ativas. TMRE é um corante vermelho-laranja e um permeante celular que facilmente se acumula nas mitocôndrias ativas. Devido à sua carga negativa, mitocôndrias despolarizadas ou inativas têm uma diminuição do seu potencial de membrana e não conseguem sequestrar TMRE. Portanto, quando as mitocôndrias são danificadas, o $\Delta\Psi_m$ diminui e consequentemente a fluorescência da sonda diminui também. Após o tratamento com 100 μ M de Fx por 24 horas, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas durante 20 minutos a 37°C, CO₂ a 5% com TMRE (50nM em PBS). Decorrido o tempo, as células foram lavadas uma vez com PBS e a fluorescência foi analisada em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) com excitação de comprimento de onda de 550nm e emissão de 590nm. Para controle da sonda foi utilizado o FCCP (*Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*), um protonóforo (H⁺ + ionóforo) e desacoplador da fosforilação oxidativa em mitocôndrias, capaz de despolarizar as membranas mitocondriais. O número de fluorescência foi dividido pelo número de células correspondente a cada grupo.

3.11.2 Quantificação dos níveis de ATP

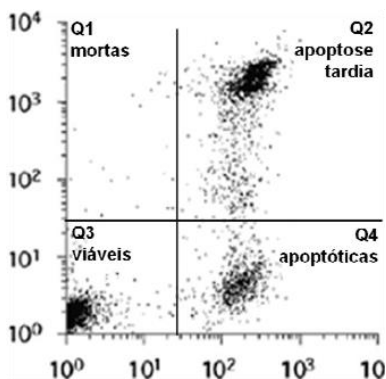
O ensaio de Viabilidade Celular Luminescente CellTiter-Glo® foi utilizado para quantificação indireta de ATP. Para realização desse ensaio, as células GBM1 foram semeadas em placas brancas de 96 poços (1×10^4 células/poço). Após a confluência, as células foram tratadas com $100 \mu\text{M}$ de Fx por 24 horas. Passado o tempo de tratamento, a placa foi retirada da incubadora e mantida à temperatura ambiente durante 30 minutos antes da realização do ensaio. Posteriormente, o reagente CellTiter-Glo® foi adicionado e a placa incubada em um agitador orbital durante 2 minutos. O sinal luminescente foi estabilizado durante 10 minutos à temperatura ambiente e a luminescência total registrada.

3.12 DETECÇÃO DE APOPTOSE E NECROSE: IODETO DE PROPÍDEO E ANEXINA

Para avaliação da ocorrência de apoptose e necrose foi utilizado o ensaio Anexina-V FITC (que se liga à fosfatidilserina externalizada) e Iodeto de Propídeo (corando células com membranas comprometidas), em citometria de fluxo.

Para isso, placas de 24 poços foram semeadas com células GBM1 na densidade $2,5 \times 10^5$ por poço, incubadas a 37°C em estufa de 5% de CO_2 por 24 horas até a confluência. Após esse período, o meio foi substituído por um novo meio sem ou com o acréscimo de $100 \mu\text{M}$ de Fx e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas. Após o período do tratamento, as células GBM1 foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS gelado, então centrifugadas novamente e ressuspensas em tampão de ligação 1x. Após, foram incubadas por 10 minutos, no escuro em temperatura ambiente, com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo e analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto II. A análise dos dados obtidos foi feita através do *Flowing Software*, de acordo com a Figura 11

Figura 11 - Gráfico de pontos obtido em citometria de fluxo após indução de apoptose e marcação das células com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo



Os quadrantes representam: Q1 – células mortas (Anexina V-, IP+); Q2 – células em estágio de apoptose tardia (Anexina V+, IP+); Q3 – células não apoptóticas ou viáveis (Anexina V-, IP-); Q4 – células em estágio iniciais de apoptose (Anexina V+, IP-).

Fonte: adaptado de Matsura e colaboradores (2002).

3.13 ANÁLISE DO EFEITO DA FUCOXANTINA NA MORFOLOGIA, SUPERFÍCIE E NA ULTRAESTRURA DAS CÉLULAS GBM

3.13.1 Análise do núcleo celular por coloração com Hoechst

Alterações morfológicas do núcleo das células GBM1 após o tratamento com Fx foram detectadas utilizando a coloração de núcleo com Hoechst33258. Inicialmente, as células foram semeadas em lamínulas estéreis durante a noite e depois tratadas com Fx em diferentes concentrações (40, 70 e 100 μ M) durante 24 horas. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas com PFA 4% durante 20 minutos. Em seguida, foram incubadas com o corante nuclear Hoechst durante 15 minutos, lavadas com PBS e montadas em lâminas. O Microscópio Invertido Olympus IX83 foi usado para capturar imagens usando um comprimento de onda de excitação de 340nm.

3.13.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para analisar e observar o efeito da Fx na morfologia e na superfície celular, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Todo o preparo das amostras foi realizado com o auxílio da Dr^a. Carmen Simioni, no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (BEG, CCB, UFSC). Primeiramente, as células GBM1 foram semeadas em lamínulas durante a noite e expostas a 100 μ M de Fx por 24 horas. Após a incubação, as células foram fixadas com PFA 4% durante 20 minutos e pós-fixadas com Tetróxido de Ósmio 1%, durante 2 horas. Posteriormente, as células foram lavadas em tampão de cacodilato 0,1 M e desidratadas em uma série graduada de acetona (30, 50, 70, 90, 100%) durante 10 minutos. Após esse processamento, as lamínulas contendo as células foram presas em cima dos *subbs* usando fita de carbono de dupla face e depois foram secadas utilizando a técnica de ponto crítico em um secador de ponto crítico (CPD-030, BAL-TEC Co.). Em seguida, as lamínulas nos *subbs* foram revestidas com ouro em um revestidor de pulverização iônica (SCD-005, BAL-TEC Co.), analisados e fotografados no microscópio de varredura JEOL JSM- 6390 LV (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, UFSC).

3.13.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para a observação de características ultraestruturais em células GBM1 após a exposição à Fx.

Todo o preparo das amostras foi realizado com o auxílio da Dr^a Carmen Simioni, no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (BEG, CCB, UFSC). Inicialmente, as células foram plaqueadas em frascos, após a confluência foram tratadas com 100 μ M de Fx durante 24 horas. Posteriormente, as células GBM1 foram fixadas com PFA 1,5% e glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2-7,4) durante 24 horas. As suspensões celulares foram então enxaguadas três vezes com tampão de cacodilato e pós-fixadas com Tetróxido de Ósmio 1% em tampão de cacodilato de sódio 1M durante 2 horas. As células foram desidratadas em uma série graduada em acetona e infiltradas com resina *Spurr*. Seções ultrafinas (80nm) foram montadas nos *grids* de cobre, secadas a temperatura ambiente, coradas com 2,0% de acetato de uranila durante 15 minutos e contrastadas com citrato de chumbo durante 15 minutos. As seções foram examinadas e as imagens foram

tiradas usando o microscópio eletrônico de transmissão JOEL JEM 2100F (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, UFSC).

3.14 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-ANGIOGÊNICO DA FUCOXANTINA

3.14.1 Ensaio de Tubulogênese

O ensaio de formação de estruturas semelhantes a tubos foi adaptado de Liao e colaboradores (2003), para investigar o efeito da Fx na angiogênese *in vitro*.

Primeiramente, uma placa de 96 poços foi coberta com 50µl de Matrigel® líquido, a qual foi colocada na estufa para solidificar e polimerizar a 37° C durante 1 hora.

As células HUVECs foram semeadas em uma densidade de 2,5 x 10⁵ células por poço, em 50µl de meio de cultura RPMI e mantidas duas horas a 37°C. Após, 100µl de meio condicionado das células tratadas ou não com 100µM de Fx por 24 horas, foram adicionados no poço. As placas foram incubadas a 37°C com umidade e ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, durante 16 horas, para que haja a formação de uma rede intacta no grupo controle.

A análise foi feita através da contagem das redes vasculares de tubos semelhantes a vasos usando um microscópio de luz invertido. Os poços das placas de cultura foram fotografados e o número de redes fechadas, formadas por estruturas semelhantes a tubos em cada cavidade, foi determinado (média de três diferentes campos contados em cada poço). Os dados são expressos como o percentual do número de tubos nos grupos tratados em relação aos não tratados (controle).

3.14.2 Ensaio de migração quimiotática

Para analisar a ação anti-angiogênica da Fx nas células tumorais GBM1 foi utilizado um ensaio de migração quimiotática. Para este ensaio, se utiliza uma câmara de Transwell® com poros de 8µm.

Um dia antes do experimento foi retirado o SBF das células HUVECs e mantido somente o meio RPMI. No dia seguinte as células foram tripsinizadas e suspensas em meio RPMI a uma densidade de 1 x 10⁶ células/ml, e colocadas na câmara superior do Transwell®. A câmara inferior foi preenchida com o meio sobrenadante condicionado, de células GBM1, tratadas com 100µM de Fx ou de células GBM1 não tratadas. Após 24 horas, as células que não migraram foram removidas

com o auxílio de uma haste flexível de algodão. Já as células que estavam localizadas na parte inferior da membrana foram fixadas com PFA 4% e coradas com Hoescht por 15 minutos e então observadas no microscópio invertido de fluorescência.

A análise foi feita através da contagem das células HUVECs que migraram para a cavidade inferior usando um microscópio de fluorescência invertido. A cavidade de baixo do Transwell® foi fotografada (média de três diferentes campos contados em cada poço). Os dados foram expressos como o percentual do número de células que migraram nos grupos tratados em relação aos não tratados (controle).

3.14.3 Ensaio de angiogênese *ex ovo* por membrana vitelínica de codorna

Utilizamos o ensaio de membrana vitelínica para avaliar a atividade antiangiogênica *in vivo* da Fucoxantina em células GBM. Este ensaio baseou-se no desenvolvimento do sistema vascular na membrana vitelínica. Todo o ensaio foi realizado no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (BEG, CCB, UFSC), com o auxílio do Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez e o mestrando Gabriel da Silva Pescador. Primeiramente, os ovos de codornas fertilizados (*Coturnix coturnix japonica*) foram incubados a 38°C em uma incubadora humidificada de ovos durante 2 dias. Após o tempo de incubação, as cascas dos ovos foram abertas e os embriões retirados, e transferidos para uma placa de 12 poços, permitindo assim, que os vasos sanguíneos da membrana vitelínica permanecessem voltados para cima. Em seguida, o papel filtro embebido com o meio condicionado das células GBM1 tratadas com 100µM de Fx ou não (controle) foi colocado em cima da membrana vitelínica do embrião, mais precisamente próximo à veia principal direita. Após, as placas foram colocadas numa incubadora humidificada padrão de cultura de células durante 24 horas, a 37°C. Posterior ao tempo de incubação, os embriões e os capilares posicionados abaixo do papel filtro foram fotografados com um estereomicroscópio M165FC (Leica). Para a avaliação do efeito antiangiogênico foram contados os vasos presentes embaixo do papel filtro e dividido pela área do papel. Também foram quantificados os vasos que divergiam ao redor do papel filtro.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste t ou de Newman-Keuls, conforme o caso. Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 4.0 e valores com $p < 0,05$ considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1 FUCOXANTINA DIMINUI A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA.

Com o intuito de verificar a citotoxicidade do carotenóide Fx em células GBM1, foi realizada uma curva de concentração (10 a 150 μ M) de Fx por 24 horas através do ensaio de MTT (Figura 12).

Em relação ao gráfico (Figura 12A) pode-se observar que a Fx apresentou atividade citotóxica em concentrações acima de 70 μ M no período de 24 horas, nas linhagens celulares de glioblastoma humano (GBM1, A172) e de glioma de rato (C6).

O tratamento com 100 μ M de Fx acarretou em diminuição de cerca de 50% da viabilidade de todas as linhagens tumorais; GBM1 (65,97%); A172 (42,28%) e C6 (50,23%). No entanto, a concentração de 10 μ M de Fx ocasionou aumento da viabilidade nas linhagens GBM1 (32%) e A172 (12%).

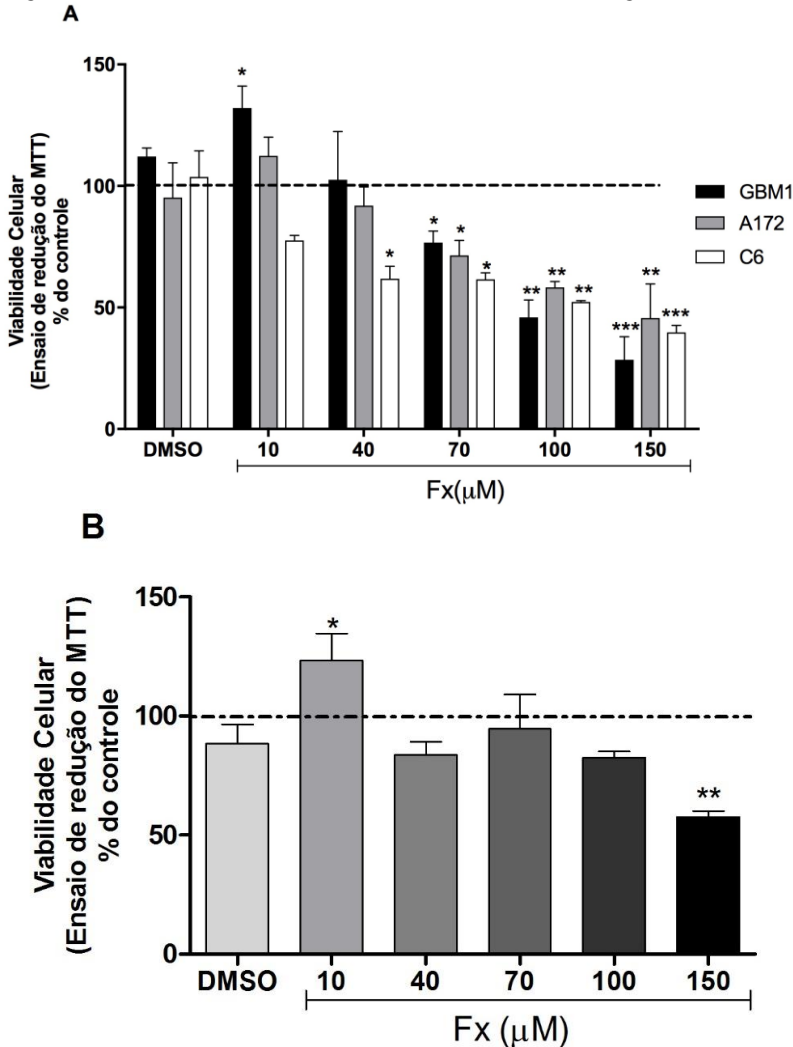
Posteriormente, examinamos a ação citotóxica da Fx em células saudáveis, utilizando a cultura primária de astrócitos murinos (Figura 12B). Os resultados revelaram que o tratamento com 10 μ M de Fx aumentou significativamente a viabilidade (23%) dos astrócitos. Porém, no grupo de astrócitos tratados com 150 μ M de Fx ocorreu diminuição significativa de 40% da viabilidade celular comparando ao grupo controle. O grupo DMSO (veículo) não alterou a viabilidade em nenhuma das linhagens testadas.

Com intuito de reforçar os resultados acima, após o tratamento com Fx (70, 100 e 150 μ M) por 24 horas, os astrócitos murinos e as células GBM1 foram coradas com Hoechst e contadas (Figura 13).

De acordo com os resultados obtidos, constatamos que o número de células GBM1, quando tratadas com 100 e 150 μ M de Fx, diminuiu em relação ao grupo controle (Figura 13A). Em relação aos astrócitos murinos, ocorreu diminuição do número de células apenas no grupo tratado com 150 μ M de Fx. Fx (40 e 70 μ M) não promoveu diminuição significativa na viabilidade de astrócitos murinos (Figura 13B).

Esses dados indicam que concentrações menores que 100 μ M de Fx foram exclusivamente citotóxicas em células de glioblastoma, não prejudicando células saudáveis. Sendo assim, para os experimentos subsequentes, apenas a cultura primária de GBM1 e as concentrações de 40, 70 e 100 μ M de Fx foram testadas, excluindo a concentração de 150 μ M, a qual também foi tóxica para células saudáveis.

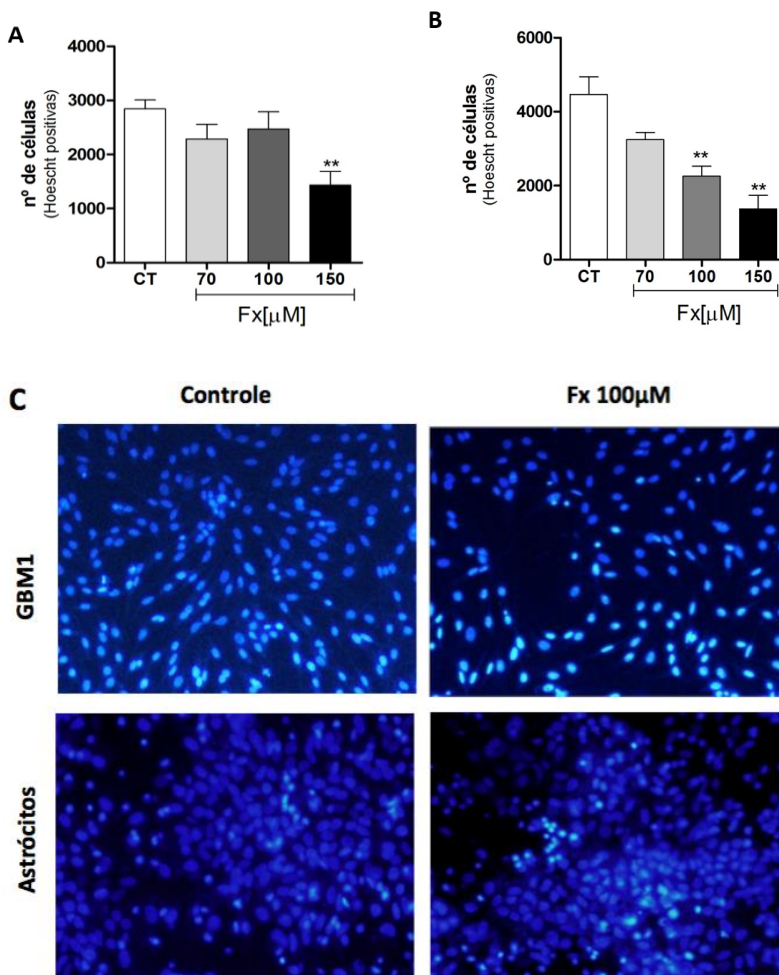
Figura 12 - Fucoxantina diminui a viabilidade das células de glioblastoma



(A) As células GBM1, A172, C6 e (B) astrócitos murinos, após atingirem confluência, foram tratadas com diferentes concentrações de Fx (10 a 150 μM) e após 24 horas foi realizado o ensaio de MTT. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período do tratamento. Dados foram expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. ***p < 0,001; *p < 0,05 representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

Figura 13 - Tratamento com Fucoxantina diminui o número de células GBM1



A) Os astrócitos (B) e as células GBM-1, após atingirem confluência, foram tratados com diferentes concentrações de Fx (70 a 150 μ M) e após 24 horas foram coradas com Hoechst. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período do tratamento. (C) Imagem representativa das células tratadas e não tratadas coradas com Hoescht. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

5.2 FUCOXANTINA INIBE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Para investigar o envolvimento e a ação da Fx na proliferação e progressão tumoral das células de GBM, foi realizado o teste de proliferação celular Ki-67 (Figura 14).

Através deste ensaio avaliamos que o tratamento com 100 μ M de Fx diminui o número de células GBM1 positivas para Ki-67 (45,02%), quando comparado ao grupo controle. Isso indica que Fx promove redução significativa na marcação de células em proliferação (Figura 14A).

A Figura 14B mostra imagens representativas da coloração de células positivas Ki-67 (verde) e positivas para Hoechst (azul) nas células tratadas com Fx e nas células controle.

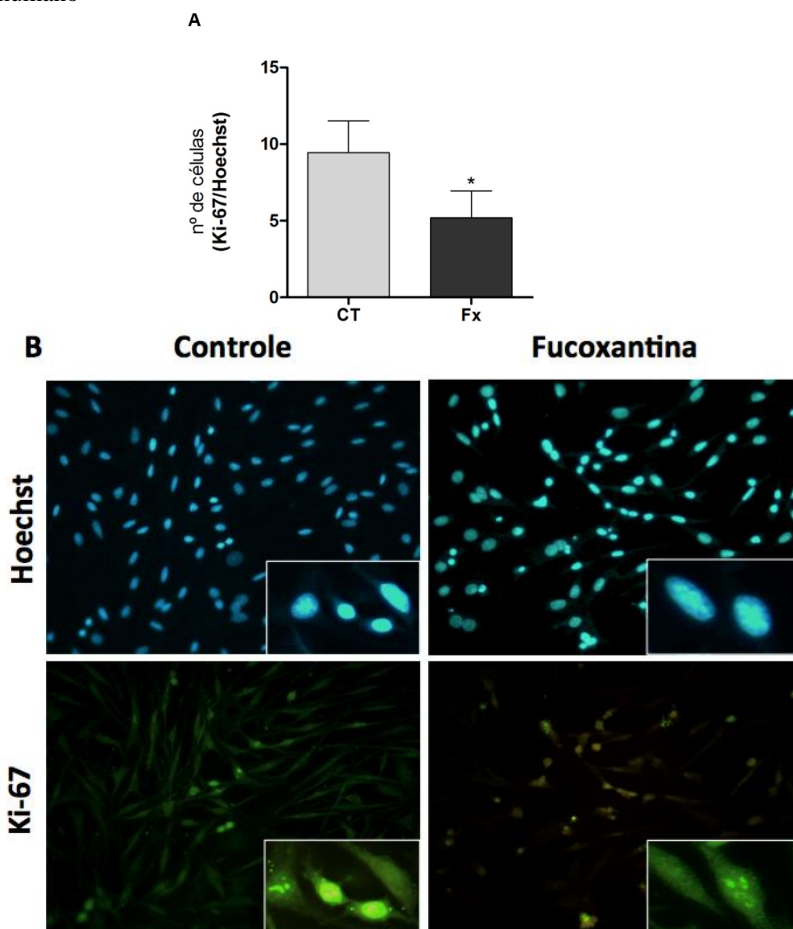
5.3 FUCOXANTINA DIMINUIU O POTENCIAL CLONOGÊNICO DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Para complementar a análise na proliferação das células GBM1, após o tratamento com Fx foi avaliado também o potencial clonogênico e replicativo de uma única célula através do ensaio clonogênico.

Ao analisar os resultados (Figura 15A), constatamos que os grupos 70 e 100 μ M de Fx corresponderam aos menores valores de absorbância em relação ao grupo controle. Isto significa que o número de clones no final do décimo segundo dia foi menor nos grupos expostos à Fx do que no grupo controle.

Portanto, o tratamento com Fx diminui o potencial replicativo e clonogênico das células GBM1.

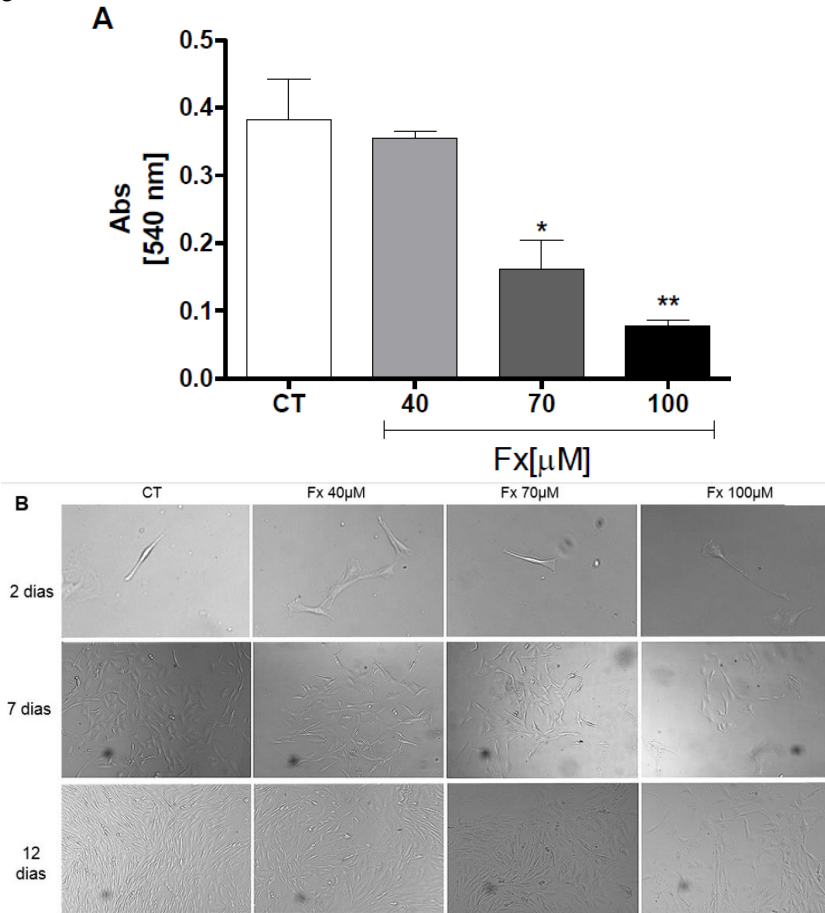
Figura 14 - Fucoxantina inibe a proliferação das células de glioblastoma humano



(A) As células GBM1 foram semeadas em lamínulas ao atingirem confluência foram tratadas com 100 μ M Fx e após 24 horas e foi realizado o ensaio de proliferação Ki-67. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período do tratamento. (B) Imagem representativa de células positivas Ki-67 (verde) e positivas para Hoescht (azul) nas células tratadas com Fx e nas células controle. O número de células positivas para Ki-67 foi dividido pelo número total de células correspondentes a cada grupo. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle. (ANOVA de uma via seguida pelo teste t-student)

Fonte: elaboração da autora (2017).

Figura 15 -Fucoxantina diminui o potencial clonogênico das células de glioblastoma humano



As células GBM1 foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com 100uM por 24 horas, após foi realizado o ensaio clonogênico. (A) Após o período de incubação (12 dias) foi realizado o ensaio de MTTO controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período do tratamento. (B) Imagem representativa das células GBM1 nos dias 2, 7 e 14 do tempo de incubação. O número de células positivas para Ki-67 foi dividido pelo número total de células correspondentes a cada grupo. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

5.4 FUCOXANTINA DIMINUIU A MIGRAÇÃO CELULAR EM GLIOBLASTOMA HUMANO

Para avaliar o efeito da Fx na migração das células de GBM, realizamos os ensaios de *Transwell* e *Wound Healing* (cicatrização de feridas).

Através do teste de *Wound Healing* (Figura 16A), observamos que as células GBM1 tratadas com 40 μ M de Fx migraram mais lentamente da borda do *scratch* em direção ao centro, em comparação às células controle. Porém, essa concentração não impediu totalmente a migração das células GBM1.

No entanto, o tratamento com Fx (70 e 100 μ M) impediu a migração das células GBM1 em 24 horas pois, o comprimento do *scratch* em 24 horas foi o mesmo comparado ao tempo 0.

A Figura 16 B mostra imagens representativas do *scratch* nos tempos 0 e 24 horas nas concentrações de 40,70 e 100 μ M de Fx. Para melhor visualização, as células GBM1 foram coradas com laranja de acedina.

Resultados semelhantes foram obtidos a partir do ensaio de migração *Transwell*® (Figura 16C). As células GBM1 tratadas com as diferentes concentrações de Fx (40, 70 e 100 μ M) migraram menos em comparação ao grupo controle. No grupo tratado com 100 μ M de Fx, o número de células que migrou através do inserto foi 70% menor, quando comparado ao grupo controle. A Figura 16D mostra imagens representativas da coloração de células positivas para Hoechst nas células tratadas e não tratadas que migraram através do *Transwell*®, indicando que a Fucoxantina impede a migração das células de GBM.

Figura 16 - Fucoxantina diminuiu a migração celular em glioblastoma humano
(continua)

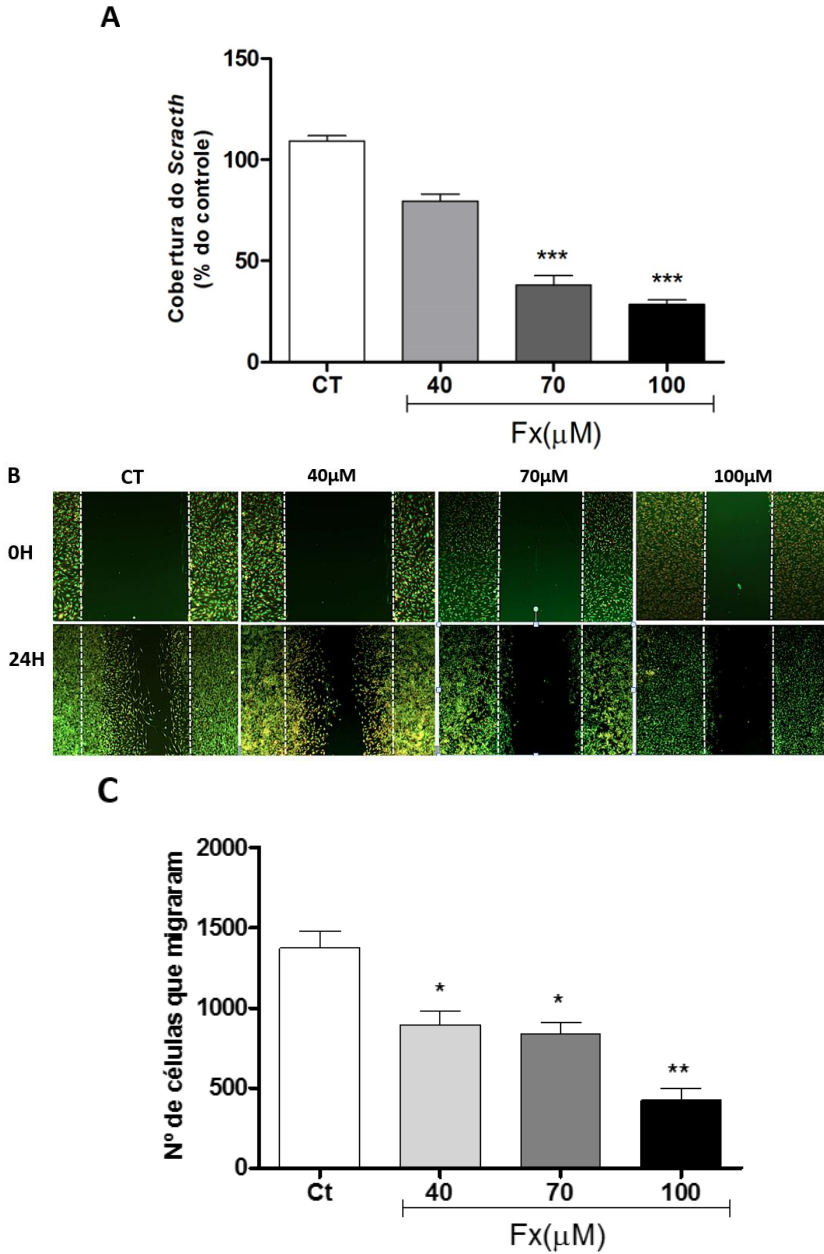
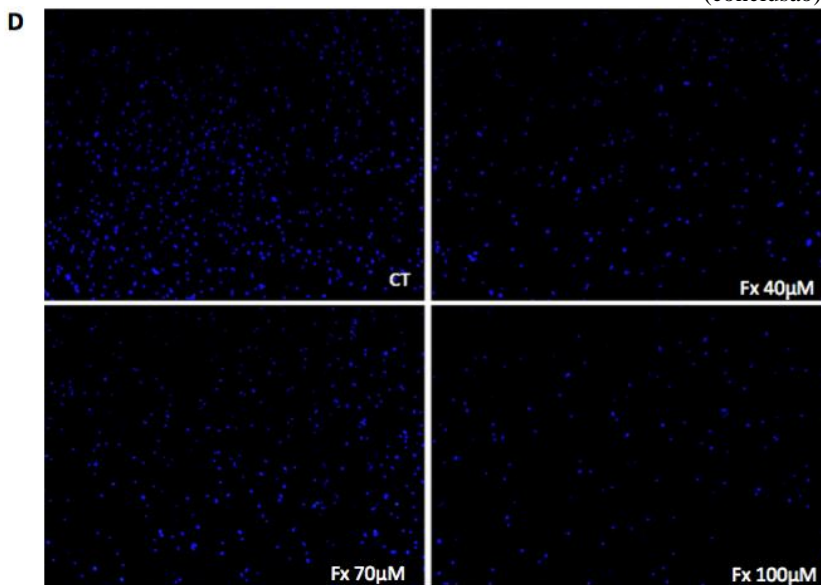


Figura 16 - Fucoxantina diminuiu a migração celular em glioblastoma humano (conclusão)



(A) Após a confluência as células de GBM1 em placas de 24 poços, um risco foi feito com uma ponteira de 200µl e as células foram tratadas com Fx 40,70 e 100µM por um período de 24 horas (B) Imagem representativa do *scratch* nos tempos 0h e 24h; as células foram coradas com o corante laranja de acridina. (C) Células GBM1 foram colocadas sobre o Transwell® e tratadas com Fx 40,70 e 100µM por 24h (D) Imagem representativa das células coradas com Ho que atravessaram o inserto. O grupo controle foi incubado com meio de cultura pelo mesmo período. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

5.5 FUCOXANTINA DIMINUI A INVASÃO DE CÉLULAS GBM1

Para determinar o potencial anti-invasivo da Fx em células de GBM, foi realizado o ensaio de invasão usando *Transwell*® revestido com *Matrigel*® (Figura 17).

Através deste experimento observamos que o tratamento com Fx por 24 horas, diminuiu notavelmente o potencial invasivo das células GBM1 no *Matrigel*®.

O número de células GBM1 que invadiram o matrigel quando expostas a Fx 40, 70 e 100 μ M foi de, respectivamente, 84,8%, 87,2% e 90,3%, menor em comparação ao grupo controle (Figura 17A).

A Figura 17B mostra imagens representativas da coloração de células positivas de Hoechst nas células tratadas e não tratadas, que migraram através do *Transwell*® revestido com *Matrigel*®.

Esses resultados indicam que Fx afetou significativamente a mobilidade e a invasão de células GBM1.

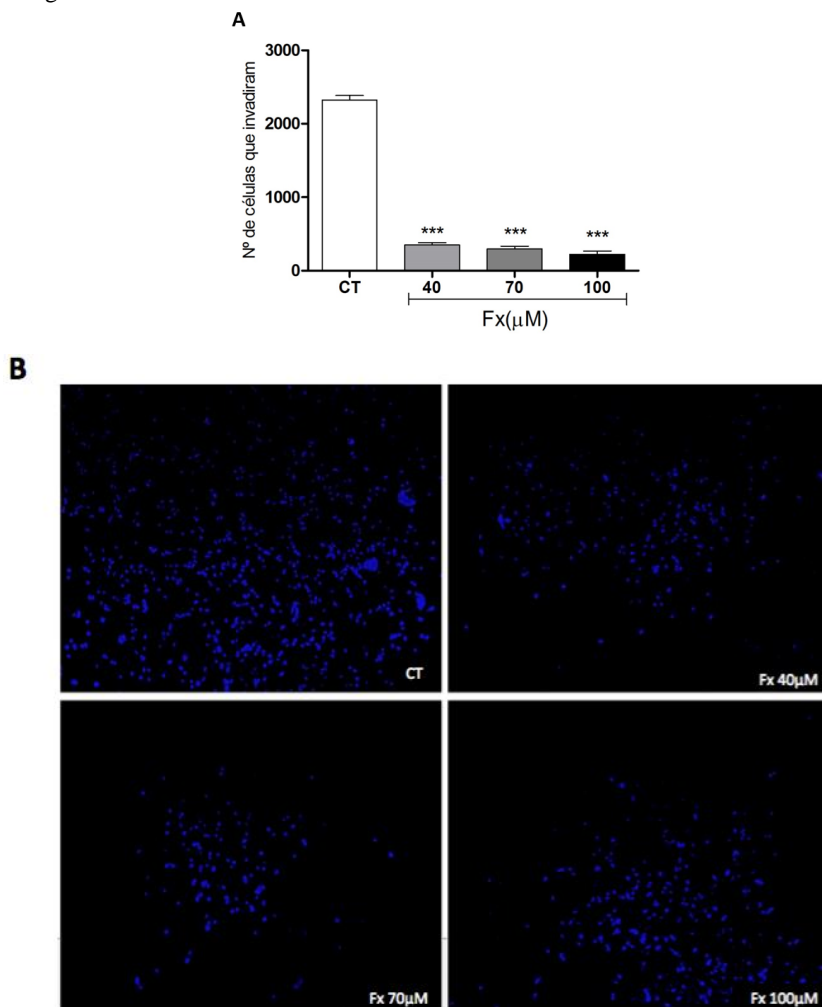
5.6 FUCOXANTINA INDUZ APOPTOSE EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO.

Para avaliar se o efeito citotóxico da Fx nas células de GBM estava relacionado à indução de morte celular apoptótica ou necrótica, as células GBM1 foram expostas a 100 μ M de Fx por 24 horas e depois examinadas por citometria de fluxo usando Anexina V-FITC e iodeto de propídeo.

Conforme mostrado na Figura 18A, o tratamento com Fx aumentou significativamente o número de células apoptóticas. A porcentagem de células que sofreram apoptose (precoce ou tardia) após o tratamento com 100 μ M de Fx foi 46,5% superior em comparação ao grupo controle. No entanto, a Fx não aumentou os níveis de incorporação de I.P., ou seja, de necrose, nas células GBM1 comparado ao controle.

Esses dados indicam que a Fx é capaz de induzir apenas apoptose em células de glioblastoma e não necrose, o que é desejável para uma substância antitumoral.

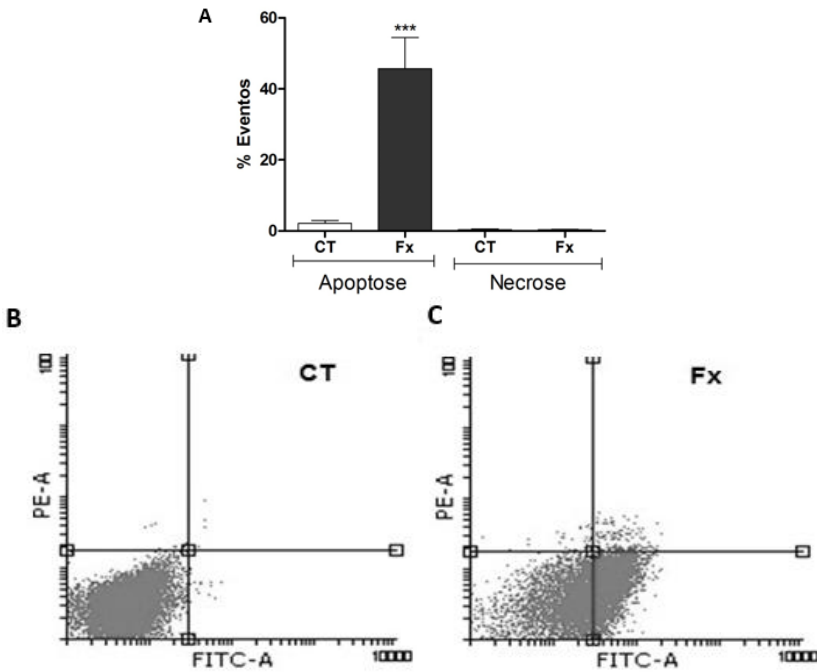
Figura 17 - Fucoxantina diminui a invasão de células GBM1



(A) Células GBM1 foram semeadas sobre o Transwell@coberto por Matrigel@e tratadas com Fx 40, 70 e 100 μM por 24h (B) Imagem representativa das células coradas com Hoescht que invadiram o Matrigel@ e se localizavam na parte de baixo do inserto. O grupo controle foi incubado com meio de cultura pelo mesmo período. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

Figura 18 - Fucoxantina induz apoptose em células de glioblastoma humano



(A) As células GBM1 foram semeadas em placas de 24 poços; após confluência foram tratadas com 100 μ M de Fx; decorrido o tempo de 24 horas, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo. (B) Imagem dos *Dot Plots* obtidos através da análise dos resultados. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período do tratamento. Dados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes. *** $p < 0,001$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

5.7 FUCOXANTINA INDUZ CONDENSAÇÃO DO NÚCLEO CELULAR E FORMAÇÃO DE CORPOS APOPTÓTICOS EM CÉLULA DO GLIOBLASTOMA.

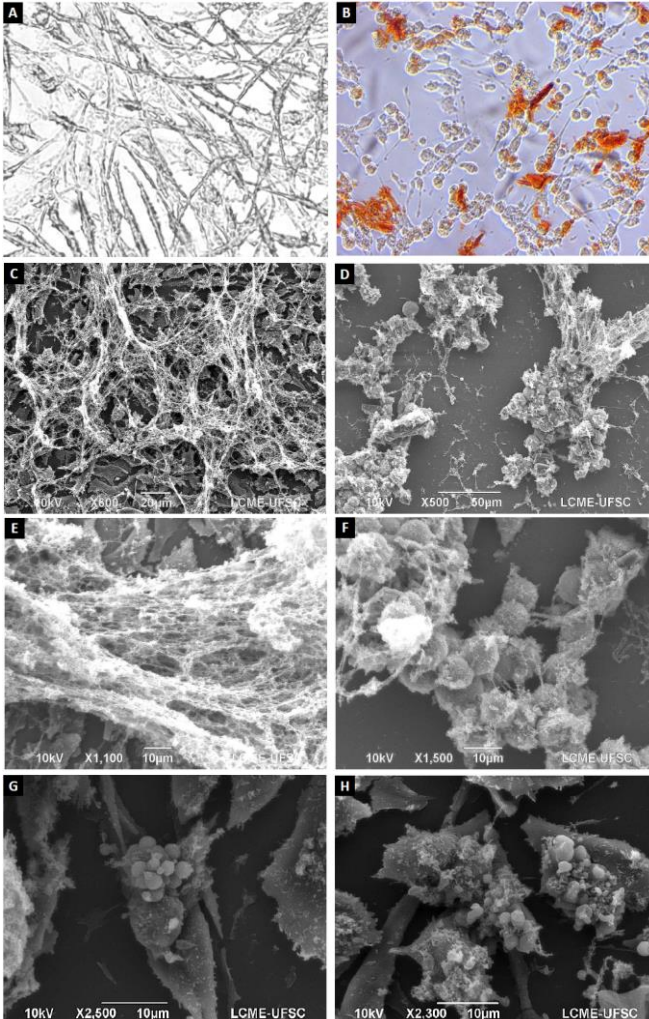
O ensaio de coloração com Hoechst foi realizado com intuito de analisar a morfologia nuclear e determinar células apoptóticas após o tratamento com Fx.

Conforme mostrado na Figura 20A, no grupo controle, os núcleos celulares apresentaram forma regular e mostraram uma distribuição uniforme e baixa densidade de fluorescência. No grupo de células GBM1 expostas a 100 μ M de Fx por 24 horas, os núcleos das células apresentavam alta e concentrada densidade de fluorescência, e alteração morfológica nuclear, como condensação e fragmentação de cromatina (Figura 20B).

Além da coloração Hoechst, os efeitos apoptóticos da Fx em células GBM1 também foram examinados morfológicamente através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Através da MEV, observou-se diferença visível na morfologia de células não tratadas e de células tratadas com Fx. As células não tratadas possuem área de superfície lisa, finita e rígida com boa integridade da membrana celular (Figura 19C e E). Em contraste, as células tratadas com 100 μ M de Fx exibiram diminuição significativa de tamanho e uma deformação aparente, além de apresentarem corpos apoptóticos (característica de células em apoptose) (Figura 19 D, F, G e H). Foi observado também, uma diminuição significativa da matriz extracelular das células tratadas com Fx quando comparada com as células controle.

Posteriormente, a MET foi utilizada para observar alterações ultraestruturais em células GBM1 após o tratamento com Fx. Conforme mostrado na Figura 20A, as células não tratadas exibiram uma ultraestrutura de núcleo normal com cromatina uniformemente distribuída. Em contraste, após o tratamento com 100 μ M de Fx, as células GBM1 sofreram alterações ultraestruturais significativas, que representam as características morfológicas típicas de apoptose, como condensação de cromatina (Figura 20D), ocorrência de vacúolos, rompimento das membranas mitocondriais (Figura 21B) e inchaço do retículo endoplasmático rugoso (RER) (Figura 20F). Esses dados reforçam os resultados já relatados nesse trabalho do efeito pró-apoptótico exercido pela Fx em células de GBM.

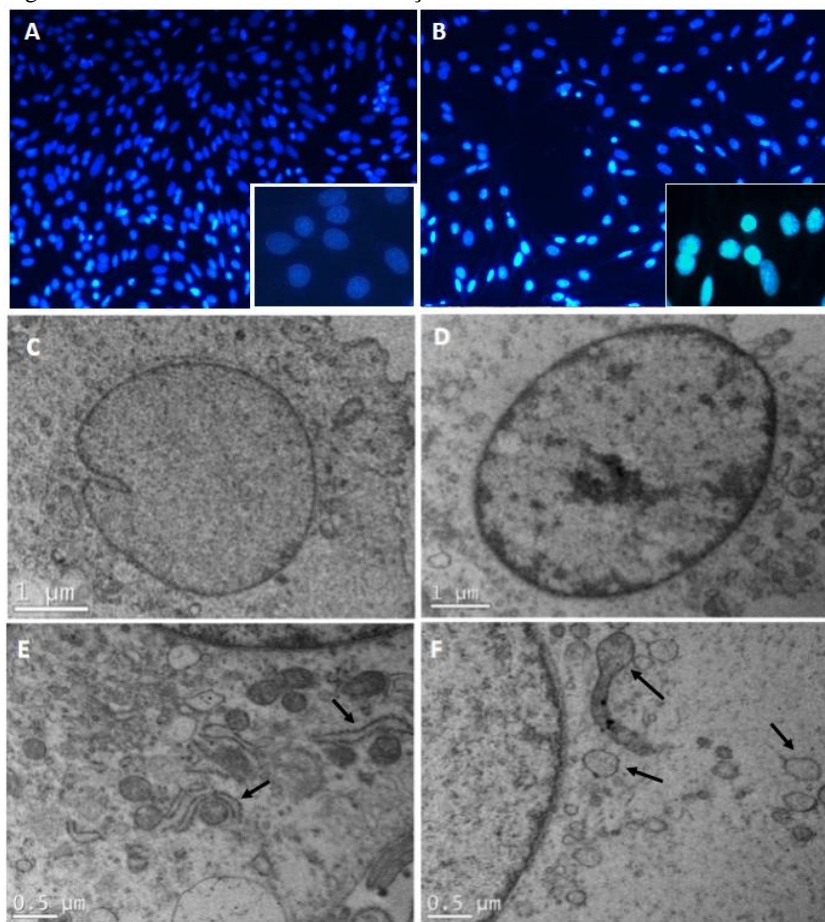
Figura 19 - Fucoxantina induz a formação de corpos apoptóticos em célula do glioblastoma



(A; B) Após confluência as células GBM1 foram tratadas com $100\mu\text{M}$ de Fx por 24 horas, preparadas e visualizadas em microscópio de campo claro ou eletrônico. (A) Imagem de campo claro de GBM1 controle e (B) GBM1 tratadas com Fx. (C, E) Imagem de varredura da célula controle e em (D, F,G,H) das células tratadas; (F,H) visualização dos corpos apoptóticos das células tratadas com Fx.

Fonte: elaboração da autora (2017).

Figura 20 - Fucoxantina induz condensação do núcleo celular e estresse do RER



Após confluência, as células GBM1 foram tratadas com 100µM de Fx. Após 24 horas, as células foram preparadas e visualizadas em microscópio de fluorescência ou eletrônico. (A) Imagem de microscopia de fluorescência do núcleo da célula GBM1 controle e em (B) do núcleo das células GBM1 tratadas com Fx. (C) Imagem ultraestrutural do citoplasma da célula controle e em (D) das células tratadas. As flechas pretas em indicam RER com sua estrutura normal (E) e em (F) RER alterada (inchaço).

Fonte: elaboração da autora (2017).

5.8 FUCOXANTINA INDUZ A PERDA DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E DIMINUI A PRODUÇÃO DE ATP EM CÉLULAS GBM1

As disfunções mitocondriais são importantes causadoras da cascata apoptótica. Desta forma, estudamos o efeito da Fx na manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da célula GBM1.

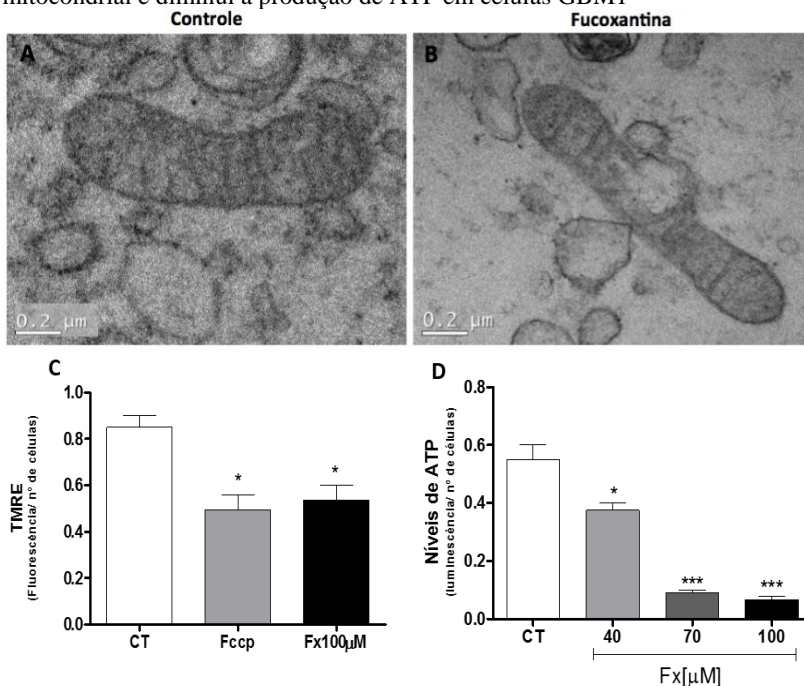
As células GBM1 não tratadas resultaram na máxima fluorescência de TMRE, refletindo mitocôndrias funcionais intactas. O tratamento com 100 μ M de Fx por 24 horas resultou em uma dissipação do $\Delta\Psi_m$, detectada por uma conseqüente diminuição da fluorescência média (Figura 21C). $\Delta\Psi_m$ foi reduzido 41,17% no grupo tratado com Fx. Por conseqüente, esses dados mostraram que Fx promove alterações no $\Delta\Psi_m$.

Também analisamos indiretamente o funcionamento das mitocôndrias das células GBM1, quantificando os níveis de ATP. Após o tratamento com 100 μ M de Fx por 24 horas, quantificamos os níveis de ATP usando o ensaio CellTiter 96® Aqueous One Solution (MTS) (Figura 21D).

Em relação aos resultados, observamos que o tratamento com Fx diminuiu os níveis de ATP em células GBM1 ao comparar com o grupo controle. Os níveis de ATP reduziram 32,7%, 83,6% e 88,8% em células expostas a 40,70 e 100 μ M de FX, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle.

Esses resultados corroboram com a hipótese de que a Fx estaria interferindo no funcionamento das mitocôndrias da GBM1, o que poderia explicar a indução de apoptose nestas células.

Figura 21 - Fucoxantina causa diminuição do potencial de membrana mitocondrial e diminui a produção de ATP em células GBM1



(A) Imagem de MET de mitocôndria das células controle e em (B) de células tratadas com Fx (100 μM). (C) Após confluência, as células GBM1 foram tratadas com Fx40, 70 e 100 μM por 24 horas, quando foi realizado o ensaio Celltiter. (D) Após confluência, as células GBM1 foram tratadas com 100 μM de Fx e após 24 horas foi realizado o ensaio TMRE. FCCP foi utilizado como controle da sonda. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período do tratamento. Os valores de fluorescência e luminescência foram divididos pelo número total de células correspondente a cada grupo. Dados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,0001$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

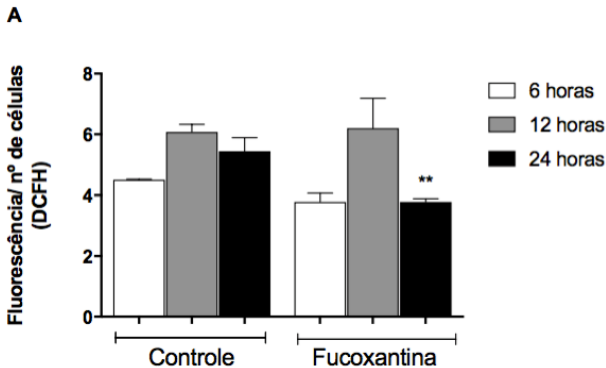
5.9 FUCOXANTINA INDUZ AUMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM CÉLULAS GBM1

Moléculas de EROs são fatores importantes para a regulação de várias funções celulares. Em particular, a produção excessiva de ROS pode levar à morte celular através de apoptose (SIMON et al., 2000)

Assim, examinamos o efeito da Fx sobre o acúmulo de EROs em células GBM1 usando corante fluorescente, DCFDHA.

Conforme mostrado na Figura 22, não ocorreu alteração dos níveis de EROs após o tratamento com 100 μ M de Fx por 12 e 24 horas, comparado ao grupo controle. Porém em 24 horas de tratamento com Fx ocorreu diminuição da produção de EROs nas células GBM1. Assim, pode-se relatar que a Fx não teve efeito oxidante nas células GBM1 em nenhum dos tempos de tratamento.

Figura 22 - Fucoxantina induz aumento de espécies reativas de oxigênio em células GBM1



(A) Células GBM1 foram semeadas em placas de 96 poços e após confluência foi adicionado o meio com 100 μ M de Fx por 6, 12 e 24 horas, quando foi realizado o ensaio DFCHDA. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; *# $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

5.10 FUCOXANTINA INIBE A DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVECS)

A angiogênese é um fator importante e está frequentemente alterada na progressão tumoral. Assim, realizamos dois experimentos *in vitro* utilizando as células HUVECs, que representam algumas fases da resposta angiogênica inicial.

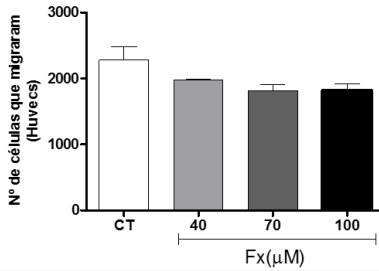
O efeito inibitório da Fx na migração quimiotática de HUVECs foi avaliado através de um ensaio utilizando Transwell (Figura 23). Em relação ao gráfico, o tratamento de células GBM1 com Fx não impediu a migração das HUVECs. A presença da Fx nas concentrações 40, 70 e 100 μ M não alterou o número de células HUVECs que migraram pelo inserto quando comparado ao grupo controle.

Também realizamos o ensaio de formação de tubo endotelial (tubulogênese) com HUVECs, experimento que representa a diferenciação endotelial *in vitro*.

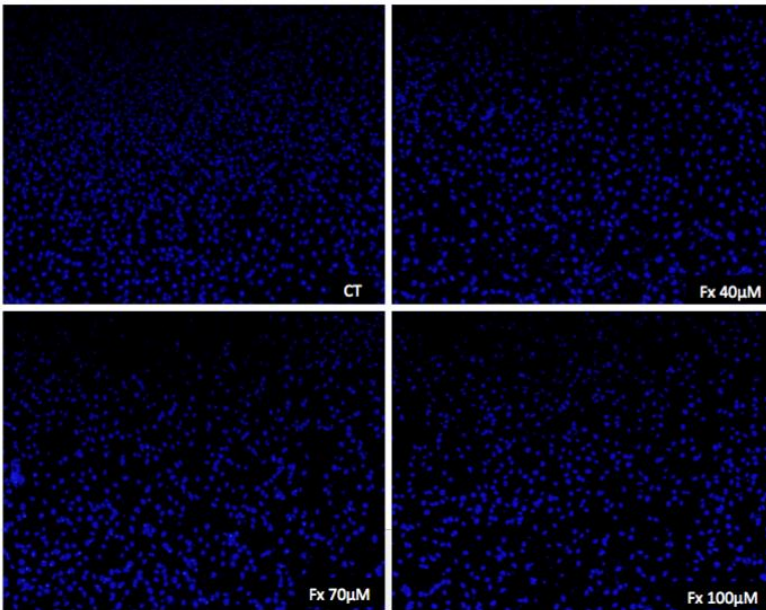
Conforme mostrado na Figura 24, o meio condicionado de células GBM1 expostas a Fx 100 μ M inibiu significativamente a tubulogênese. Pode-se observar que no grupo controle ocorreu a formação dos tubos, porém no grupo exposto ao meio condicionado observa-se aglomerados de células HUVECs em diversos locais sem nenhuma estrutura tubular formada. Esses resultados indicam que o tratamento das células GBM1 com Fx não impediu a migração das células HUVECs, porém, inibiu a diferenciação dessas células, consequentemente impedindo a tubulogênese, demonstrando um efeito importante na angiogênese.

Figura 23 - O meio condicionado de células de glioblastoma tratadas com Fucoxantina não impede a migração das células HUVECS

A



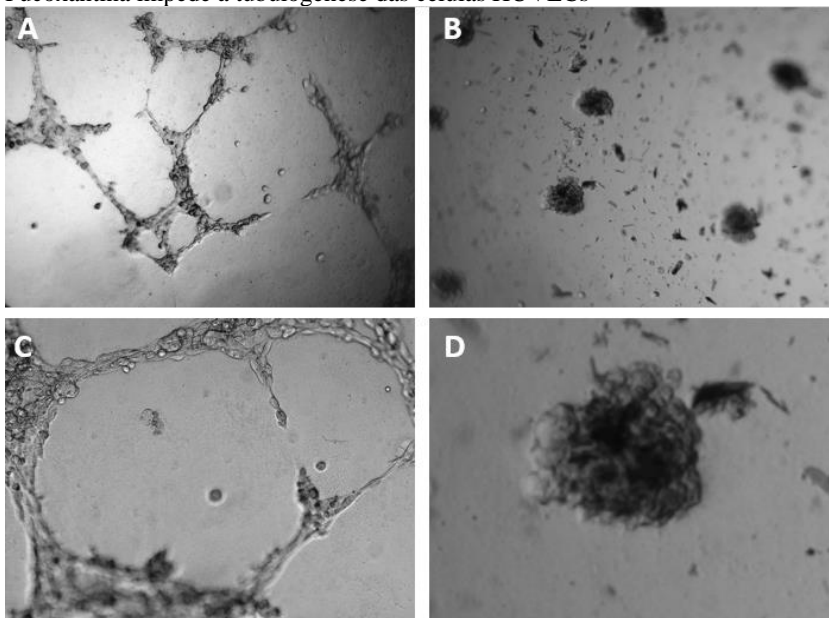
B



(A) Células GBM1 foram semeadas em placas de 24 poços, após confluência foi adicionado o meio com Fx (40,70 e100µM) e após foi colocado o inserto Transwell contendo as células HUVECS sobre as células GBM1 (B) Imagem representativa das células coradas com Hoescht que migraram e se localizavam na parte de baixo do inserto. O grupo controle foi incubado com meio de cultura pelo mesmo período. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

Figura 24 - O meio condicionado de células de glioblastoma tratadas com Fucoxantina impede a tubulogênese das células HUVECs



Células HUVECs foram semeadas em placas de 96 poços recobertas com Matrigel e tratadas com meio condicionado das células GBM1 tratadas com $100\mu\text{M}$ de Fx e após 16 horas foram observadas no microscópio de contraste de fase (A, C) Imagem representativa dos tubos formados no grupo controle e em (B, D) do grupo tratado com o meio condicionado. O grupo controle foi incubado com meio de cultura pelo mesmo período.

Fonte: elaboração da autora (2017).

5.11 FUCOXANTINA INIBE A ANGIOGÊNESE *IN VIVO*

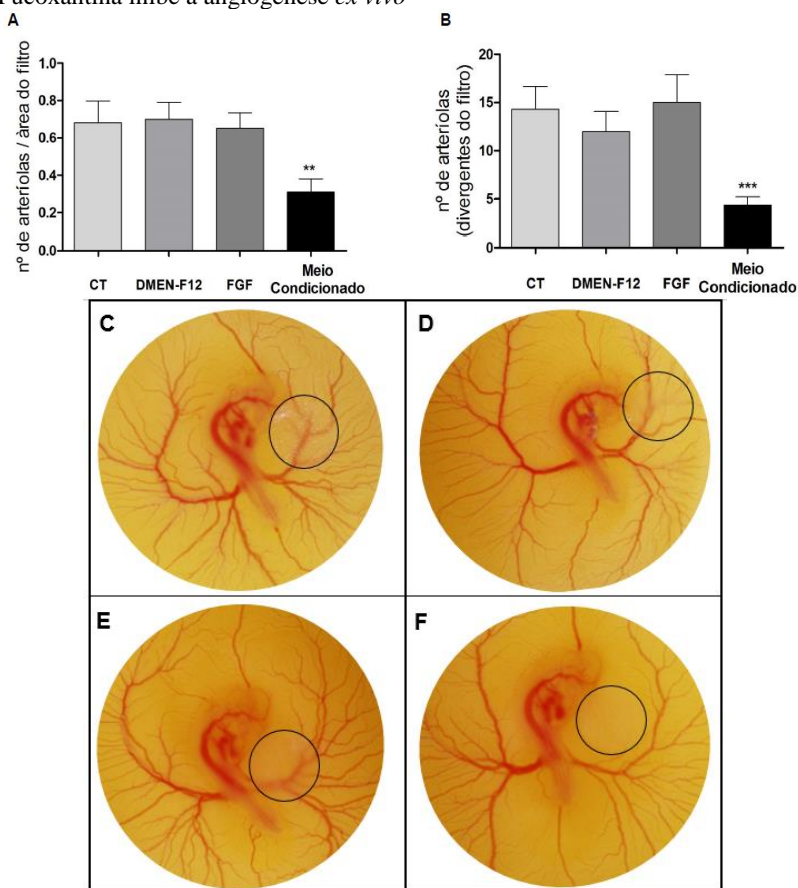
Para investigar a atividade antiangiogênica *in vivo* da Fx no GBM humano, utilizamos o ensaio de angiogênese *ex ovo* utilizando a membrana vitelínica de codorna (Figura 25).

Analisando os dados obtidos (Figura 25A), quando comparamos à área do filtro contendo o meio condicionado de células não tratadas (controle) constatamos que ocorreu a diminuição na vascularização da membrana vitelínica apenas no grupo contendo o meio condicionado das células GBM1 tratadas com Fx. Entretanto, não houve diferença entre o número de vasos em relação à área do filtro quando comparados os grupos controle, DMEM-F12 e FGF₂.

Em relação à vascularização circundante ao filtro (Figura 25B), ocorreu diminuição do número de vasos que divergiram do filtro apenas no grupo contendo meio condicionado das células tratadas. Não houve diferença, novamente, entre os grupos controle, DMEM-F12 e FGF₂.

Estes resultados confirmam o potencial anti-angiogênico *ex vivo* do tratamento com Fx em células GBM1.

Figura 25 - O meio condicionado de células de glioblastoma tratadas com Fucoxantina inibe a angiogênese *ex vivo*



Após a realização do ensaio de angiogênese, foram tiradas fotos das placas contendo os embriões (C-F) e posteriormente foram (A) contados os vasos presentes nos filtros de cada grupo e (B) contados os vasos que divergiam dos filtros. (C) Imagem do embrião do grupo controle; (D) Imagem do embrião do grupo DMEM-F12; (E) Imagem do embrião do grupo FGF2; (F) Imagem do embrião do grupo meio condicionado das células tratadas com Fx. Todos os filtros foram colocados na mesma posição na membrana vitelínica do embrião. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão foram analisados 4 embriões para cada grupo. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

Fonte: elaboração da autora (2017).

6 DISCUSSÃO

Apesar dos avanços dos estudos relacionados à biologia molecular, genética e celular dos gliomas, nenhum impacto significativo foi feito para prevenir a letalidade desse tipo de tumor (DAVIS, 2016). Por conseguinte, há necessidade de mais estudos que envolvam tratamentos alternativos, principalmente incluindo fármacos naturais que melhorem a sobrevida e não sejam tóxicos para o paciente acometido por essa neoplasia.

Diversos medicamentos anticancerígenos eficazes foram descobertos a partir de fontes naturais, como por exemplo fontes marinhas (RENGARAJAN et al., 2013). Um deles é a Fucoxantina. A Fx é um carotenóide natural biologicamente ativo, abundante em micro e macroalgas que exibe diversas atividades biológicas, incluindo ações anti-tumorigênicas frente à diversas linhagens celulares cancerígenas e mostra atividade sinérgica em combinação com drogas citotóxicas estabelecidas. Isto aumenta a possibilidade da Fx se tornar um interessante composto anticancerígeno em vários tipos de câncer (PENG et al., 2011; TAKAICHI, 2011; MIKAMI; HOSOKAWA, 2013).

Um dos efeitos anti-cancerígenos exercido por esse carotenóide é a sua ação citotóxica. Alguns estudos demonstram esses efeitos em linhagens celulares tumorais.

Por exemplo, em linhagens celulares de câncer de colórectal (Caco-2; HCTT116, DLD-1) e em câncer de pulmão (A549, SPC-A1; H460 e H1299), a Fx diminuiu significativamente a viabilidade dessas linhagens celulares em concentrações acima de 20 μ M em 24 horas; em câncer de bexiga a Fx diminuiu a viabilidade das células tumorais em concentrações acima de 40 μ M por 24 horas. Em câncer de fígado, ocorreu a diminuição da viabilidade das células tumorais nas concentrações 25 e 50 μ M de Fx nos períodos de 24 e 48 horas. Em neuroblastoma, a concentração citotóxica de Fx foi a partir de 10 μ g/ml em 5 dias de tratamento e no caso de leucemia a viabilidade das linhagens tumorais (HL-600; HP50-2 e Hp100-1) diminuíram a partir de 10 μ M de Fx em 24 horas (OKUZUMI et al., 1990; KOTAKE-NARA et al., 2005; DAS et al., 2008; WANG et al., 2014; YE et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2015; COSTA et al., 2017), demonstrando que esse efeito citotóxico da Fx varia em relação à concentração dentre os diferentes tipos de tumores.

Contudo, a citotoxicidade da Fx foi exclusiva a células neoplásicas. Diversos estudos relataram que o tratamento com Fx, afetou pouco ou não afetou as células normais em relação às células

tumorais. Indicando assim o efeito diferencial e focado da Fx em células cancerígenas (SUGAWARA et al., 2002; MOREAU et al., 2006; LIU et al., 2009; MATSUMOTO et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2011).

Até o presente estudo era desconhecido o efeito da Fx em células de cultura primária de GBM e nas linhagens comerciais A172 e C6. Portanto, nesse trabalho foi analisado o potencial citotóxico do carotenóide nessas células de GBM.

Em relação aos resultados obtidos nesse trabalho foi constatado que, o carotenóide marinho Fx, exibiu efeitos citotóxicos dependentes da concentração nessas três linhagens celulares de GBM. Ocorreu diminuição da viabilidade das células tumorais a partir da concentração de 70 μ M de Fx em 24 horas.

Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Liu e colaboradores (2016) onde observaram que o tratamento com Fx acarretou diminuição da viabilidade em linhagens comerciais de GBM (U87 e U251) em concentrações a partir de 50 μ M em 24 horas.

Nesse trabalho também foi analisado o efeito citotóxico da Fx em comparação com o quimioterápico TMZ, uma das drogas mais amplamente utilizadas no tratamento do GBM. Constatando que, nos grupos tratados com de 70 e 100 μ M Fx, observou-se um maior efeito citotóxico quando comparado a concentrações similares de TMZ (Dados não mostrados).

Além disso, essas concentrações (70 e 100 μ M) não acarretaram declínio na viabilidade dos astrócitos, realçando o efeito não citotóxico da Fx, em células sadias.

Essa compilação de resultados foram considerados promissores pois, além da Fx demonstrar melhor efeito citotóxico, em concentrações mais baixas, em relação a uma droga utilizada no tratamento de GBM, essas mesmas concentrações não foram prejudiciais à células sadias. Com base nesse conjunto de resultados podemos considerar a Fx como um possível método de tratamento alternativo para o GBM.

A proliferação das células é normalmente determinado por sinais extracelulares que controlam a expressão gênica e a regulação proteica necessária para a divisão celular (SHERR; MCCORMICK, 2002). Em contraste, durante a progressão tumoral, as células cancerígenas adquirem a capacidade de proliferar independentemente dos sinais exógenos ou inibidores de crescimento (MARTIN, 2003; HAHN, 2004; DAS et al., 2005). Assim, o efeito anti-proliferativo de compostos químicos ou drogas é uma ação desejável para um agente anti-tumoral.

A respeito da ação anti-proliferativa da Fx, vários estudos mostraram que esse carotenóide marinho exibiu potencial antiproliferativo em diferentes tipos de carcinomas, incluindo câncer de próstata (PC-3, DU145, LNCaP), leucemia (HL-60, HP50-2, HP100-1, ATL), câncer de colo (HT- 29, caco-2, DLT-1, LS1174T), câncer de fígado (HepG2, S-Hep-1), câncer de bexiga urinária (EJ-1), câncer gástrico (MGC-803), câncer de mama (MCF-7) melanoma (B16F10) e linfoma (PEL) de uma maneira dependente da dose. Esse efeito anti-tumorígeno observado é principalmente devido à indução da parada do ciclo celular e regulação das proteínas envolvidas nesse processo (KOTAKE-NARA et al., 2001; HOSOKAWA et al., 2004; ZHANG et al., 2008; LIU et al., 2009; KIM; HEO; KANG, et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2011; YU et al., 2011; KIM et al., 2013).

Yu e colaboradores (2011) demonstraram que a fucoxantina induziu efetivamente parada do ciclo celular na fase G2/M em células MGC-803 de câncer gástrico sendo esse efeito provavelmente através da regulação da survivina e a CiclinaB1 pela via JAK/STAT. Já Ishikawa e colaboradores (2008) constataram a diminuição da expressão de ciclina D1, ciclina D2, CDK4, CDK6 e cIAP2 no tratamento com Fx em células de leucemia.

Kim e colaboradores (2013) observaram que o tratamento com Fx em células de melanoma (B16F10) induziu a parada do ciclo celular em G0/G1 e diminuiu os níveis de pRb, ciclina D1, ciclina D2 e CDK4 e aumentou dos níveis de p15INK4B, p27KIP1. Satomi e Nishino (2009) relataram que a Fx induziu a parada do ciclo na fase G1 em células HepG2 e DU145; e Das et al. (2005) observaram paragem do ciclo celular na fase G0/G1 em concentrações mais baixas de Fx (20µM).

Analisando nossos resultados, constatamos que a Fx exibiu atividade antiproliferativa na concentração de 100µM em 24 horas, reduzindo 40% a proliferação de células de glioblastoma. Esse resultado demonstranovamente que a concentração de 100µM de Fx parece ser interessante para pesquisas futuras, pois exibe um potencial não somente citotóxico como também antiproliferativo.

No entanto, o mecanismo e as vias responsáveis por esse efeito anti-proliferativo da Fx, nas células GBM1, ainda deve ser elucidado, para isso é necessário a realização de outros experimentos, como análise do ciclo celular por citometria e expressão de proteínas ligadas à regulação do ciclo celular (ciclina e p53).

Apesar do efeito citotóxico expressivo da Fx (100µM) em células de GBM mencionado acima, o tratamento com esse carotenóide não acarreta na morte de todas as células de GBM1, pois cerca de 30% das

células sobrevivem ao tratamento. Provavelmente essas células que resistem ao tratamento são células tronco tumorais (CSCs). Esse tipo de célula se encontra altamente presente no nicho celular que compõe o tumor, além de possuírem diversas características de resistência à fármacos, como por exemplo quiescência, morfologia específica, capacidade de reparo de DNA, superexpressão de proteínas antiapoptóticas, de transportadores de efluxo de drogas e enzimas desintoxicantes (ALTANER, 2008; BRADSHAW et al., 2016)

Uma das características mais notáveis das CSCs é a capacidade de autorrenovação e alto potencial replicativo (FEDR et al., 2013). Alguns estudos avaliaram a atividade anti-clonogênica dos alungscarotenoides. Haddad e colaboradores (2013), demonstraram que o tratamento com o carotenóide licopeno diminui o número de colônias das células AtT-20 (adenoma pituitário) em concentrações de 5 e 10 μM . Já Lee e colaboradores (2013), revelaram que o β -caroteno diminuiu o potencial clonogênico de células BE(2) C (neuroblastoma) em concentrações a partir de 5 μM .

Porém, até o momento, não haviam trabalhos na literatura que descrevam a atividade anti-clonogênica da Fx em células tumorais. Através dos nossos resultados, constatamos que o tratamento com Fx acarretou na diminuição do potencial proliferativo e do número de clones das células GBM1. Isso indica um resultado promissor, pois, por mais que o tratamento com Fx não seja eficiente em eliminar todas as células, as células que restam acabam se proliferando menos e mais lentamente, induzindo assim a diminuição da progressão tumoral.

Além da alta capacidade proliferativa, o mau prognóstico do glioblastoma é devido a uma série de outros fatores. Um desses fatores é a alta capacidade de invasão que células tumorais possuem. Essa elevada competência migratória e invasiva do GBM ocasiona uma alta taxa de recorrência e resultam no aparecimento de lesões multifocais, subclínicas, reduzindo a eficiência das terapias convencionais (SIEBZEHRUBL et al., 2011; KIM et al., 2016).

A Fx demonstrou atividade anti-invasiva em algumas linhagens cancerígenas. Chung e colaboradores (2013) estudaram o efeito da Fx em células B16-F10 (melanoma murino metastático) e na expressão de MMP-2 e MMP-9. Estas MMPs são altamente expressas em células tumorais e são responsáveis por degradar o colágeno tipo IV durante a invasão do câncer. No estudo citado, o tratamento com Fx resultou na diminuição da expressão e dos níveis de secreção de MMP-9 e diminuiu a invasão das células B16-F10. Além disso, o carotenóide marinho promoveu diminuição da mobilidade das células de melanoma,

suprimindo a invasão de células no ensaio de invasão de Transwell® e migração celular no ensaio de cicatrização de feridas.

Todavia não há estudos sobre o efeito anti-invasivo da Fx em células de cultura primária de glioblastoma. Através da análise dos nossos ensaios, observamos que as células expostas à Fx migraram menos do que o grupo controle. Quanto ao potencial anti-invasivo da Fx, nossos resultados mostraram que todas as concentrações desse carotenoide diminuíram o número de células GBM1, que invadiram o Matrigel®.

Resultados similares foram encontrados por Liu e colaboradores (2016). Nesse trabalho, foi mostrado que o tratamento com 50µM de Fx por 18 horas acarretou em diminuição da invasão e migração das linhagens de glioblastoma U87 e U251, via inibição das moléculas MMP2 e 9.

Assim sendo, esses resultados sugerem que a Fx tem efeito inibitório sobre a migração e a invasão das células do glioblastoma. É provável que essa ação inibitória seja similar à ação exercida nos outros tipos de tumor, via regulação das proteínas MMPs. Porém para comprovação dessa hipótese é necessário a realização de outros experimentos como por exemplo, mensurar a expressão dessas proteínas após o tratamento com Fx, através do *western blotting*.

Por possuir esse papel anti-invasivo e migratório em células cancerígenas a Fx pode ser uma valiosa alternativa de prevenção da metástase e da invasão das células cancerígenas. Além da invasão e remodelação dos tecidos, a angiogênese é um fator importante e que influencia na progressão tumoral (FOLKMAN, 2000; NISHIDA et al., 2006). Em geral, o crescimento tumoral é dependente do início de uma nova vascularização (LIOTTA et al., 1991; HANAHAN; FOLKMAN, 1996).

Estudos pré-clínicos demonstraram que os tumores induzem o surgimento de novos vasos da vasculatura circundante (angiogênese germinante) e que este processo é vital para o crescimento de tumores além de 2 a 3mm em tamanho. Desse modo, a inibição da angiogênese poderia suprimir o crescimento tumoral (FOLKMAN, 1972).

Uma característica patológica do glioblastoma multiforme que o distingue de tumores gliais de grau inferior é a proliferação microvascular. Em geral, os GBMs são altamente vascularizados (DAS; MARSDEN, 2013).

Trabalhos anteriores mostram que muitos compostos derivados do mar podem exercer efeitos inibitórios na formação de novos vasos *in*

vitro, *in vivo* e *ex vivo*. No entanto, o efeito anti-angiogênico da Fx em células tumorais ainda não havia sido estudado.

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que a Fx não conseguiu prevenir a migração de células HUVEC na presença de células de glioblastoma. Isso indica, possivelmente, que esse carotenóide não impediu a liberação de fatores de crescimento pelas células GBM1 no meio, então não impedido a atração das células endoteliais. Ou, talvez, que a Fx não foi eficiente em quimioatrair as células HUVEC. Por outro lado, o meio condicionado das células GBM1 tratadas com Fx impediu a tubulogênese, logo, o tratamento de células GBM1 com Fx poderia estar modulando a diferenciação das células endoteliais.

Além disso, os resultados do ensaio anti-angiogênico *in vivo* indicaram que o meio condicionado das células GBM1 tratadas com Fx diminui a formação tanto a vascularização quanto a ramificação da membrana vitelínica da cordona. Entretanto, não podemos afirmar que os efeitos anti-angiogênicos observados através do ensaio *ex vivo* foram somente, pela falta de fatores angiogênicos no meio condicionado, ocasionada pelo tratamento com a Fx, ou devido exclusivamente à presença da Fx nesse meio condicionado. No entanto, de qualquer forma, a Fx estaria impedindo de uma maneira ou outra a formação de novos vasos.

Através da compilação desses dados concluímos que o tratamento com Fx em células de glioblastoma foi capaz de diminuir os processos iniciais de angiogênese *in vitro* como a diferenciação de células endoteliais e capaz de modular a angiogênese *in vivo*, embora não tenha impedido a migração das células endoteliais (HUVECs).

Os resultados descritos acima corroboram com os dados obtidos por Sugawara e colaboradores (2002). Esses pesquisadores investigaram os efeitos anti-angiogênicos da Fx utilizando as células HUVECs e o anel aórtico de ratos. No trabalho citado, Fx suprimiu significativamente a diferenciação de células progenitoras em células endoteliais e a formação de novos vasos sanguíneos, reduzindo significativamente o comprimento dos tubos de células endoteliais não apresentando atividade significativa na quimiotaxia das células HUVEC.

Em nosso trabalho, o efeito anti-angiogênico exercido pela Fx reforçou ainda mais os benefícios de utilizar a Fx como forma alternativa de tratamento pra o GBM. Entretanto, as vias moleculares de inibição da angiogênese mediada pela Fx ainda deve ser estudada, para isso, alguns experimentos necessitam serem realizados, como análise da expressão de proteínas e fatores angiogênicos ligados a esse processo.

Outra característica de resistência e agressividade do GBM é a capacidade de evasão à apoptose (KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010). Este tipo de morte celular é o processo seletivo de deleção celular fisiológica que regula o equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular. O fracasso da apoptose contribui em geral para o desenvolvimento de doenças malignas. A indução da apoptose é considerada uma estratégia atraente para a terapia do câncer (PUCCI et al., 2000; GERL; VAUX, 2005). Recentemente vários estudos relataram os efeitos anti-apoptóticos da Fx em várias linhagens celulares de câncer.

Zhang e colaboradores (2008), observaram que 20 μ M de Fx induziu significativamente a apoptose acompanhada por ativação de caspase-3 em 72 horas em células de câncer de bexiga humana EJ-1. Kim e colaboradores (2010) relataram que a Fx induziu apoptose dependente de caspase após geração de EROs e redução de BCL-XL em células HL-60. Rwigemera e colaboradores (2015) relataram que tanto a Fx quanto o Fxol (10-40 μ M) induziram apoptose dependente da caspase em linhas celulares de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231. Liu e colaboradores (2016), constatou que a Fx (50 μ M) induziu apoptose em uma linhagem comercial de glioblastoma (U87) através da inibição da via de sinalização PI3K / Akt / mTOR.

No entanto, os efeitos apoptóticos e necróticos da Fx em cultura primária de glioblastoma ainda não haviam sido estudados. Assim, neste estudo investigamos o efeito da Fx na indução de apoptose e necrose em células GBM.

Os dados deste trabalho mostraram que a Fx aumentou a porcentagem de células apoptóticas GBM1 (40%) em relação ao grupo controle. Essa proporção de morte celular foi semelhante à relatada no teste de viabilidade, desta forma demonstrando que o papel citotóxico da Fx seria principalmente através da indução da apoptose. Considerando que o grupo de células tratadas com Fx tiveram a mesma porcentagem de células necróticas que o grupo controle, podemos afirmar que a Fx não induziu necrose nas células tumorais. Esse efeito é considerado positivo, pois a presença de necrose em GBM é uma característica indesejável, já que este processo estimula a progressão tumoral.

A necrose demonstrou ser uma poderosa preditora ao mal prognóstico do paciente. Algumas observações clínicas sugerem que a presença de necrose acarreta em um impacto geral negativo sobre a sobrevivência. Um estudo que avaliou a extensão da necrose em diversos pacientes com GBM, mostrou uma correlação inversamente proporcional do grau de necrose com a sobrevivência do paciente. Além

disso, sua presença pode ocasionar a progressão tumoral de um astrocitoma maligno para GBM (LACROIX et al., 2001; RAZA et al., 2002). Além de influenciar na progressão tumoral, durante a necrose, em sua fase final, ocorre o extravasamento do material citoplasmático, ocasionando processos inflamatórios (ROCK; KONO, 2008). Para uma paciente com GBM que já possui sua saúde debilitada, esse processo é extremamente indesejável, pois acarretaria na piora do estado desse indivíduo.

Continuando a análise do efeito apoptótico da Fx, observamos através da microscopia eletrônica de varredura que o tratamento com esse carotenóide induziu a condensação e heterocromatinização do núcleo das células GBM, encolhimento das células e a formação de corpos apoptóticos. Esses resultados podem ser considerados um indicativo qualitativo da ação apoptótica da Fx nas células tumorais, pois essas determinadas características e ultraestruturas são típicas de células apoptóticas. Observamos também que houve o aparecimento de inchaço no RER nas células GBM1 após o tratamento com Fx.

A princípio, existem três vias alternativas que iniciam a apoptose: uma é mediada por receptores de morte na superfície celular, referida como a "via extrínseca"; e a outra é mediada pela mitocôndria denominada como a via intrínseca e da Granzima B.

As mitocôndrias desempenham um papel importante na regulação do processo apoptótico. Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) (LOEFFLER; KROEMER, 2000).

Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas citocromo c, AIF, para o citoplasma iniciando a cascata apoptótica. Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do $\Delta\psi$ e TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de EROs. O aumento nos níveis de EROs leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi$ (GOTTLIEB et al., 2000; GREEN; KROEMER, 2004).

Dessa forma, com o intuito de avaliar por qual via o carotenóide marinho estaria induzindo a apoptose, observada nos resultados anteriores, analisamos integridade mitocondrial e os níveis de EROs nas células GBM1 após o tratamento com Fx.

Ao analisar os dados, detectamos que a Fx induziu a diminuição do potencial da membrana mitocondrial, reduziu os níveis de ATP

intracelular, levou a modificações na estrutura das mitocôndrias (rompimento das membranas mitocondriais) das células GBM porém não induziu aumento de EROs. Supomos, assim, que a apoptose induzida pela Fx em células GBM1 é através da via intrínseca mediada pela redução do potencial da membrana mitocondrial.

Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Kotake-Nara e colaboradores (2001) e de Liu e colaboradores (2016). No primeiro trabalho, os pesquisadores constataram que a apoptose induzida por Fx em células HL-60 estava associada a uma perda de potencial de membrana mitocondrial em estágio inicial, porém, não ocorreu aumento de ROS. No segundo, os cientistas também constataram que a indução da apoptose mediada pela Fx em células U87 (modelo comercial de GBM) iniciou-se através da redução do potencial de membrana mitcondrial acarretando a liberação do citocromo c.

Por conseguinte, a hipótese que sugerimos para explicar esse efeito, seria que a Fx, atravessaria a membrana plasmática, causaria diretamente a disfunção das mitocôndrias ao acumular-se nas membranas mitocondriais e estresse do RER, levando à redução do seu potencial de membrana e induzindo a liberação dos fatores apoptóticos, como o citocromo c. Essa suposição corrobora a discussão e com os dados obtidos no trabalho de Kotake-Nara e colaboradores (2001), onde os pesquisadores analisaram os efeitos na Fx em células de leucemia e constataram que o efeito apoptótico induzido por esse cartotenoide estava ligado à redução do potencial de membrana mitocondrial e relacionando esse efeito ao aprisionamento da Fx pelas células tumorais e mitocôndrias (células ficavam coradas de laranja, coloração típica de Fx).

Contudo, os mecanismos bioquímicos e moleculares da ação pró-apoptótica da Fx em células de cultura primária de GBM, devem ser estudados mais a fundo.

As descobertas feitas nesse trabalho demonstram que a Fx revelou ser um potente indutor de apoptose, com propriedades anti-proliferativas, de anti-invasão e anti-angiogênicas em células de glioblastoma primário, sendo o primeiro estudo a trabalhar essas questões. Com base nestes achados, é tentador especular que a Fx isolada ou em combinação com outros quimioterápicos convencionais possa ser potencialmente útil no tratamento do glioblastoma. Porém, um estudo mais aprofundado é necessário para elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a Fx exibe o potencial anti-cancerígeno, em GBM e outros tipos tumorais.

MATRIZ

7 CONCLUSÃO

Por meio dos dados obtidos neste trabalho concluímos que:

- O tratamento com Fx diminuiu a viabilidade das células de glioblastoma humano;
- Fx não apresentou atividade citotóxica em células sadias (astrócitos murinos);
- A Fx diminuiu a proliferação celular das células GBM1;
- O tratamento com Fx diminuiu a migração e invasão das células GBM1;
- O tratamento com o Fx induziu apoptose nas células GBM1 possivelmente através da redução do potencial de membrana mitocondrial e do estresse do RER.
- O tratamento das células GBM1 com Fx não alterou a migração das células HUVECs porém, inibiu a diferenciação dessa linhagem celular.
- O tratamento com Fx nas células GBM1 impediu a angiogenesis *in vivo*.

Com base nestes achados, especulamos que a Fx *per se* pode ser potencialmente eficaz e útil no tratamento para glioblastoma multiforme. Porém estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação, moleculares e bioquímicos da Fx nas células de GBM.

Perspectivas futuras desse trabalho seriam; aprofundar e desvendar os mecanismos bioquímicos e moleculares, envolvidos nas ações anti-tumorais da fucoxantina, relatados nesse trabalho. Através de ensaios moleculares como PCR, analisando a expressão de genes envolvidos nesses processos, e também ensaios de western blott para quantificação das proteínas traduzidas por esse genes e principalmente investigar a ação da Fucoxantina na matriz extracelular e seus componentes, das células de glioblastoma humano.

REFERÊNCIAS

AL-RIKABI, A. C. et al. Metastatic deposits of a high-grade malignant glioma in cervical lymph nodes diagnosed by fine needle aspiration (FNA) cytology--case report and literature review. **Cytopathology**, v. 8, n. 6, p. 421-7, dez. 1997. ISSN 0956-5507. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9439895>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ALCANTARA LLAGUNO, S. R.; PARADA, L. F. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 12, p. 1445-1450, dez. 2016. ISSN 1532-1827. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27832665>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ALTANER, C. Glioblastoma and stem cells. **Neoplasma**, v. 55, n. 5, p. 369-74, 2008. ISSN 0028-2685. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18665745>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ASAI, A. et al. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. **Drug Metabolism and Disposition** v. 32, n. 2, p. 205-11, fev. 2004. ISSN 0090-9556. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744942>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BAO, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756-60, dez. 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051156>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BARRES, B. A. What is a glial cell? **Glia**, v. 43, n. 1, p. 4-5, jul. 2003. ISSN 0894-1491. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761860>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BARRES, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430-40, nov. 2008. ISSN 1097-4199. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995817>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BEPPU, F. et al. Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 5, p. 501-10, out. 2009. ISSN 1880-3989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19797858>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 401-10, jun. 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778130>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BERGERS, G.; SONG, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. **Neuro Oncology**, v. 7, n. 4, p. 452-64, out. 2005. ISSN 1522-8517. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212810>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BIRBILIS, T. A. et al. Spinal metastasis of glioblastoma multiforme: an uncommon suspect? **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 35, n. 7, p. E264-9, abr. 2010. ISSN 1528-1159. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20195200>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BRADSHAW, A. et al. Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme. **Frontiers in Surgery**, v. 3, p. 48, 2016. ISSN 2296-875X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27617262>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BROWNE, K. A. et al. Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39262-6, dez. 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050075>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

CHENG, L. et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. **Cell**, v. 153, n. 1, p. 139-52, mar. 2013. ISSN 1097-4172. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23540695>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

CHIPPERFIELD, H. et al. Heparan sulfates isolated from adult neural progenitor cells can direct phenotypic maturation. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 46, n. 4, p. 661-70, 2002. ISSN 0214-6282. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141455>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

CHUNG, T. W. et al. Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, n. 4, p. 580-5, out. 2013. ISSN 1090-2104. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036125>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

COHEN, A. L.; HOLMEN, S. L.; COLMAN, H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 13, n. 5, p. 345, maio 2013. ISSN 1534-6293. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532369>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

COSTA, G. B. et al. The brown seaweed *Sargassum cymosum*: changes in metabolism and cellular organization after long-term exposure to cadmium. **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 817-837, mar. 2017. ISSN 1615-6102. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27352314>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 7, p. 501-7, jul. 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19550425>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological Reviews**, v. 193, p. 10-21, jun. 2003. ISSN 0105-2896. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752666>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DANIELS, L. B. et al. Glioblastoma multiforme in two non-nuclear family members. **Journal of the Louisiana State Medical Society**, v. 159, n. 4, p. 215-22, jul.-ago 2007. ISSN 0024-6921. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17987960>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DAS, S.; MARSDEN, P. A. Angiogenesis in glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 16, p. 1561-3, out. 2013.

ISSN 1533-4406. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131182>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DAS, S. K.; HASHIMOTO, T.; KANAZAWA, K. Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, n. 4, p. 743-9, abr. 2008. ISSN 0006-3002. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18230364>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DAS, S. K. et al. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n. 3, p. 328-35, nov. 2005. ISSN 0006-3002. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236452>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DAVIS, M. E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. **Clinical Journal of Oncology Nursings**, v. 20, n. 5, p. S2-8, out. 2016. ISSN 1538-067X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27668386>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DE GROOT, J.; SONTHEIMER, H. Glutamate and the biology of gliomas. **Glia**, v. 59, n. 8, p. 1181-9, ago 2011. ISSN 1098-1136. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192095>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DEBATIN, K. M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 3, p. 153-9, mar. 2004. ISSN 0340-7004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749900>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DECAESTECKER, C. et al. Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 2, p. 149-76, mar. 2007. ISSN 0198-6325. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888756>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DEL BIGIO, M. R. Ependymal cells: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 55-73, jan. 2010. ISSN 1432-0533. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20024659>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DEMBITSKY, V. M.; GLORIOZOVA, T. A.; POROIKOV, V. V. Natural peroxy anticancer agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 571-89, jun. 2007. ISSN 1389-5575. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17584156>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 70, n. 2, p. 217-28, nov. 2004. ISSN 0167-594X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15674479>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DIRKS, P. B. Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 5, p. 420-30, out. 2010. ISSN 1878-0261. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20801091>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DORAZIO, S. J. et al. The reactivity of macrocyclic Fe(II) paraCEST MRI contrast agents towards biologically relevant anions, cations, oxygen or peroxide. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, p. 212-9, dez. 2012. ISSN 1873-3344. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824155>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

EASTWOOD, M. A. Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 92, n. 9, p. 527-30, set. 1999. ISSN 1460-2725. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627873>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FAROOQI, A. A. et al. Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 5743-52, ago. 2015. ISSN 1423-0380. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26188905>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FEDR, R. et al. Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. **Cytometry Part A - Wiley Online Library**, v. 83, n. 5, p. 472-82, maio 2013. ISSN 1552-4930. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450810>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in psoriasis: therapeutic implications. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 59, n. 1, p. 40-3, jul. 1972. ISSN 0022-202X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5039962>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FOLKMAN, J. Incipient angiogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 2, p. 94-5, jan. 2000. ISSN 0027-8874. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639502>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992-1009, nov. 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118458>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 2585-97, jul. 2000. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914698>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

FUS, L.; GÓRNICKA, B. Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma. **Central European Journal of Urology**, v. 69, n. 3, p. 258-263, 2016. ISSN 2080-4806. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27729991>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

GAO, D. et al. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. **Science**, v. 319, n. 5860, p. 195-8, jan. 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187653>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

GERL, R.; VAUX, D. L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 263-70, fev. 2005. ISSN 0143-3334. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375012>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

GOTTLIEB, E.; VANDER HEIDEN, M. G.; THOMPSON, C. B. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 15, p. 5680-9, ago. 2000. ISSN 0270-7306. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10891504>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626-9, jul. 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286356>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HADDAD, N. F. et al. Lycopene and beta-carotene induce growth inhibition and proapoptotic effects on ACTH-secreting pituitary adenoma cells. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62773, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23667519>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HAHN, W. C. Cancer: surviving on the edge. **Cancer Cell**, v. 6, n. 3, p. 215-22, set. 2004. ISSN 1535-6108. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380512>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HANAHAH, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353-64, ago 1996. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HEYWOOD, R. M. et al. A review of the role of stem cells in the development and treatment of glioma. **Acta Neurochirurgica**, v. 154, n. 6, p. 951-69; discussion 969, jun. 2012. ISSN 0942-0940. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22527576>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HOSOKAWA, M. et al. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1675, n. 1-3, p. 113-9, nov. 2004. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15535974>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HOU, L. C. et al. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. **Neurosurgical Focus - Journal of Neurosurgery**, v. 20, n. 4, p. E5, abr. 2006. ISSN 1092-0684. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709036>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HOUBEN, M. P. et al. [Gliomas: the role of environmental risk factors and genetic predisposition]. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v. 149, n. 41, p. 2268-72, out. 2005. ISSN 0028-2162. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16240850>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 107-24, maio 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24310428>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-88, Apr 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001989>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ISHIKAWA, C. et al. Anti-adult T-cell leukemia effects of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 11, p. 2702-12, dez. 2008. ISSN 1097-0215. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798263>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

JACOBSSON, S. O.; FOWLER, C. J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephali cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. **Neurochemistry International**, v. 34, n. 1, p. 49-62, jan. 1999. ISSN 0197-0186. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100196>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

JAMJOOM, A. B. et al. Cervical lymph node metastasis from a glioblastoma multiforme in a child: Report of a case and a review of the literature. **Annals of Saudi Medicine**, v. 17, n. 3, p. 340-3, maio 1997. ISSN 0256-4947. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369737>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

JEON, S. M. et al. Fucoxanthin-rich seaweed extract suppresses body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 9, p. 961-9, set. 2010. ISSN 1860-7314. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20845386>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

JIANG, Y.; UHRBOM, L. On the origin of glioma. **Uppsala Journal of Medical Sciences**, v. 117, n. 2, p. 113-21, maio 2012. ISSN 2000-1967. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348397>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KIM, E. H. et al. Tumor treating fields inhibit glioblastoma cell migration, invasion and angiogenesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 65125-65136, out. 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27556184>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KIM, K. N. et al. Inhibition of tumor growth in vitro and in vivo by fucoxanthin against melanoma B16F10 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 39-46, jan. 2013. ISSN 1872-7077. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228706>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KIM, K. N. Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. **Toxicology In Vitro**, v. 24, n. 6, p. 1648-54, set. 2010. ISSN 1879-3177. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594983>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KIM, K. N. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n. 1-3, p. 369-75, dez. 2010. ISSN 1879-0712. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868674>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KLEIHUES, P. et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 61, n. 3, p. 215-25; discussion 226-9, mar. 2002. ISSN 0022-3069. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895036>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KOTAKE-NARA, E. et al. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 12, p. 3303-6, dez. 2001. ISSN 0022-3166. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739884>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KOTAKE-NARA, E.; TERASAKI, M.; NAGAO, A. Characterization of apoptosis induced by fucoxanthin in human promyelocytic leukemia cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 224-7, jan. 2005. ISSN 0916-8451. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15665492>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KOUL, D. et al. Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN. **Oncogene**, v. 20, n. 46, p. 6669-78, out. 2001. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709701>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KRAJEWSKI, S. et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. **The American Journal of Pathology**, v. 150, n. 3, p. 805-14, mar. 1997. ISSN 0002-9440. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9060818>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Molecular Cancer**, v. 9, p. 135, jun. 2010. ISSN 1476-4598. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20515495>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KUBIATOWSKI, T. et al. Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. **Journal of Neurosurgery**, v. 95, n. 3, p. 480-8, set. 2001. ISSN 0022-3085. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11565871>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KURZ, H. Physiology of angiogenesis. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 50, n. 1-2, p. 17-35, out.-nov. 2000. ISSN 0167-594X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245276>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LACROIX, M. et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **Journal of Neurosurgery**, v. 95, n. 2, p. 190-8, ago. 2001. ISSN 0022-3085. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11780887>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 178-96, mar. 2014. ISSN 1471-0080. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556840>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LEE, W. S. et al. Correction: Bcl-w Enhances Mesenchymal Changes and Invasiveness of Glioblastoma Cells by Inducing Nuclear Accumulation of β -Catenin. **PLoS One**, v. 8, n. 8, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29220841>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LIN, S. H.; KLEINBERG, L. R. Carmustine wafers: localized delivery of chemotherapeutic agents in CNS malignancies. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 8, n. 3, p. 343-59, mar. 2008. ISSN 1744-8328. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18366283>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STETLER-STEVENSON, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 327-36, jan. 1991. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1703045>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LIU, C. et al. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. **Cell**, v. 146, n. 2, p. 209-21, jul. 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737130>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LIU, C. L. et al. Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. **Chemico-Biological Interactions**, v. 182, n. 2-3, p. 165-72, dez. 2009. ISSN 1872-7786. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737546>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LIU, Y. et al. Fucoxanthin Activates Apoptosis via Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway and Suppresses Invasion and Migration by Restriction of p38-MMP-2/9 Pathway in Human Glioblastoma Cells. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 10, p. 2728-2751, out. 2016. ISSN 1573-6903. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27394418>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 19-26, abr. 2000. ISSN 0014-4827. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10739647>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-20, jun. 2016. ISSN 1432-0533. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27157931>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LUN, M. et al. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 105, n. 2, p. 261-73, nov. 2011. ISSN 1573-7373. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512826>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MAEDA, H. et al. Effect of medium-chain triacylglycerols on anti-obesity effect of fucoxanthin. **Journal of Oleo Science**, v. 56, n. 12, p. 615-21, 2007. ISSN 1347-3352. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992001>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MAHVASH, M. et al. Glioblastoma multiforme in children: report of 13 cases and review of the literature. **Pediatric Neurology**, v. 45, n. 3, p. 178-80, set. 2011. ISSN 1873-5150. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824566>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MARTIN, G. S. Cell signaling and cancer. **Cancer Cell**, v. 4, n. 3, p. 167-74, set. 2003. ISSN 1535-6108. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522250>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MARTIN, L. J. Fucoxanthin and Its Metabolite Fucoxanthinol in Cancer Prevention and Treatment. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 4784-98, jul. 2015. ISSN 1660-3397. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26264004>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MATSUMOTO, M. et al. Suppressive effects of the marine carotenoids, fucoxanthin and fucoxanthinol on triglyceride absorption in lymph duct-cannulated rats. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 4, p. 243-9, jun. 2010. ISSN 1436-6215. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888619>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MATSURA, T. et al. Phosphatidylserine peroxidation/externalization during staurosporine-induced apoptosis in HL-60 cells. **FEBS Letters**, v. 524, n. 1-3, p. 25-30, jul. 2002. ISSN 0014-5793. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135736>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MENDES-DE-AGUIAR, C. B. et al. Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 14, p. 3117-25, nov. 2008. ISSN 1097-4547. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18543341>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MENON, M. B. et al. Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 66, n. 12, p. 1041-7, dez. 2009. ISSN 1097-0169. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19743408>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117-34, jun. 2010. ISSN 1573-7039. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490631>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MIKAMI, K.; HOSOKAWA, M. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13763-81, jul. 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820585>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MOREAU, D. et al. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 97-103, jul. 2006. ISSN 1382-6689. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783694>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MUJIC, A. et al. Extracranial metastases of a glioblastoma multiforme to the pleura, small bowel and pancreas. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 677-81, jul. 2006. ISSN 0967-5868. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815020>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 3, p. 213-9, 2006. ISSN 1176-6344. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17326328>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

NISHINO, H. et al. Carotenoids in cancer chemoprevention. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 21, n. 3-4, p. 257-64, 2002. ISSN 0167-7659. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12549764>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Science**, v. 100, n. 12, p. 2235-41, dez. 2009. ISSN 1349-7006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737147>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

OKUZUMI, J. et al. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. **Cancer Letters**, v. 55, n. 1, p. 75-81, nov. 1990. ISSN 0304-3835. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2245414>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

OLIVEIRA, K. A. et al. Atorvastatin Promotes Cytotoxicity and Reduces Migration and Proliferation of Human A172 Glioma Cells. **Molecular Neurobiology**, fev. 2017. ISSN 1559-1182. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28181188>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. suppl_5, p. v1-v88, nov. 2017. ISSN 1523-5866. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29117289>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

OSTROM, Q. T. Epidemiology of gliomas. **Cancer Treatment and Research**, v. 163, p. 1-14, 2015. ISSN 0927-3042. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25468222>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

PAW, I. et al. Mechanisms regulating glioma invasion. **Cancer Letters**, v. 362, n. 1, p. 1-7, jun. 2015. ISSN 1872-7980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25796440>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

PENG, J. et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 1806-28, 2011. ISSN 1660-3397. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22072997>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

POTTER, J. D. Cancer prevention: epidemiology and experiment. **Cancer Letters**, v. 114, n. 1-2, p. 7-9, mar. 1997. ISSN 0304-3835. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103244>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

PUCCI, B.; KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cell cycle and apoptosis. **Neoplasia**, v. 2, n. 4, p. 291-9, 2000 Jul-Aug 2000. ISSN 1522-8002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005563>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

RAZA, S. M. et al. Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. **Neurosurgery**, v. 51, n. 1, p. 2-12; discussion 12-3, Jul 2002. ISSN 0148-396X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12182418>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

REIFENBERGER, G. et al. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 6, p. 1342-50, set. 2012. ISSN 1097-0215.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22139906>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

RENGARAJAN, T. et al. Cancer preventive efficacy of marine carotenoid fucoxanthin: cell cycle arrest and apoptosis. **Nutrients**, v. 5, n. 12, p. 4978-89, dez. 2013. ISSN 2072-6643. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24322524>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ROBERT, M.; WASTIE, M. Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**, v. 4, n. 1, p. e3, jan. 2008. ISSN 1823-5530. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21614314>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008. ISSN 1553-4006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039143>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ROJANI, A. M.; DOROVINI-ZIS, K. Glomeruloid vascular structures in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical and ultrastructural study. **Journal of Neurosurgery**, v. 85, n. 6, p. 1078-84, dez. 1996. ISSN 0022-3085. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929498>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

RWIGEMERA, A.; MAMELONA, J.; MARTIN, L. J. Comparative effects between fucoxanthinol and its precursor fucoxanthin on viability and apoptosis of breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. **Anticancer Research**, v. 35, n. 1, p. 207-19, jan. 2015. ISSN 1791-7530. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550553>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SATOMI, Y.; NISHINO, H. Implication of mitogen-activated protein kinase in the induction of G1 cell cycle arrest and gadd45 expression by the carotenoid fucoxanthin in human cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 4, p. 260-6, abr. 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19714865>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SCHNEIDER, T. et al. Gliomas in adults. **Dtsch Arztebl Int**, v. 107, n. 45, p. 799-807; quiz 808, Nov 2010. ISSN 1866-0452. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124703>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SCHULTZ, S. et al. Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. **Cytojournal**, v. 2, p. 19, nov. 2005. ISSN 1742-6413. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287502>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SCHWARTZBAUM, J. A. et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature Clinical Practice Neurology** v. 2, n. 9, p. 494-503; quiz 1 p following 516, set. 2006. ISSN 1745-834X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16932614>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 103-12, ago 2002. ISSN 1535-6108. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204530>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SHIMODA, H. et al. Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 9, p. 1137-45, set. 2010. ISSN 2042-7158. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20796192>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SHO, H. History and characteristics of Okinawan longevity food. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 159-64, 2001. ISSN 0964-7058. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710358>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SIEBZEHRUBL, F. A. et al. The origins of glioma: E Pluribus Unum? **Glia**, v. 59, n. 8, p. 1135-47, ago. 2011. ISSN 1098-1136. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351156>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, n. 5, p. 415-8, nov. 2000. ISSN 1360-8185. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256882>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396-401, nov. 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15549107>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SODA, Y. et al. Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 11, p. 4274-80, mar. 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21262804>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SPINELLI, V. et al. Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. **Presse Medicale**, v. 39, n. 2, p. e35-44, fev. 2010. ISSN 2213-0276. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962851>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

STUPP, R.; VAN DEN BENT, M. J.; HEGI, M. E. Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 5, n. 3, p. 198-206, maio 2005. ISSN 1528-4042. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15865885>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SUGAWARA, T. et al. Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco-2 human intestinal cells and mice. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 946-51, maio 2002. ISSN 0022-3166. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983819>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

TAKAHASHI, K. et al. Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues. **Oncology Letters**, v. 10, n. 3, p. 1463-1467, set. 2015. ISSN 1792-1074. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26622691>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

TAKAICHI, S. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 1101-18, 2011. ISSN 1660-3397. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747749>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3202-42, mar. 2012. ISSN 1420-3049. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418926>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231-41, mar. 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073771>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

TONN, J. C.; GOLDBRUNNER, R. Mechanisms of glioma cell invasion. **Acta Neurochirurgica Supplement**, v. 88, p. 163-7, 2003. ISSN 0065-1419. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14531574>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

TURLEY, E. A. et al. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? **Nature Reviews Clinical Oncology** v. 5, n. 5, p. 280-90, maio 2008. ISSN 1743-4262. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349857>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

TYSNES, B. B.; MAHESPARAN, R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 53, n. 2, p. 129-47, jun. 2001. ISSN 0167-594X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716066>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

URBAŃSKA, K. et al. Glioblastoma multiforme - an overview. **Contemporary Oncology**, v. 18, n. 5, p. 307-12, 2014. ISSN 1428-2526. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25477751>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

VERDECCHIA, A.; DE ANGELIS, G.; CAPOCACCIA, R. Estimation and projections of cancer prevalence from cancer registry data. **Statistics in Medicine**, v. 21, n. 22, p. 3511-26, nov. 2002. ISSN 0277-6715. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407687>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

VERHAAK, R. G. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, jan. 2010. ISSN 1878-3686. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129251>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WALLACE, C. J.; FORSYTH, P. A.; EDWARDS, D. R. Lymph node metastases from glioblastoma multiforme. **American Journal of Neuroradiology**, v. 17, n. 10, p. 1929-31, 1996, nov.-dez. 1996. ISSN 0195-6108. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8933881>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WANG, L. et al. Fucoxanthin induces growth arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells by up-regulation of p21 and down-regulation of mortalin. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 10, p. 877-84, out. 2014. ISSN 1745-7270. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187415>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WARGOVICH, M. J. Experimental evidence for cancer preventive elements in foods. **Cancer Letters**, v. 114, n. 1-2, p. 11-7, mar. 1997. ISSN 0304-3835. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103245>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WIDJAJA, A. et al. Uncommon metastasis of a glioblastoma multiforme in liver and spleen. **Digestion**, v. 61, n. 3, p. 219-22, 2000. ISSN 0012-2823. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773729>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WINKLER, E. A.; BELL, R. D.; ZLOKOVIC, B. V. Central nervous system pericytes in health and disease. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1398-405, out. 2011. ISSN 1546-1726. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22030551>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

WRENSCH, M. et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro Oncology**, v. 4, n. 4, p. 278-99, out. 2002. ISSN 1522-8517. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12356358>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

XIANG, S. et al. Fucoxanthin inhibits β -amyloid assembly and attenuates β -amyloid oligomer-induced cognitive impairments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 20, p. 4092-4102, maio 2017. ISSN 1520-5118. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28478680>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

YAMAMOTO, K. et al. Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. **Cancer Letters**, v. 300, n. 2, p. 225-34, jan. 2011. ISSN 1872-7980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21078541>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

YAN, X. et al. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 605-7, mar. 1999. ISSN 0916-8451. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227153>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

YANCOPOULOS, G. D. Clinical application of therapies targeting VEGF. **Cell**, v. 143, n. 1, p. 13-6, out. 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20887885>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

YE, G. et al. Fucoxanthin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa via PI3K/Akt pathway. **Tumour Biology**, v. 35, n. 11, p. 11261-7, nov. 2014. ISSN 1423-0380. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25113250>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

YU, R. X. et al. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 657, n. 1-3, p. 10-9, abr. 2011. ISSN 1879-0712. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187083>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ZHANG, H. et al. Fucoxanthin: a promising medicinal and nutritional ingredient. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 723515, 2015. ISSN 1741-427X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26106437>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ZHANG, Z. et al. Potential chemoprevention effect of dietary fucoxanthin on urinary bladder cancer EJ-1 cell line. **Oncology Reports**, v. 20, n. 5, p. 1099-103, nov. 2008. ISSN 1021-335X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949407>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

ZIEGLER, D. S.; KUNG, A. L.; KIERAN, M. W. Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 3, p. 493-500, jan. 2008. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202424>>. Acesso em: 15 jan. 2018.