



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

INGRID ALESSANDRA VICTORIA WOLIN

Ação antitumoral das lectinas DrfL I e ConBr via ativação de caspases e autofagia: potencial aplicação em estudos e terapia de gliomas.

FLORIANÓPOLIS

2021

INGRID ALESSANDRA VICTORIA WOLIN

Ação antitumoral das lectinas DrfL I e ConBr via ativação de caspases e autofagia: potencial aplicação em estudos e terapia de gliomas.

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

FLORIANÓPOLIS

2021

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

Wolin, Ingrid Alessandra Victoria

Ação antitumoral das lectinas DrfL I e ConBr via ativação de caspases e autofagia: potencial aplicação em estudos e terapia de gliomas. / Ingrid Alessandra Victoria Wolin ; orientador, Rodrigo Bainy Leal, 2021.

274 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Lectinas de leguminosas. 3. Sinalização celular. 4. Mecanismos de morte celular. 5. Glioma. I. Leal, Rodrigo Bainy. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

INGRID ALESSANDRA VICTORIA WOLIN

**Ação antitumoral das lectinas DrfL I e ConBr via ativação de caspases e autofagia:
potencial aplicação em estudos e terapia de gliomas.**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves –
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Ricardo Castilho Garcez
Universidade Federal de Santa Catarina

Carla Inês Tasca
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Dra. Manuella P. Kaster
Coordenadora do Programa

Dr. Rodrigo Bainy Leal
Orientador

Florianópolis, 25 de agosto de 2021

*Dedico este trabalho a meu maior tesouro,
minha Família*

AGRADECIMENTOS

Quando você se propõe fazer coisas na vida que se convertem em um desafio pessoal mais que qualquer outro tipo de meta, a satisfação é infinita. E com certeza, o processo de doutoramento, foi mais que um desafio pessoal. Porém, o melhor repto enfrentando, mas não sozinha. Neste caminho sempre estive acompanhada de pessoas maravilhosas e muito importantes que me auxiliaram de diversas formas. Por esse motivo, quero aproveitar este espaço para fazer-lhes partícipe desta alegria e agradecer a todas as pessoas que formaram parte deste caminho percorrido. Embora o fato de exibir uma lista de pessoas e/ou entidades carrega um risco de esquecer algumas, mas gostaria de fazer uma menção especial:

Ao Professor Dr. Rodrigo Bainy Leal por me possibilitar trabalhar no seu laboratório, concedendo a execução deste trabalho. Pelos ensinamentos que contribuíram para o meu progresso e por seus conselhos diários.

Aos meus colegas do laboratório Neuroquímica 3, em especial Ana Paula, Rodrigo, Priscilla e Maria Eduarda pelo acompanhamento nos experimentos e diversas discussões: bibliográficas, metodológicas e até filosóficas, que com certeza foram muito importantes na realização deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório Neuroquímica 4 e ao Laboratório de Biologia de Gliomas, pelo café, conversas no corredor, auxílio com as culturas primárias, ceder as culturas de GBM-1 e várias trocas de ideias. Fazendo uma menção especial às professoras Dra. Carla Tasca e Dra. Cláudia Nedel, coordenadoras estes laboratórios e colaboradoras importantíssimas na realização deste trabalho. O fornecimento das culturas primárias de Glioblastoma (GBM-1) e de astrócitos nos permitiu comprovar o efeito citotóxico das lectinas em gliomas e ausência de estresse em astrócitos corticais.

Muito obrigada ao professor Dr. Ricardo Castilho Garcez (coordenador do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual) que desde a minha primeira qualificação de mestrado, sempre contribuiu muito na realização deste trabalho como membro das bancas avaliadoras. E ao professor Alfeu Zanotto-Filho (coordenador do Lab Cancer) pela coautoria no primeiro artigo desta tese, e todas as contribuições realizadas no trabalho; e por fim, pela orientação frustrada pela pandemia.

Aos Professores Dr. Benildo Sousa Cavada, Dra Kyria Santiago Nascimento e seus alunos do Laboratório de Biologia Molecular, pela purificação das lectinas e trabalhos realizados em parceria.

Ao Anderson Camargo, aluno de doutorado da Professora Dra. Ana Lúcia Rodrigues do programa de Bioquímica, por todos os trabalhos realizados em parcerias. Com vocês

aprendi muito de uma área bem diferente a minha linha de pesquisa, mas pela qual fiquei apaixonada. Obrigada pela oportunidade.

Obrigada ao pessoal do Labcai, em especial ao Jacó por auxiliar na padronização da leitura e análise dos dados da atividade de caspase-3 pelo Kit. E a Dra. Liliana Sousa, do Centro de Microscopia Electronica da Universidad Nacional de Córdoba pelas análises em microscopia eletrônica.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), demais laboratórios, colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica que de diversas formas contribuíram na realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por promover um ótimo ambiente de estudo e trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A Ana Paula, Daniel e Rafaela, colegas de trabalho que se tornaram uma parte muito importante na minha vida!

A minha família: meus pais, Gloria e Victor, por estar sempre me apoiando e brindando amor, educação e por sobretudo serem exemplos de responsabilidade, dignidade e integridade. Sem vocês nada seria igual. Meus irmãos, Julien e Ralph, por sempre estar quando mais os preciso e formar parte de cada etapa da minha vida. Infinitamente abrigada Julien por ter sido o meu técnico informático à distância. A minha Leli e Tia Flaca por sempre estarem presentes...

A minha família de Tango em Florianópolis, em especial a Norma, Florencia e Gustavo. Pelos bonitos momentos compartilhados, por me aconselhar, dar apoio e contenção.

A todos os meus amigos (de infância, do colégio, da graduação) pela parceria nos mais diversos momentos da minha vida; vocês contribuíram muito para a minha formação pessoal e profissional, sempre me esperando com um abraço e um sorriso!

E a você, “Herber”, por ser meu companheiro da vida! Por sempre roubar-me um sorriso nos tempos difíceis e regozije-se com meus logros, incentivando sempre a seguir na frente.

A todos, ¡Muchas Gracias!!! Fueron y serán siempre muy importantes!

RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de glioma mais agressivo. As células de GBM caracterizam-se por apresentarem habilidade de autorenovação e características de células indiferenciadas, conjuntamente com habilidades de ativação de mecanismos de resistência a temozolomida (TMZ – quimioterápico de escolha frente ao GBM) e a radioterapia. O padrão de glicosilação atípico das células tumorais promove ativação de vias de sinalização envolvidas na migração, invasão e proliferação celular. Essas características do tumor, associada à limitada eficiência dos quimioterápicos disponíveis e seus efeitos colaterais, fazem que o prognóstico clínico do GBM seja desfavorável. As lectinas são proteínas que reconhecem e ligam-se reversivelmente a glicanos específicos da superfície celular apresentando inúmeros efeitos biológicos. Nos últimos anos houve um aumento nos estudos de lectinas obtidas de plantas, com destaque nas propriedades antitumorais. O objetivo desse trabalho foi demonstrar a capacidade antitumoral das lectinas isoladas de sementes de leguminosas *Dioclea reflexa* (DrfL I) e *Canavalia brasiliensis* (ConBr) sobre culturas celulares de glioma. Nossos resultados demonstraram que ambas lectinas induziram alterações morfológicas e efeitos citotóxicos sobre culturas de células de glioma das linhagens C6, U-87 MG e GBM1. A ação das lectinas foi dependente da interação com glicanos, sendo o efeito citotóxico aparentemente seletivo para as células tumorais, não alterando a viabilidade e morfologia de astrócitos mantidos em cultura primária. DrfL I e ConBr causaram inibição da migração, adesão, proliferação e sobrevivência das células tumorais, sendo estes efeitos acompanhados da ativação das MAPKs (p38 e JNK (p46/54)), juntamente com inibição de Akt, mTORC1 e a MAPK (ERK1/2). O processo de autofagia foi ativado nas células de GBM, destacado pelo aumento do número de organelas vesiculares ácidas e clivagem da LC3 (Cadeia leve 3 da Proteína 1 associada a Microtúbulos, um marcador de carga do autofagossomo). O inibidor autofágico, 3-methyl-adenine (3-MA), inibiu parcialmente o efeito citotóxico das lectinas. Notavelmente, os inibidores de caspase-8 (IETF-fmk) e JNK (SP600125) conseguiram atenuar a morte celular nas células de GBM tratadas com as lectinas. O tratamento combinado das lectinas com TMZ não promoveu incremento da ação antitumoral quando comparado aos tratamentos individuais. Da mesma forma não acarretaram efeitos aditivos ou sinérgicos sobre a sinalização de MAPKs e Akt. Em síntese, os nossos resultados indicam que as lectinas requerem um domínio de ligação à carboidratos para exercer sua ação antiglioma; a citotoxicidade destas proteínas parece estar associada à ativação do processo de autofagia e ser dependente da ativação de caspase-8. Além disso, pode envolver de forma complexa a modulação das vias de MAPKs e Akt/mTORC1.

Palavras-chaves: câncer, glioma, sistema nervoso central, lectinas de leguminosas, sinalização celular, mecanismo de morte celular.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive type of glioma. GBM cells are characterized by their ability to self-renew and have features of undifferentiated cells, together with the ability to activate mechanisms of resistance to temozolomide (TMZ – the standard chemotherapy agent used as treatment of GBM) and radiotherapy. The atypical glycosylation pattern of tumor cells promotes activation of signaling pathways involved in cell migration, invasion and proliferation. These tumor characteristics, associated with the limited efficiency of available chemotherapies and their side effects, make the clinical prognosis of GBM unfavorable. Lectins are proteins that recognize and bind reversibly to specific glycans on the cell surface, presenting numerous biological effects. In recent years there has been an increase in the studies of lectins obtained from plants, with emphasis on antitumor properties. The objective of this work was to demonstrate the antitumor capacity of lectins isolated from the seeds of the legumes *Dioclea reflexa* (DrfL I) and *Canavalia brasiliensis* (ConBr) on glioma cell cultures. Our results demonstrated that both lectins induced morphological changes and cytotoxic effects on glioma cell cultures of C6, U-87 MG and GBM1 cell lines. The action of the lectins was dependent on the interaction with glycans, and the cytotoxic effect was apparently selective for tumor cells, not altering the viability and morphology of astrocytes maintained in primary culture. DrfL I and ConBr caused inhibition of tumor cell migration, adhesion, proliferation and survival, and these effects were accompanied by activation of MAPKs (p38 and JNK (p46/54)), along with inhibition of Akt, mTORC1 and the MAPK (ERK1/2). The autophagy process was activated in GBM cells, highlighted by increased numbers of acidic vesicular organelles and cleavage of LC3 (Light chain 3 of Microtubule-associated Protein 1, a marker of autophagosome). The autophagic inhibitor, 3-methyladenine (3-MA), partially inhibited the cytotoxic effect of lectins. Notably, the caspase-8 (IETF-fmk) and JNK (SP600125) inhibitors were able to attenuate cell death in GBM cells treated with the lectins. The combined treatment of lectins with TMZ did not promote increased antitumor action when compared to individual treatments. Moreover, they did not entail additive or synergistic effects on MAPKs and Akt signaling. In summary, our results indicate that lectins require a carbohydrate-binding domain to exert their antiglioma action; the cytotoxicity of these proteins seems to be associated with the activation of the autophagy process and to be dependent on the activation of caspase-8. In addition, it may involve in a complex way the modulation of MAPKs and Akt/mTORC1 pathways.

Keywords: cancer, glioma, central nervous system, legume lectins, cell signaling, cell death mechanism.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Akt - Proteína Cinase B
- APAF-1 - Fator Ativador de Protease Apoptótica
- ATCC - American Type Culture Collection
- Atg - Gene relacionado a Autofagia
- BCL – família de proteínas Célula-B de Linfoma 2
- BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- BER - Reparo por Excisão de Bases
- BH - Domínios de Homologia Bcl-2
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- BMF - Fator Modificador de Bcl-2
- BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3)
- BSA - Albumina
- CaBo - Lectina da *Canavalia bonariensis*
- CBTRUS - Central Brain Tumor Registry of the United State/Registro dos tumores cerebrais dos Estados Unidos
- CE – Eficiência Clonogênica
- ConA - Concanavalina A
- ConBr - Lectina da *Canavalia brasiliensis*
- ConM – Lectina da *Canavalia marítima*
- ConV - Lectina da *Canavalia virosa*
- COX-2 - enzima Ciclooxigenase-2
- Cr - Cromatina
- CRD - Domínio não catalítico de Ligação a Carboidratos
- CSC - *cancer stem-like cells*
- CXCR - Receptores de Cimiocinas
- DGL – Lectina da *Dioclea grandiflora*
- DLC2 - Cadeia Ligeira de Dineína 2
- DLL - Lectina da *Dioclea lasiocarpa*
- DlyL - Lectina da *Dioclea lasiophylla*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DO - Densidade Óptica
- DRAM- gene Modulador de Autofagia Regulado por Danos
- DrfL I - Lectina da *Dioclea reflexa*
- DUSP - família de Fosfatase de Dupla Especificidade
- DVL – Lectina da *Dioclea violácea*

ECs - Células Endoteliais

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidermal

ENPP1 – Gene Ectonucleotido Pirofosfatase-Fosfodiesterase

EPM - Erro Padrão da Média

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FLIP - “*FADD-like IL-1 β -converting enzyme*” (FLICE) inhibitory protein

GBM - Glioblastoma Multiforme

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial

GIC – Células Iniciadoras de Glioma

GJC - junções comunicantes *gap*

GSCs - Células-Tronco de Glioma

GSK3 - Glicogênio Sintase Cinase 3

GSTs - *Glutathione S-transferases*

HBSS - Hank's Balanced Salt Solution

HDM2 - Murine Doble Minute 2

Hes3⁺ - *Hes family bHLH transcription factor 3*

HIF2 α - Fator Induzível de Hipóxia

IAP - Inibidor de Proteínas de Apoptose

IARC - Agência Internacional de Pesquisa no Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

IDH1/2 - enzyme isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2

IL- Interleucina

ILK – Cinase Ligada a Integrinas (do inglês *integrin-linked kinase*)

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IP - Iodeto de Propidio

JNK - Jun N-terminal Cinase

LA – Laranja de acridina

LC3-I - Cadeia leve 3 da Proteína 1 associada a Microtúbulos forma I

LC3-II - Cadeia leve 3 da Proteína 1 associada a Microtúbulos forma II

LDH - Lactato Desidrogenase

LIR - Motivo Linear de Interação com LC3 (do inglês “*LC3-interacting region*”)

LOH - Perda da Heterozigose

MAPK - Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno

MB - Membrana Basal

MEC - Matriz Extra Celular

MEFs - Fibroblastos Embrionários de Camundongos
MGMT - Enzima Metil-Guanina-Metil-Transferasa
MLKL - Proteína Cinase de Domínio de Linhagem Mista
mLST8 - *mammalian lethal with SEC13 protein 8*
MMPs - Metaloproteases de Matriz Extracelular
MMR - Reparo mismatch
MTIC - Monometil Triazeno 5-(3-metiltriazeno-1-il)-Imidazol-4-Carboxamida
mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC – Complexo proteico alvo das proteínas mTOR
MTT - sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NEFL - Polipeptídeo de Neurofilamento Leve
NF1 - Gene Supressor do Tumor de Neurofibromatose 1
NFκB - Fator Nuclear kappa B
NSCs – Células tronco neurais
OMG – Organização Mundial da Saúde
OVA – Organelas Vesiculares Ácidas
p53 - Proteína tumoral 53
PARAS - receptores pró-apoptóticos
PBS – Phosphate Buffer Saline
PCL - lectina de *Polygonatum cyrtonema*
PDGFRA - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDK1 - Proteína Cinase Dependente de Fosfoinositol Cinase 1
PH - Domínio de Homologia a Pleckstin
PI3K - Fosfoinositol-3-cinase
PIP2- Fosfatidilinositol 3,4-bifosfato
PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
POL - lectina *Polygonatum odoratum*
PP4C – Proteína fosfatasa com subunidade catalítica 4
PPEF1 – Proteína serin/treonina fosfatasa com mãos EF 1
PPP2R2A – Proteína fosfatasa com subunidade regulatória 2
PRAS40 - Substrato de Akt rico em Prolina de 40 KDa
PS - Fosfatidilserina
PTEN - Fosfatase homóloga a tensina
PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog*
PTPN9 – Proteína Tirosina-fosfatase sem receptor tipo 9

RAS - Proteína Oncogênica p21
Rb - Proteína de Retinoblastoma
RIPK1 - Proteína Cinase 1 de Interação ao Receptor
RIPK3 - Proteína Cinase 3 de Interação ao Receptor
RMSD - Root-mean-square deviation
RMSF - Root-mean-square fluctuation
RTKs - Receptores Tirosina Cinase
SCE - trocas entre cromátides irmãs
SDF1 - *Cell-Derived Fator-1*
SFB - Soro Fetal Bovino
SNC – Sistema Nervoso Central
SYT-1 - Sinaptotagmina 1
TAD – Dominio trans-ativação N-terminal da p53
TAM - Macrófagos Associados ao Tumor
TBS - Solução Salina Tamponada com Tris
TBS T - Solução Salina Tamponada com Tris e Tween20
TCA - Ácidos Tricarboxílicos
TMRE - Tetrametilrodamina-Etil-Ester
TMZ – Temozolomida
TNF - Fator de Necrose Tumoral
VEGF - Fator de Crescimento Vascular Endotelial
ZSG – Zona Subgranular
ZSV – Zona Subventricular
 $\Delta\Psi_m$ - Potencial de Membrana Mitocondrial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do processo de carcinogênese.	36
Figura 2. Mecanismos bioquímico do processo de apoptose.	48
Figura 3. Ativação do processo de Anoikis pelas vias apoptóticas extrínseca e intrínseca.	52
Figura 4. Mecanismo bioquímico do processo de autofagia.	56
Figura 5. Mecanismo bioquímico da Necroptose.	60
Figura 6. Distribuição dos tumores cerebrais e outros tumores do SNC. Total de 5 anos = 415.411 por 100.000 habitantes; média anual de casos = 83.082.	61
Figura 7. Representação esquemática do microambiente tumoral dos gliomas.	67
Figura 8. Estrutura cristalográfica da lectina isolada de sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) complexada com o ácido alfa-aminobutírico.	79
Figura 9. Estrutura cristalográfica da lectina isolada de sementes de <i>Dioclea reflexa</i> (DrFL) complexada com X-man.	80
Figura 10. Desenho experimental do pré-tratamento com os inibidores a fim de avaliar a importância do processo do processo de autofagia, ativação da caspase-8 e modulação das MAPKs (ERK e JNK) na viabilidade celular.	93
Figura 11. Desenho experimental do pré-tratamento com 200 µM de TMZ a fim de avaliar ação sinérgica diminuição da viabilidade celular.	94
Figura 12. Comparação da perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular em modelos celulares tratados com ConBr.	109
Figura 13. Perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular nas células C6 de glioma pelo tratamento com ConBr.	111
Figura 14. Perda de integridade de membrana plasmática nas células C6 de glioma produto do tratamento com ConBr.	112
Figura 15. O tratamento com ConBr possui efeito citostático nas células C6 de glioma diminuindo a capacidade de migração celular no poço de transwell.	115
Figura 16. O tratamento com ConBr possui efeito citostático sobre as tumoresferas da linhagem U-87 MG diminuindo a capacidade de migração/adesão celular no poço da placa.	117
Figura 17. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da ConBr nas células C6 de glioma é dependente das vias de sinalização JNK e ERK.	118
Figura 18. O incremento da incorporação de IP nas células C6 de glioma produto do tratamento com ConBr não foi equivalente à marcação de Anexina-V-FITC.	121
Figura 19. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da ConBr nas células C6 de glioma é dependente da ativação de Caspase-8.	123
Figura 20. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da ConBr nas células C6 de glioma não interfere no potencial de membrana mitocondrial.	124
Figura 21. Aumento da marcação de organelas vesiculares ácidas (OVA) nas células C6 de glioma pelo tratamento com ConBr.	125
Figura 22. O mecanismo de ação da ConBr envolve diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio nas células C6.	127
Figura 23. Aumento da formação de organelas vesiculares ácidas (OVA) nas células C6 de glioma tratadas com 30 µg/mL de ConBr.	128
Figura 24. O tratamento das células C6 com ConBr produz um mecanismo de crosstalk entre a ativação de caspase-8 e degradação autofágica.	129
Figura 25. O tratamento das células C6 com ConBr produz um mecanismo de crosstalk entre a ativação de caspase-8 e degradação autofágica.	130
Figura 26. O tratamento com ConBr alterou a viabilidade celular das células GBM1.	133
Figura 27. O tratamento com ConBr possui efeito citostático sobre as células GBM1, diminuindo a capacidade de migração celular.	135
Figura 28. O tratamento com ConBr não alterou a viabilidade de astrócitos em cultura primária.	137

<i>Figura 29. Estrutura de N-glicanos presentes em MMP-1 de células normais.</i>	138
<i>Figura 30. Estrutura de N-glicanos presentes em MMP-1 de células tumorais.</i>	139
<i>Figura 31. A lectina ConBr interage com MMP-1 via glicanos de superfície.</i>	141
<i>Figura 32. Gráfico RMSD dos sistemas MMP1-ConA e MMP1-ConBr.</i>	142
<i>Figura 33. Gráfico RMSD dos sistemas ConA, MMP1-ConA, ConBr e MMP1-ConBr.</i>	143
<i>Figura 34. Gráfico RMSD do sistema MMP-1, MMP1-ConA e MMP1-ConBr.</i>	143
<i>Figura 35. Gráfico RMSD referente ao glicanos de MMP1 nas simulações.</i>	144
<i>Figura 36. Gráfico de RMSF referente aos sistemas considerando apenas ConA.</i>	145
<i>Figura 37. Gráfico de RMSF referente aos sistemas considerando apenas ConBr.</i>	145
<i>Figura 38. Gráfico de RMSF referente aos sistemas envolvendo ConA e ConBr interagindo com MMP-1.</i>	146
<i>Figura 39. Gráfico de RMSF referente aos sistemas considerando apenas MMP1.</i>	147
<i>Figura 40. RMSF do Glicano de MMP1 em todas as simulações.</i>	148
<i>Figura 41. Número de ligações de hidrogênio entre ConA e MMP1 durante a simulação.</i>	149
<i>Figura 42. Número de ligações de hidrogênio entre ConBr e MMP1 durante a simulação.</i>	149
<i>Figura 43. Representação esquemática dos efeitos da ConBr nas células de glioma C6.</i>	158
<i>Figura 44. Perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular nas células de glioma produto do tratamento com DrfL I.</i>	163
<i>Figura 45. A perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular nas células C6 de glioma pelo tratamento com DrfL I é dependente do tempo e concentração.</i>	165
<i>Figura 46. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático nas células C6 de glioma diminuindo a capacidade de migração celular no poço de transwell.</i>	166
<i>Figura 47. DrfL I pode modular diversas vias de sinalização intracelular em células C6 de glioma e a diminuição da viabilidade celular promovida pela lectina pode depender da sinalização de JNK e ERK.</i>	168
<i>Figura 48. O incremento da incorporação de Iodeto de Propídeo nas células C6 de glioma produto do tratamento com DrfL I não foi equivalente à marcação de Anexina-V-FITC.</i>	171
<i>Figura 49. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da DrfL I nas células C6 de glioma pode ser dependente da ativação de Caspase-8.</i>	173
<i>Figura 50. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da DrfL I nas células C6 de glioma não interfere no potencial de membrana mitocondrial.</i>	174
<i>Figura 51. Aumento da formação de organelas vesiculares ácidas (OVA) nas células C6 de glioma tratadas com 30 µg/mL de DrfL I.</i>	175
<i>Figura 52. O mecanismo de ação da DrfL I pode envolver a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio nas células C6.</i>	176
<i>Figura 53. O mecanismo de ação da DrfL I para levar a morte nas células C6 de glioma pode ser dependente do fluxo de formação do autofagolisosomo.</i>	178
<i>Figura 54. Perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular nas células U-87 MG de glioma produto do tratamento com DrfL I.</i>	180
<i>Figura 55. A ação citotóxica da lectina DrfL I nas células U-87 MG de glioma é dependente da integridade da proteína e do seu domínio de ligação a carboidratos (CRD).</i>	181
<i>Figura 56. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático nas células U-87 MG de glioma diminuindo a capacidade de migração celular no poço de transwell.</i>	183
<i>Figura 57. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático sobre as tumoresferas da linhagem U-87 MG diminuindo a capacidade de migração/adesão celular.</i>	185
<i>Figura 58. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático nas células U-87 MG de glioma diminuindo a eficácia clonogênica das células.</i>	187
<i>Figura 59. O tratamento com DrfL I nas células U-87 MG de glioma incrementa a fosforilação de JNK e p38^{MAPK}, enquanto diminui a fosforilação de Akt e ERK.</i>	189
<i>Figura 60. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da DrfL I nas células U-87 MG de glioma é dependente da ativação de Caspase-8.</i>	192
<i>Figura 61. O mecanismo de ação da DrfL I para levar a morte nas células U-87 MG de glioma é dependente da ativação do processo autofágico.</i>	194

<i>Figura 62. A DrfL I nas células U87 produz um mecanismo de crosstalk entre a ativação de caspase-8 e degradação autofágica.</i>	196
<i>Figura 63. O tratamento com DrfL I alterou a viabilidade celular e induziu a formação de organelas vesiculares ácidas nas células GBM1.</i>	199
<i>Figura 64. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático nas células GBM1.</i>	201
<i>Figura 65. O tratamento com DrfL I não alterou a viabilidade de astrócitos sadios de cultura primária.</i>	202
<i>Figura 66. Representação esquemática dos efeitos da DrfL I nas células de glioma U-87 MG.</i>	210
<i>Figura 67. Avaliação do efeito citotóxico da TMZ sobre as células C6 e U-87 MG.</i>	215
<i>Figura 68. Comparação do efeito citotóxico da TMZ e as lectinas sobre as células C6.</i>	217
<i>Figura 69. Comparação do efeito citotóxico da TMZ e as lectinas sobre as células U-87 MG.</i>	219
<i>Figura 70. Avaliação do efeito na viabilidade celular das células C6 frente ao tratamento combinado de TMZ com as lectinas.</i>	221
<i>Figura 71. Mecanismo de ação do tratamento combinado de 200 μM e a lectina ConBr nas células C6.</i>	222
<i>Figura 72. Mecanismo de ação do tratamento combinado de 200 μM e a lectina DrfL I nas células C6.</i>	225
<i>Figura 73. Mecanismo de ação do tratamento combinado de 200 μM e a lectina DrfL I nas células U87.</i>	227

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Efeitos das caspase na ativação do processo autofágico.</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 2. Classificação das lectinas vegetais em função dos seus domínios.</i>	<i>73</i>
<i>Tabela 3. Classificação das lectinas vegetais com base na sua sequencia estrutural.</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 4- Relação de reagentes utilizados.</i>	<i>89</i>
<i>Tabela 5- Relação de anticorpos utilizados no ensaio de Western blot</i>	<i>103</i>
<i>Tabela 6. Pontuações das energias de ligação/interação otidas no Docking molecular entre as lectinas ConA, ConBr e os glicanos (ligante) encontrados em MMP-1.</i>	<i>140</i>

ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (2017-2021)

CAMARGO, ANDERSON; DALMAGRO, ANA PAULA; **WOLIN, INGRID A.V.**; KASTER, MANUELLA P.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S.. The resilient phenotype elicited by ketamine against inflammatory stressors-induced depressive-like behavior is associated with NLRP3-driven signaling pathway. **Journal of Psychiatric Research**. v. 144, p. 118-128, 2021.

CAMARGO, ANDERSON; DALMAGRO, ANA PAULA; **WOLIN, INGRID A. V.**; SITENESKI, ALINE; ZENI, ANA LÚCIA B.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. A low-dose combination of ketamine and guanosine counteracts corticosterone-induced depressive-like behavior and hippocampal synaptic impairments via mTORC1 signaling. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 111, p. 110371, 2021.

HEINRICH, ISABELLA A.; FREITAS, ANDIARA E.; **WOLIN, INGRID A. V.**; NASCIMENTO, ANA PAULA M.; WALZ, ROGER; RODRIGUES, ANA LÚCIA S.; LEAL, RODRIGO B. Neuronal activity regulated pentraxin (narp) and GluA4 subunit of AMPA receptor may be targets for fluoxetine modulation. **Metabolic Brain Disease**, v.1, p.s11011-021-0067-, 2021.

WOLIN, INGRID A.V.; HEINRICH, ISABELLA A.; NASCIMENTO, ANA PAULA M.; WELTER, PRISCILLA G.; SOSA, LILIANA DEL V.; DE PAUL, ANA LUCIA; ZANOTTO-FILHO, ALFEU; NEDEL, CLÁUDIA BEATRIZ; LIMA, LARA DIAS; SILVA OSTERNE, VINICIUS JOSE; PINTO-JUNIOR, VANIR REIS; NASCIMENTO, KYRIA S.; CAVADA, BENILDO S.; LEAL, RODRIGO B. ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. **Biochimie**, v.180, p.186 - 204, 2020.

NASCIMENTO, KYRIA S.; ANDRADE, MARIA L.L.; SILVA, IVANICE B.; DOMINGUES, DANIEL L.; CHICAS, LARISSA S.; SILVA, MAYARA T.L.; BRINGEL, PEDRO H.S.F.; MARQUES, GABRIELA F.O.; MARTINS, MARIA G.Q.; LÓSSIO, CLAUDIA F.; NASCIMENTO, ANA PAULA M.; **WOLIN, INGRID A.V.**; LEAL, RODRIGO B.; ASSREUY, ANA M.S.; CAVADA, BENILDO S. Heterologous production of α -chain of Dioclea sclerocarpa lectin: Enhancing the biological effects of a wild-type lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.156, p.1 - 9, 2020.

ROSA, JULIA M.; CAMARGO, ANDERSON; **WOLIN, INGRID A. V.**; KASTER, MANUELLA P.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Physical exercise prevents amyloid β 1-40-induced disturbances in NLRP3 inflammasome pathway in the hippocampus of mice. **Metabolic Brain Disease**, v.2020, p.1 - 9, 2020.

ROSA, JULIA M.; PAZINI, FRANCIS L.; CAMARGO, ANDERSON; **WOLIN, INGRID A.V.**; OLESCOWICZ, GISLAINE; ESLABÃO, LIVIA B.; ROMERO, OSCAR BRUNA; WINKELMANN-DUARTE, ELISA C.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Prophylactic effect of physical exercise on A β 1-40-induced depressive-like behavior and gut dysfunction in mice. **Behavioural Brain Research**, v.393, p.112791, 2020.

- CAMARGO, ANDERSON; PAZINI, FRANCIS L.; ROSA, JULIA M.; **WOLIN, INGRID A.V.**; MORETTI, MORGANA; ROSA, PRISCILA B.; NEIS, VIVIAN B.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Augmentation effect of ketamine by guanosine in the novelty-suppressed feeding test is dependent on mTOR signaling pathway. **Journal of Psychiatric Research**, v.115, p.103 - 112, 2019.
- NASCIMENTO, ANA PAULA M.; **WOLIN, INGRID A.V.**; WELTER, PRISCILLA G.; HEINRICH, ISABELLA A.; ZANOTTO-FILHO, ALFEU; OSTERNE, VINICIUS J.S.; LOSSIO, CLAUDIA F.; SILVA, MAYARA T.L.; NASCIMENTO, KYRIA S.; CAVADA, BENILDO S.; LEAL, RODRIGO B. Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.134, p.660 - 672, 2019.
- TAVARES, MAUREN K.; DOS REIS, SUELLEN; PLATT, NICOLLE; HEINRICH, ISABELLA A.; **WOLIN, INGRID A.V.**; LEAL, RODRIGO B.; KASTER, MANUELLA P.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S.; FREITAS, ANDIARA E. Agmatine potentiates neuroprotective effects of subthreshold concentrations of ketamine via mTOR/S6 kinase signaling pathway. **Neurochemistry International**, v.118, p.275 - 285, 2018.
- NASCIMENTO, ANA PAULA M.; KNAUT, JHÔNATAS L.; RIEGER, DÉBORA K.; **WOLIN, INGRID A.V.**; HEINRICH, ISABELLA A.; MANN, JOSIANE; JUAREZ, ANDREA V.; SOSA, LILIANA DEL V.; DE PAUL, ANA LUCIA; MOREIRA, CLEANE G.; SILVA, IVANICE B.; NOBRE, CLAREANE S.; OSTERNE, VINICIUS J.S.; NASCIMENTO, KYRIA S.; CAVADA, BENILDO S.; LEAL, RODRIGO B. Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.120, p.566 - 577, 2018.
- LEAL, RODRIGO B.; PINTO-JUNIOR, VANIR R.; OSTERNE, VINICIUS J. S.; **WOLIN, INGRID A. V.**; NASCIMENTO, ANA PAULA M.; NECO, ANTONIO H. B.; ARARIPE, D. A.; WELTER, PRISCILLA G.; NETO, CORNEVILLE C.; CORREIA, JORGE L. A.; ROCHA, CINTIA R. C.; NASCIMENTO, KYRIA S.; CAVADA, BENILDO S. Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.114, p.64 - 76, 2018.
- CAVADA, BENILDO S.; SILVA, MAYARA T. L.; OSTERNE, VINICIUS J. S.; PINTO-JUNIOR, VANIR R.; NASCIMENTO, ANA PAULA M.; **WOLIN, INGRID A. V.**; HEINRICH, ISABELLA A.; NOBRE, CLAREANE A. S.; MOREIRA, CLEANE G.; LOSSIO, CLAUDIA F.; ROCHA, CINTIA R. C.; MARTINS, JORGE L.; NASCIMENTO, KYRIA S.; LEAL, RODRIGO B. *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.8130, p.32351 - 32356, 2017.
- NASCIMENTO, KYRIA S.; SANTIAGO, MAYARA Q.; PINTO-JUNIOR, VANIR R.; OSTERNE, VINICIUS J. S.; MARTINS, FRANCISCO W. V.; NASCIMENTO, ANA PAULA M.; **WOLIN, INGRID A. V.**; HEINRICH, ISABELLA A.; MARTINS, MARIA G. Q.; SILVA, MAYARA T. L.; LOSSIO, CLAUDIA F.;

ROCHA, CÍNTIA R. C.; LEAL, RODRIGO B.; CAVADA, BENILDO S. Structural analysis of Dioclea lasiocarpa lectin: a C6 cells apoptosis-inducing protein. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.2725, p.30240 - 30246, 2017.

OSTERNE, VINICIUS J. S.; SILVA-FILHO, JOSE C.; SANTIAGO, MAYARA Q.; PINTO-JUNIOR, VANIR R.; ALMEIDA, ALYSSON C.; BARRETO, ADOLPH A. G. C.; **WOLIN, INGRID A. V.**; NASCIMENTO, ANA PAULA M.; AMORIM, RENATA M. F.; ROCHA, BRUNO A. M.; DELATORRE, PLINIO; NAGANO, CELSO S.; LEAL, RODRIGO B.; ASSREUY, ANA M. S.; NASCIMENTO, KYRIA S.; CAVADA, BENILDO S. Structural characterization of a lectin from Canavalia virosa seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.94, p.271 - 282, 2017.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
2	ESTADO DA ARTE	34
2.1	Câncer	34
2.2	Proteínas cinases na progressão tumoral	39
2.2.1	AKT ou Akt.....	39
2.2.2	mTOR.....	40
2.2.3	MAPKs.....	41
2.3	Mecanismos de morte celular.....	46
2.3.1	Morte celular apoptótica.....	47
2.3.2	Morte celular autofágica.....	53
2.3.3	Necroptose.....	59
2.4	Sinalização celular em Tumores do Sistema Nervoso Central.....	60
2.4.1	Tratamentos.....	67
2.5	Lectinas	72
2.5.1	Atividade antitumoral das lectinas	76
2.5.2	<i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr).....	78
2.5.3	<i>Dioclea reflexa</i> (DrfL I)	79
2.6	Cultura celular e linhagens celulares de câncer.....	80
2.7.1	Linhagem celular C6	82
2.7.2	Linhagem celular U-87 MG	83
2.7.3	Tumoresferas.....	83
3	HIPÓTESE	85
4	OBJETIVOS	85
4.1	Objetivo Geral	85
4.2	Objetivos Específicos.....	85
5	JUSTIFICATIVA.....	87
6	MATERIAIS E MÉTODOS	89
6.1	Isolamento, Diluição e Desnaturação de Lectinas.....	90
6.2	Cultura Celular e Manutenção.....	90
6.3	Tratamentos Realizados nas Culturas Celulares.	92
6.4	Microscopia de Luz.....	95
6.5	Determinação de Viabilidade Celular pelo Método de MTT.....	95
6.6	Ensaio de Microscopia de Fluorescência com Iodeto de Propídio.....	96

6.7	Ensaio de Microscopia de Fluorescência com Laranja de Acridina.....	96
6.8	Microscópio Eletrônico de Transmissão.....	97
6.9	Ensaio de Sobrevivência Clonogênica.....	97
6.10	Ensaio de Migração - “ <i>Scratch</i> ”.....	98
6.11	Ensaio de migração - “ <i>Transwell</i> ”.....	98
6.12	Formação de Tumoresferas e Tratamento.....	99
	Após 24 h, as células foram visualizadas com.....	99
6.13	Ensaio de Anexina-V-FITC e Iodeto de Propídeo por Citometria de Fluxo.....	99
6.14	Medida do Potencial de Membrana Mitocondrial com a Sonda JC-1.....	100
6.15	Análise de Espécies Reativas de Oxigênio.....	101
6.16	Ensaio de Atividade de Caspase-3.....	101
6.17	Western Blot.....	102
6.18	Análise Estatística.....	104
6.19	Docking e dinâmica molecular da interação entre a lectina ConBr e os glicanos da MMP-1	104
	Capítulo 1	107
7	Mecanismo de ação biológica da lectina ConBr sobre linhagens de glioma.....	107
7.1	ConBr induz alterações morfológicas nas células de glioma.....	108
7.2	Mecanismos de ação biológica da lectina ConBr nas células da linhagem C6.....	110
7.2.1	A perda de adesão celular e redução da viabilidade celular das células C6 são dependentes da concentração e tempo de tratamento com ConBr.....	110
7.2.2	A ConBr diminui a capacidade de migração celular nas células C6.....	114
7.2.3	A lectina ConBr modula as vias de sinalização dependentes de MAPKs e Akt nas células C6 de glioma.....	117
7.2.4	A ativação do processo de autofagia e de caspase-8 promovem a morte das células C6 tratadas com ConBr.....	120
7.3	Mecanismos de ação biológica da lectina ConBr nas células GBM1 de glioblastoma humano	132
7.3.1	Os efeitos citotóxicos da ConBr sobre as células GBM1 estão associadas à formação de organelas vesiculares ácidas.....	132
7.3.2	A ConBr diminui a capacidade de migração celular nas células GBM1.....	134
7.4	Avaliação da citotoxicidade da lectina ConBr sobre culturas celulares não tumorais.	136
7.5	ConBr pode interagir com MMP-1.....	138
8	Discussão e conclusão dos resultados obtido no Capítulo I:.....	151
	“Mecanismo de ação biológica da lectina ConBr sobre linhagens de gliomas”.....	151
	Capítulo 2	161

9	Mecanismos de ação biológica da lectina DrfL I sobre linhagens de glioma.	161
9.1	DrfL I induz alterações morfológicas nas células de glioma.	162
9.2	Mecanismo de ação biológica da lectina DrfL I nas células da linhagem C6	164
9.2.1	A perda de adesão celular e redução da viabilidade celular das células C6 são dependentes da concentração e tempo de tratamento com DrfL I.....	164
9.2.2	DrfL I diminui a capacidade de migração celular nas células C6	166
9.2.3	A lectina DrfL I modula as vias de sinalização dependentes de MAPKs e Akt nas células C6 de glioma	167
9.2.4	A ativação de caspase-8 e processos de autofagia promovem a morte das células C6 tratadas com DrfL I	170
9.3	Mecanismo de ação biológica da lectina DrfL I sobre as células da linhagem U-87 MG	179
9.3.1	O efeito da DrfL I nas células U-87 MG é dependente de integridade da proteína além da concentração e tempo de tratamento.	179
9.3.2	A DrfL I possui efeito citostático na capacidade de migração, adesão e eficácia clonogênica das células U-87 MG.....	182
9.3.3	A lectina DrfL I modula as vias de sinalização dependentes de MAPKs e Akt nas células U-87 MG de glioblastoma multiforme humano	187
9.3.4	O mecanismo de ação da DrfL I nas células U-87 MG é dependente de uma rede interconectada entre a ativação das proteínas relacionadas com autofagia e caspases-8.	191
9.4	Mecanismos de ação biológica da lectina DrfL I sobre as células GBM1 de glioblastoma humano	198
9.4.1	A perda de adesão celular e redução da viabilidade celular das células GBM1 estão associadas à formação de organelas vesiculares ácidas	198
9.4.2	A DrfL I diminui a capacidade migratória das células GBM1	199
9.5	Teste de especificidade citotóxica da lectina DrfL I	202
10	Discussão e conclusão dos resultados obtido no Capítulo II:.....	203
	“Mecanismo de ação biológica da lectina DrfL I em modelos celulares”	203
	Capítulo 3	213
11	Ação antitumoral do agente alquilante Temozolomida e seu efeito combinado com as lectinas	213
	ConBr e DrfL I	213
11.1	O tratamento combinado de TMZ com as lectinas altera a viabilidade celular na linhagem C6	220
11.1.1	Mecanismo de ação do tratamento combinado de TMZ e ConBr na linhagem celular C6	221
11.1.2	Mecanismo de ação do tratamento combinado de TMZ e DrfL I na linhagem celular C6	224

11.2	Mecanismo de ação do tratamento combinado de TMZ e DrfL I na linhagem celular U-87 MG	227
12	Discussão e conclusão dos resultados obtido no Capítulo III:	229
	“Ação do agente alquilante Temozolomida e seu efeito combinado com as lectinas ConBr e DrfL I”	229
	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS DA TESE	233
	REFERÊNCIAS	235

1 INTRODUÇÃO

Os tumores primários do sistema nervoso central (SNC) representam de 1,4 a 1,8% dos tumores malignos no mundo, sendo que 88% destes tumores ocorrem no encéfalo. A Sociedade Americana do Câncer (American Cancer Society, 2021) estima que para o ano 2021 pode-se esperar, nos Estados Unidos, 24.530 tumores malignos diagnosticados e 18.600 óbitos, tanto em adultos como em crianças. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2021) indicou que no ano 2019 ocorreram 9.712 óbitos e estimou 11.090 novos casos em 2020.

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de glioma mais agressivo e de maior ocorrência dentre os tumores do SNC, representando 14,6% de todos os tumores e 48,3% dos tumores malignos (OSTROM *et al.*, 2019). As células de GBM caracterizam-se por apresentar mutações genéticas que afetam vias de sinalização celular que concernem à proliferação celular, sobrevivência, invasão e angiogênese (BATASH *et al.*, 2017). A massa tumoral destaca-se por apresentar resistência à quimioterapia e radioterapia, conjuntamente com a presença de células tronco de glioma (“*glioma stem-like cells*”-GSC-) que apresentam a habilidade de autorenovação e características indiferenciadas (CHALMERS *et al.*, 2009; CHEN, LONG *et al.*, 2017; HEYNCKES *et al.*, 2019). Essas características fazem que o prognóstico clínico seja desfavorável, não ultrapassando os 15 meses de vida com terapia, concomitantemente aos devastadores declíneos neurocognitivos (ACHARYA *et al.*, 2010, 2011).

Nos últimos anos se observa um aumento nos estudos de lectinas obtidas de plantas, considerando a evidência de que estas proteínas desencadeiam diversos efeitos biológicos, com destaque nas propriedades antitumorais (AKLA; PRATT; ANNABI, 2012; BHUTIA *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA FIGUEIROA *et al.*, 2017; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; NANNI *et al.*, 2016; PRASANNA; VENKATESH, 2015; PRATT; ANNABI, 2014; XIAO, XIUQING *et al.*, 2015). O fato é relacionado à capacidade das lectinas de reconhecerem e ligarem-se de maneira reversível aos glicanos específicos da superfície celular tumoral (DAWSON; MOSKAL; DAWSON, 2004; HAKOMORI, 2002; LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013; MOSKAL; KROES; DAWSON, 2009; PINHO; REIS, 2015).

Alterações no padrão de glicosilação das células cancerígenas têm se tornado um novo horizonte fármaco-terapêutico. Dessa forma buscou-se investigar se as lectinas ConBr e DrfL I, isoladas de sementes de leguminosas brasileiras, seriam capazes de interagir especificamente com as células de GBM e ativar processos de morte celular reduzindo as

concentrações utilizadas pelos fármacos atuais ou se possuem capacidade adjuvante no tratamento com Temozolomida (TMZ).

Para uma melhor compreensão, esta Tese foi organizada em três capítulos:

Capítulo I: Mecanismo de ação biológica da lectina ConBr em modelos celulares de glioma.

Capítulo II: Mecanismo de ação biológica da lectina DrfL I em modelos celulares de glioma.

Capítulo III: Ação antitumoral do agente alquilante Temozolomida e seu efeito combinado com as lectinas ConBr e DrfL I.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Câncer

O Câncer é uma das principais causas de óbitos e considerado uma das maiores barreiras para aumentar a expectativa de vida em todos os países do mundo. De acordo com as estimativas da Agência Internacional de Pesquisa no Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) no ano de 2018 foi diagnosticado 17 milhões de novos casos de câncer e 9,5 milhões de mortes no mundo. Não obstante, diante da epidemia de COVID-19, declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma emergência de saúde pública e preocupação internacional em 30 de janeiro de 2020 e a seguir, em 11 de março de 2020 como pandemia mundial, a atualização da estatística de óbitos por câncer propriamente ditas foram dificultadas.

A palavra câncer foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates (460-377 a.C) o pai da medicina, o termo deriva do grego “*karkinos*” que quer dizer caranguejo. Apesar de ser considerada uma doença nova, o fato de ter sido observado em múmias egípcias comprova que já comprometia ao homem muito antes do nascimento de Cristo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Segundo o INCA, abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, sendo que estas podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes. De forma geral, os cânceres podem ser classificados segundo o tipo de células e tecidos dos quais se originaram, assim, por exemplo, um tumor originado de células epiteliais é denominado carcinoma, os originados de tecido mesenquimal são sarcomas, os originados a partir da medula óssea são leucemias, a partir das células do sistema linfático são linfomas, os originados nos melanócitos da pele são denominados melanomas. Porém ainda temos todos os tumores originados do SNC (por sua heterogeneidade celular)

que podem ser subdivididos em: gliomas, meningiomas, ependimomas, meduloblastomas, gangliomas, Schwannomas, craniofaringiomas, entre outros, mas que serão abordados com mais detalhes no item 2.3.1 c.

Após muitos estudos e avanços na pesquisa do câncer, hoje se sabe que esta doença envolve uma série de mutações ou alterações genéticas produzindo mudanças dinâmicas no genoma das células que portam mutações nos oncogenes com ganho de funções dominantes e nos genes supressores de tumores com perda recessiva de função (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Tais alterações podem ser resultado tanto de fatores intrínsecos, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA, ou extrínsecos, como danos e instabilidade genética produto de radiação, estilo de vida, substâncias químicas ou infecção viral. Uma única mutação dificilmente leva à formação de um tumor; sendo o acúmulo de modificações genéticas, que irão progressivamente interferindo nos mecanismos responsáveis pela proliferação, diferenciação e morte celular e que acabaram levando a formação do tumor e sua malignidade (TANNOCK *et al.*, 2013). Desse modo, o processo de carcinogênese, ou formação do tumor (Fig. 1) se dá em três etapas:

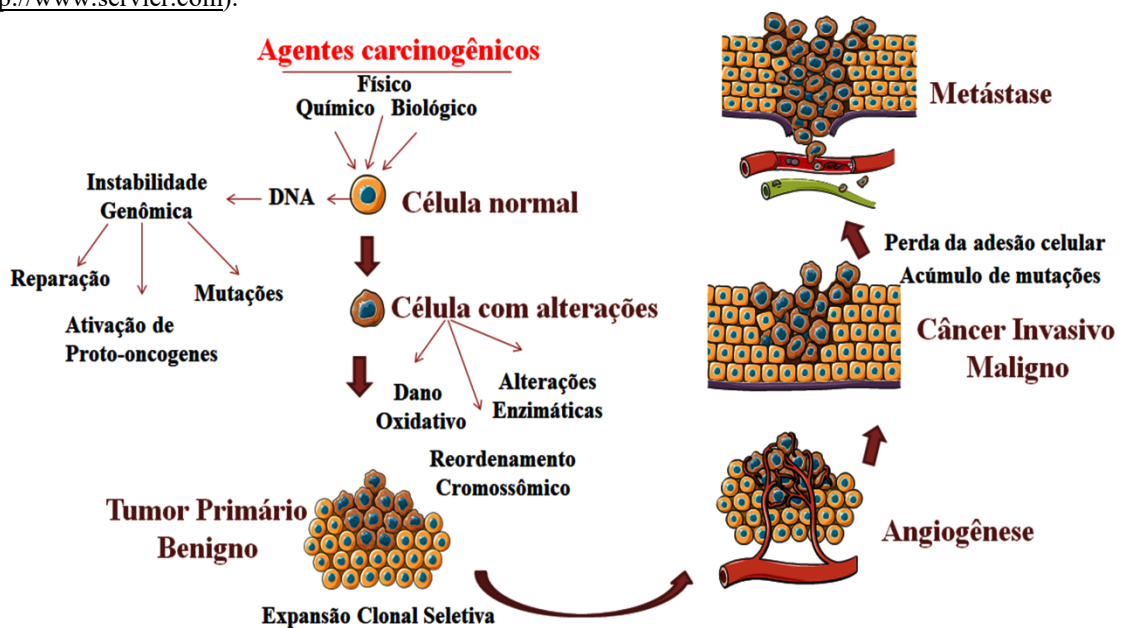
Iniciação: se relaciona à incidência de fatores carcinogênicos que provocam instabilidade genômica alterando a maquinaria de reparo do DNA e ativando proto-oncogenes (responsáveis pela proliferação e crescimento celular). Presume-se que numa célula normal ocorra cerca de 20.000 eventos de alteração do DNA e perto de 10.000 erros de replicação por divisão, assim as mutações que dão lugar ao processo de carcinogênese podem ser inclusive herdadas.

Promoção: nesta etapa as células passam por um processo de transformação lenta e gradual de célula normal para célula maligna ou tumoral. As células caracterizam-se por uma taxa elevada de dano oxidativo, reordenamento cromossômico e alterações enzimáticas.

Progressão: nesta etapa há um ganho de mutações nos proto-oncogenes que são convertidos em oncogenes (sendo um alelo tipo dominante) e que se traduz num aumento da sobrevivência e proliferação celular, não respondendo aos genes supressores do tumor (genes responsáveis de controlar a proliferação, reparo celular e processos de morte celular programada). A fase de progressão do tumor pode ser dividida em duas etapas fisiopatológicas. Neste sentido as neoplasias podem ser divididas em: **1) tumor primário** ou **benigno**, o qual se inicia com uma célula progenitora (célula tronco cancerosa) que forma uma massa de células anormais que crescem e proliferam fora de controle, caracteriza-se por apresentar as mesmas características do tecido onde foi originado e não possuir propriedade invasiva, pelo que pode ser removido com ressecção cirúrgica (se sua localização não for

crítica) tendo, em geral, um prognóstico favorável; **2) tumor maligno** ou **câncer propriamente dito**, no qual as suas células adquiriram capacidade de invadir tecidos adjacentes tornando-se difuso e quase impossível sua erradicação (COOPER, GM (BOSTON UNIVERSITY), 2000; TANNOCK *et al.*, 2013; WEI, Q. *et al.*, 2017).

Figura 1. Etapas do processo de carcinogênese. O diagrama mostra como a exposição a diversos agentes carcinogênicos as células normais ganham mutações transformando-se numa célula cancerígena, que a partir de repetidos ciclos de mutação e proliferação originam clones de células cancerosas malignas. Em cada etapa, as células do clone continuam sofrendo mutações que potencializam a proliferação celular ou diminuem os mecanismos de morte celular programada. A etapa final mostra a invasão de células cancerígenas em tecidos adjacentes e a etapa inicial da metástase. Esta figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com>).



Hanahan e Weinberg (2000) propuseram seis alterações fisiopatológicas fundamentais que governariam a transformação de uma célula normal em cancerígena e que podem ser consideradas como marcadores do câncer, sendo elas: autossuficiência em sinais de proliferação, insensibilidade às sinais inibitórios de crescimento, evasão à morte celular, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase. Entretanto, na sua seguinte revisão enfatizam que as análises que se limitam simplesmente aos distúrbios genéticos das células tumorais, são visões reduzidas ou incompletas, mas que são importantes para a compressão da biologia do câncer. Ressaltam que o câncer deve ser observado como um microambiente tumoral onde interagem células geneticamente alteradas, vasos sanguíneos, células normais (como células do sistema imune, células endoteliais, fibroblastos) e fatores de sinalização celular do microambiente, produzidos localmente ou provenientes da irrigação sanguínea (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Fouad *et al.* em 2017 (FOUAD; AANEI, 2017) fizeram uma revisão dos marcadores de câncer propostos por Hanahan e Weinberg subdividindo os marcadores de câncer em sete. O primeiro seria o crescimento permissivo e a vantagem proliferativa dada pela ativação dos oncogenes e a falta de resposta à inibição do crescimento dada pela inativação dos genes supressores de tumor. O segundo está relacionado à adaptação e alteração da resposta ao estresse como hipóxia, escassez de nutrientes e alterações no DNA que favorecem a sobrevivência e propagação tumoral. Uma das enzimas que vem ganhando interesse nesse sentido são as GSTs (do inglês *Glutathione S-transferases*), que cumprem diversas funções na desintoxicação e proteção celular frente a espécies reativas de oxigênio (ROS) e agentes quimioterápicos (DI PIETRO; MAGNO; RIOS-SANTOS, 2010).

O terceiro marcador proposto por Fouad *et al.* estaria relacionado com o aumento da vascularização e processo de angiogênese relacionada ao crescimento de novos vasos sanguíneos que ajudam no suprimento de oxigênio e nutrientes (FOUAD; AANEI, 2017). A hipóxia ativa o suprimento de sangue pelo aumento do nível do fator induzível de hipóxia (HIF-1 α) (CHEN, CHU; LOU, 2017; LE MERCIER *et al.*, 2010; ZHU, LEI; QI; HOU, 2019) que ativa a transcrição de genes que codificam fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (CHEN, WEN-LIANG *et al.*, 2015; GOFFART; KROONEN; ROGISTER, 2013), envolvido na brotação, divisão celular, migração e montagem das células endoteliais (ECs) de vasos pré-existentes para irrigar o tumor (BENDAS; BORSIG, 2012; ROY, DEBARUN *et al.*, 2016).

A quarta característica mais conhecida e relacionada com o processo de angiogênese é a capacidade de espalhar-se e invadir tecidos circundantes, processo conhecido como metástase. A metástase é a etapa responsável por 90% dos óbitos associadas a tumores sólidos (JIANG, W.G. *et al.*, 2015; TALMADGE; FIDLER, 2010). O desenvolvimento deste processo envolve várias etapas: invasão da matriz extracelular (MEC), membrana basal (MB) e as células do estroma; atravessar a vasculatura tumoral; sobreviver ao transporte na circulação, extravasar no parênquima de órgãos distantes; aderir-se a uma MEC diferente, sobreviver e manipular o novo microambiente para formar primeiramente, micrometástases podendo se transformar em macrometástases (OH, YOU-TAKE; SUN, 2021; RESENDE *et al.*, 2016). Esta migração e invasão das células tumorais são consequência da ação de enzimas proteolíticas ou proteases que degradam a MEC, sendo as mais estudadas as metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) (AROUI *et al.*, 2016; PROULX-BONNEAU; PRATT; ANNABI, 2011; RESENDE *et al.*, 2016).

As metaloproteases de matriz (MMPs, do inglês *Matrix metalloproteinases*) representam uma família de 23 enzimas, endoproteases, dependentes de zinco que atuam sobre a MEC e proteínas de superfície celular promovendo a remodelação da matriz, regulação da atividade enzimática, liberação de fatores de crescimento mitogênicos e moléculas bioativas. Por isso, as MMPs representam proteínas reguladoras chaves no controle da proliferação, migração e diferenciação celular (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; CUI; HU; KHALIL, 2017; LEVIN *et al.*, 2017). Diversos membros da família das MMPs têm sido demonstrados envolvidos na progressão e invasão tumoral. Como por exemplo, as MMP-1, MMP-2, MMP-9 e a MMP de membrana tipo 1 (MT1-MMP ou também conhecida como MMP-14) as quais têm sido envolvidas nas propriedades de migração e invasão das células cancerígenas, bem como no maior grau de malignidade e piores resultados na clínica (HAGEMANN, 2012; STOJIC *et al.*, 2008; TUNG *et al.*, 2016).

A quinta característica das células cancerígenas está relacionada com a reprogramação metabólica a fim de superar estas restrições nutricionais, envolvendo adaptações metabólicas que conferem vantagem de absorção de nutrientes a partir de glicose e aminoácidos, mediante a utilização de intermediários da glicólise e do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA), favorecendo a sobrevivência, proliferação e agressividade das células tumorais (DARD *et al.*, 2018; MORI *et al.*, 2016; OGUNRINU; SONTHEIMER, 2010; TANNOCK *et al.*, 2013).

As sexta e sétima características encontram-se relacionadas com as alterações do microambiente e a modulação da resposta imune. Assim, o microambiente de tumores sólidos é um meio complexo que inclui pH ácido, flutuações dos níveis de nutrientes, de fatores de crescimento e oxigênio, estimulando uma comunicação parácrina entre as células cancerígenas e o estroma para criar um ambiente dinâmico em todos os estágios (BIRBRAIR, 2017; DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016). Conjuntamente com isso, ocorre uma modulação na resposta imune, permitindo a fuga e adaptação de alguns clones (com alterações genéticas e epigenéticas) que conseguem evitar a detecção e eliminação imune. Por outro lado, as células tumorais podem exercer um efeito citotóxico sobre as células do sistema imune, por secretar fatores imunossupressores ou recrutar células imunossupressoras no microambiente tumoral (MALLADI *et al.*, 2016; WELTE *et al.*, 2016).

Entre os principais tratamentos utilizados na atualidade frente às neoplasias estão a ressecção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, hormônio terapia, terapia de fotorradiação e imunoterapia (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012; LIU, JINSHA; PANDYA; AFSHAR, 2021; MARSHALL, 2017). Contudo, apesar dos grandes avanços tanto na compreensão da doença quanto na sua terapia, o câncer continua sendo uma das principais

causas de óbitos e considerado uma das maiores barreiras para aumentar a expectativa de vida em todos os países do mundo.

A partir dessas considerações iniciais, a seguir serão apresentadas e descritas brevemente algumas das vias de sinalização relacionadas ao processo de carcinogênese, bem como sua importância como alvo terapêutico.

2.2 Proteínas cinases na progressão tumoral

2.2.1 AKT ou Akt

A proteína Akt, também conhecida como proteína cinase B ou RAC-PK, foi descoberta e classificada como um oncogene traduzido pelo retrovírus transformador murino (AKT-8), isolado originalmente de linhagens de células tumorais estabelecidas a partir de tumores espontâneos, oriundos de camundongos AKR, uma linhagem altamente suscetível à leucemia (HENNESSY *et al.*, 2005; STAAL, 1987; YAP *et al.*, 2008).

Akt é uma serina/treonina proteína cinase localizada no ápice de uma cascata de sinalização envolvida no crescimento, proliferação e sobrevivência das células. Pertence a uma família de proteínas constituída por três isoformas denominadas AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) e AKT 3 (PKB γ), que apresentam 80% de homologia na sua estrutura primária. Cada isoforma é composta por três domínios: um domínio de homologia a pleckstin (PH) na região N-terminal, que contém aproximadamente 100 aminoácidos e que interage com fosfoinositol lipídeos fosfatados na posição 3 do inositol (PIP3); um domínio central de cinase, que contém o resíduo treonina 308 (Thr308); um domínio regulador na região C-terminal, com o motivo hidrofóbico que contém o segundo sítio de fosforilação no resíduo de serina 473 (Ser473), fundamental na atividade de Akt (HENNESSY *et al.*, 2005; MANNING; TOKER, 2017; MURTHY *et al.*, 2000; YANG, Z.-Z *et al.*, 2004; YAP *et al.*, 2008).

A fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) é uma enzima ativada via receptores tirosina cinase (RTKs) em resposta à vários fatores de crescimento, gerando o segundo mensageiro fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir do substrato fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP2). Uma vez formado, PIP3 funciona como um ligante de alta afinidade às proteínas com domínio PH, como PDK1 (proteína cinase dependente de fosfoinositol cinase 1) e Akt, para recrutá-las à superfície interna da membrana celular. Este processo permite a ativação de PDK1 e mTORC2, que fosforilam e ativam Akt (ERSAHIN; TUNCBAG; CETIN-ATALAY, 2015; HENNESSY *et al.*, 2005; MANNING; TOKER, 2017; YAP *et al.*, 2008).

Portanto, a ligação da proteína Akt ao PIP3 é a etapa chave na taxa de ativação de Akt, provocando uma mudança conformacional na proteína que propicia a fosforilação de

Thr308 no domínio catalítico da enzima, pela PDK1. Após a fosforilação do seu sítio ativo, para ser ativada Akt precisa da fosforilação na sua cauda hidrofóbica C-terminal (Ser473) mediada pela mTORC2. Uma vez ativada, Akt é translocada ao citosol e núcleo fosforilando vários substratos, entre eles factores de transcrição da família FOXO, bem como as enzimas GSK3 (glicogênio sintase cinase 3) e mTORC1, envolvidos na regulação do crescimento celular, proliferação e sobrevivência (GUERRERO-ZOTANO; MAYER; ARTEAGA, 2016; LIEN; DIBBLE; TOKER, 2017; MARSHALL, 2017, chap. 1).

Akt é regulada negativamente por uma enzima fosfatase que reverte a reação da PI3K. Esta enzima, conhecida como PTEN (fosfatase homóloga a tensina; que degrada PIP3, sendo um gene supressor tumoral, do inglês *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), é um supressor tumoral mediante a desfosforilação de PIP3. Muitas células cancerígenas caracterizam-se por apresentar perda da função de PTEN e conseqüentemente uma hiperativação da via PI3K/Akt levando a uma sobrevivência e proliferação descontrolada das células e tornando esta via um importante alvo terapêutico cancerígeno (FAN *et al.*, 2007; GALLIA *et al.*, 2009; HAYASHI *et al.*, 2016; KOGEL; FULDA; MITTELBRONN, 2010; LIEN; DIBBLE; TOKER, 2017; MARSHALL, 2017, chap. 1; MUNDI *et al.*, 2016).

2.2.2 mTOR

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma serina-treonina cinase com peso molecular de 290 KDa e cuja via de sinalização é conservada evolutivamente. Sua principal função é de interagir com o microambiente celular regulando o crescimento, sobrevivência, senescência, metabolismo celular e sistema de tradução de proteínas, orquestrando a atividade celular dos sistemas em geral, incluindo o sistema imune e o sistema nervoso (KIM, L C; COOK; CHEN, 2017; LINKE *et al.*, 2017; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006).

A via mTOR pode ser ativada na falta de nutrientes segundo a razão ATP:AMP mediada pela proteína cinase ativada por AMP (AMPK), na resposta de factores de crescimento via ativação de PI3K/Akt (HUANG; MANNING, 2009; MANNING; TOKER, 2017).

A proteína mTOR representa o núcleo catalítico de dois complexos proteicos mTORC1 e mTORC2, que possuem diferentes componentes estruturais e que cumprem funções diferentes. O complexo 1 de mTOR (mTORC1) é sensível a rapamicina, sendo formado pelas proteínas Raptor (uma proteína reguladora associada a mTOR), a proteína adaptadora mLST8 (do inglês *mammalian lethal with SEC13 protein 8*), o substrato de Akt

rico em prolina de 40 KDa (PRAS40) e a proteína de interação a mTOR contendo o domínio DEP (Deptor) estes últimos atuam como reguladores negativos do complexo (CHEN, J., 2004; ZHOU, HONGYU; HUANG, 2010). Raptor é fundamental para a atividade de mTORC1 já que regula a sua formação e localização (HARA *et al.*, 2002; KIM, DO-HYUNG *et al.*, 2002). Este complexo é sensível à falta de nutrientes sendo sua principal função regular a síntese proteica e o crescimento celular mediado por 4E-BP1 e S6K (JHANWAR-UNIYAL *et al.*, 2019).

O complexo 2 de mTOR (mTORC2) não é inibido por rapamicina, sendo constituído pela proteína mTOR, DEPTOR, mLST8 e a subunidade Rictor (insensível a rapamicina), mSIN1, PROTOR, PRR5 e Hsp70 (DAN; ANTONIA; BALDWIN, 2016). Rictor é necessária para a ativação catalítica do complexo que junto com mSIN1, que possui um domínio PH, auxiliam na estabilização estrutural do complexo, localização subcelular, propiciando sua ativação influenciada por PIP3, produzido em resposta a ativação de PI3K, enquanto Deptor possui efeito inibidor neste complexo (JHANWAR-UNIYAL *et al.*, 2019; KIM, L C; COOK; CHEN, 2017).

A regulação dos complexos mTORC1 e mTORC2 pode se inter-relacionar em diversos níveis. Um exemplo disso é o fato de que Akt pode fosforilar PRAS40 minimizando seu efeito inibitório sobre mTORC1, enquanto S6K1 fosforila Rictor e SIN1 inibindo mTORC2 e conseqüentemente a fosforilação ativadora de Akt (Ser473) (FU; CHENG; LIU, 2013; JHANWAR-UNIYAL *et al.*, 2019; MANNING; TOKER, 2017). A desregulação desta via foi observada em várias doenças entre elas diabetes, neurodegeneração e câncer. Sendo importante ressaltar que estas alterações frequentemente são observadas em astrocitomas e no glioblastoma (FAN *et al.*, 2007; GUERTIN; SABATINI, 2007; JHANWAR-UNIYAL *et al.*, 2019; KIM, L C; COOK; CHEN, 2017; MIYATA *et al.*, 2017; XU, GUANG *et al.*, 2004)

2.2.3 MAPKs

As proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) constituem uma família de proteínas ativadas por fatores de crescimento e estresse, desempenhando funções chaves na transmissão de sinais extracelulares em intracelulares permitindo à célula interagir com diferentes estímulos.

Para a sua ativação as MAPKs precisam da dupla fosforilação nos resíduos conservados treonina (Thr) e tirosina (Tyr), produto de uma cascata de sinalização que depende do alinhamento de pelo menos três elementos, como: MAPK efetora propriamente dita (ERK, p38^{MAPK}, JNK); MAPKK (cinase ativadora de MAPK) responsável por fosforilar e

ativar uma das MAPKs (ex. MEK, MKK); MAPKKK (cinase ativadora da MAPKK) que fosforila e ativa a MAPKK (Ex. Raf, MEKK, TAK, ASK) (KARRA; COBB, 2016; MARSHALL, 2017). Assim, estímulos extracelulares ou mitógenos ao interagirem com os receptores tirosina cinases (RK) ativam GTPases, desencadeando ativação de proteínas cinases que fosforilam e ativam MEK, que por sua vez irá fosforilar uma MAPK efetora, provendo sua ativação (PEARSON *et al.*, 2001). Deste modo, as proteínas MAPK podem regular processos envolvidos na divisão celular, alterações nos padrões de expressão gênica, migração celular, metabolismo, ativação de mecanismos de morte celular programada, proliferação e diferenciação celular, entre outros processos implicados na homeostase do organismo. Portanto, anomalias na sua sinalização interferem em todos estes processos sendo essencial no desenvolvimento e progressão tumoral e, por conseguinte, importantes alvos terapêuticos (LI, ZHIYUAN; ZHANG, 2017; MARSHALL, 2017; WAGNER, ERWIN F.; NEBREDA, 2009).

A desativação das MAPKs é mediada por várias classes de proteínas fosfatases, que incluem p-Thr fosfatases (ex. PP2A), p-Tyr fosfatases e as MKPs (MAPKs fosfatases). Estas últimas são proteínas fosfatases de especificidade dupla (DSPs) que desfosforilam tanto resíduos de p-Thr como p-Tyr das MAPKs. As MKPs podem ser agrupadas em vários grupos e incluem: MKP do tipo I, localizadas no núcleo, MKP do tipo II no citoplasma e MKP do tipo III, localizados tanto no núcleo quanto no citoplasma, sendo que estas diferentes localizações estariam envolvidas com diferentes funções que essas fosfatases poderiam desenvolver (DICKINSON; KEYSE, 2006; KONDOH; NISHIDA, 2007).

Em geral cada membro da família é ativado por um estímulo diferente assim, por exemplo, ERK1 e ERK2 são preferencialmente ativadas em resposta a fatores de crescimento e estímulos de sobrevivência, sendo superexpressadas nos tumores ou inibidas no tratamento de alguns anticancerígeno (MAIK-RACHLINE; SEGER, 2016). Os outros dois membros importantes das MAPKs são as proteínas da via Jun N-terminal Cinase (JNK) e p38^{MAPK} as quais são ativadas em condições de estresse produto de um choque osmótico, radiação ionizante ou pela estimulação de citocinas, estando suas funções envolvidas na antoginização da proliferação e diferenciação celular, assim podem encontrarem-se inibidas nas células cancerígenas e ativadas frente ao tratamento (WAGNER, ERWIN F.; NEBREDA, 2009). A seguir, detalharemos melhor o papel destas proteínas.

2.2.3.1 Membros da família p38^{MAPK}

A p38^{MAPK} em mamíferos foi reportada pela primeira vez em quatro estudos diferentes, que identificaram originalmente essa proteína como: uma proteína de 38 KDa fosforilada em tirosina, produto da estimulação com lipopolisacarídeos (LPS); como RK, uma proteína cinase ativada em resposta ao arsênico, choque térmico ou estresse osmótico; como p40, ativada em resposta a IL-10; como CSBP2, sendo alvo de um composto de piridinil imidazol (SB203580) com propriedades anti-inflamatórias. Essa identificação original de fato corresponde a uma das isoformas da enzima, p38 α , sendo que posteriormente foram identificadas outras isoformas com alta homologia que incluem p38 β , p38 γ e p38 δ (CANOVAS; NEBREDA, 2021; HAN; WU; SILKE, 2020).

Diversos estudos na literatura têm implicado à p38 α na resposta celular frente a condições de estresse, como por exemplo, períodos de estresse intra ou extracelular produto de hiperosmolaridade, estresse oxidativo ou danos no DNA (CANOVAS; NEBREDA, 2021). Baseados na habilidade da p38 α de inibir *in vitro* a transformação (induzidas por RAS) das células epiteliais normais em células malignas, foi descrita como uma possível proteína supressora tumoral (MARTÍNEZ-LIMÓN *et al.*, 2020; SHEN, YING H. *et al.*, 2006; WAGNER, ERWIN F.; NEBREDA, 2009; ZHOU, YUAN-YUAN *et al.*, 2015).

Do mesmo modo às outras proteínas da sua família, a p38^{MAPK} é ativada mediante a dupla fosforilação nos resíduos Thr e Tyr na sequência de aminoácidos Thr-Gly-Tyr localizada na alça de ativação. Esta dupla fosforilação, mediada principalmente por MKK3 e MKK6, altera a conformação de p38^{MAPK}, permitindo o acesso e reconhecimento do substrato pelo sítio ativo da enzima e dessa forma promovendo o aumento da atividade cinase (CANOVAS; NEBREDA, 2021; MARTÍNEZ-LIMÓN *et al.*, 2020). Cabe destacar que diversos estudos de proteômica demonstraram que p38^{MAPK} é regulada por modificações pós-traducionais (MPTs) (ZOU; BLANK, 2017).

Com respeito ao papel da p38 α como supressor tumoral foi demonstrado que frente a uma hiperativação de RAS, p38 α exerce um ciclo de *feedback* negativo inibindo a sinalização de RAS e o ciclo celular, indicando que um bloqueio ou perda da funcionalidade de p38 α poderia favorecer processos de tumorigênese (MARSHALL, 2017; MARTÍNEZ-LIMÓN *et al.*, 2020; PAE *et al.*, 2001; WAGNER, ERWIN F.; NEBREDA, 2009; ZARUBIN; HAN, 2005). Com respeito a este último ponto, também foi indicado que a ativação de p38^{MAPK}, mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO), pode desencadear degradação da proteína Bmi1 e ativação de FoxO3 em células iniciadoras de glioma (GICs), promovendo perda de sua capacidade de autorenovação e diferenciação, sendo considerado como um possível alvo

terapêutico no eixo ERO-p38^{MAPK} em gliomas (SATO *et al.*, 2014). Por outro lado, foi reportado que a perda da funcionalidade da p38 γ induz morte celular e alterações na mitose (KUKKONEN-MACCHI *et al.*, 2011).

p38^{MAPK} é desfosforilada tanto por DUSP (família de fosfatase de dupla especificidade) quanto por WIP1 (membro da família das p-Ser/p-Thr proteínas fosfatase C que possui função na progressão tumoral). Assim, a desfosforilação da p38^{MAPK} por WIP1 é considerado um mecanismo importante na progressão tumoral dependente de p38/16Ink4a (MARSHALL, 2017, chap. 71). Portanto, p38^{MAPK} pode ser empregada pelas células cancerígenas para detectar e adaptar-se às condições do microambiente tumoral, sugerindo um papel duplo em suprimir ou promover o crescimento tumoral, metástase e quimiorresistência (ZOU; BLANK, 2017).

Há evidências na literatura que demonstra um *crossstalk* positivo entre ERK e p38^{MAPK} ativando processos de migração e proliferação de células de melanoma (ESTRADA; DONG; OSSOWSKI, 2009). Por outro lado, em fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) foi demonstrado um *crossstalk* entre p38^{MAPK} e JNK 1/2, no qual o estímulo da expressão de MAPK fosfatase 1 (DUSP1/MKP1) por p38^{MAPK} podia manter as MEFs mais resistente a morte celular frente à radiação UV por mecanismo dependente da inibição da fosforilação de JNK1/2 por MKP1 (STAPLES *et al.*, 2010). Contudo também foi observado um *crossstalk* entre p38^{MAPK} e a via de sinalização PI3K/Akt envolvidos na diferenciação e ancoragem das células cancerígenas no processo de carcinogênese e resistência ao tratamento (ZARUBIN; HAN, 2005).

2.2.3.2 JNK

c-Jun N-terminal cinase (JNK) é uma proteína cinase ativada por estresse que possui uma função chave na resposta de processos fisiológicos como proliferação celular, diferenciação, morte, sobrevivência ou processos inflamatórios. Assim, a desregulação de JNK pode contribuir na progressão de várias doenças como a diabetes tipo 2, obesidade, asma, inflamação, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes e câncer (KUMAR, ANKIT *et al.*, 2015; MARSHALL, 2017, chap. 66; WU, QINGHUA *et al.*, 2019).

JNKs são codificadas por três diferentes genes (*jnk1*, *jnk2* e *jnk3*) a partir dos quais são geradas, por splice alternativo, 10 isoformas. Em mamíferos a isoforma JNK3 é restrita ao tecido nervoso central, coração e testículos, enquanto as isoformas JNK1 e JNK2 são expressas em todos os tecidos (KUMAR, ANKIT *et al.*, 2015; MIELKE; HERDEGEN,

2000). A ativação de JNK é mediada pela dupla fosforilação das MAPKK MKK4 e MKK7 (GANCZ; DONIN; FISHELSON, 2009)

A modulação da via JNK é fundamental na regulação de vários processos fisiológicos que no SNC incluem desenvolvimento, reparo e formação da memória, bem como podem ser potentes efetores de morte celular e inflamação (HAEUSGEN *et al.*, 2009). Além de mediar os processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, concomitantemente processos de apoptose e respostas imunológicas. JNK tem demonstrado desempenhar funções na progressão e supressão tumoral, mediante complexos mecanismos de *crosstalk* com o microambiente tumoral (TAM; LAW, 2021). Muitos estudos têm implicado JNK na ativação de mecanismos de morte celular pelo mecanismo de apoptose (STAPLES *et al.*, 2010). Não obstante, vários trabalhos na literatura relatam sua função em modular processos autofágicos por duas vias, uma implicada na fosforilação de Bcl-2/Bcl-xL permitindo a dissociação do complexo Bcl-2/Beclin-1 e consequente liberação da Beclin-1 (um estimulador essencial na ativação do processo autofágico) (JUNG *et al.*, 2012; LI, D-D *et al.*, 2009; WU, QINGHUA *et al.*, 2019), a segunda via de ativação pode ocorrer mediante a estimulação do gene DRAM (modulador de autofagia regulado por danos) que estimula o acúmulo de autofagossomos regulando a fusão autofagossomo-lissosomo e gerando o autofagolisossomo que conclui o processo de autofagia (LORIN *et al.*, 2010; WANG, YONGJUN *et al.*, 2010; ZHANG, XIAO-YUE *et al.*, 2013).

2.2.3.3 ERK

As proteínas da família ERK são as proteínas efetoras da via de sinalização RAS/Raf, que abrange uma cascata altamente conservada de interação proteína-proteína e fosforilação, envolvidas em processos como proliferação celular, diferenciação, migração, como também nos processos de senescência e apoptose. Desempenhando funções chaves em diversos sistemas biológicos (CHEN, ZHU *et al.*, 2001; DARD *et al.*, 2018; SUN, YU *et al.*, 2015).

Desse modo, quando uma molécula de GTP liga-se a RAS ativa Raf que por sua vez fosforila e ativa MAPK cinase (MAPKK) MEKs (MEK1 e/ou MEK2) finalizando na fosforilação e ativação de ERKs (ERK1 e/ou ERK2) (DARD *et al.*, 2018). Uma vez ativada ERKs desempenham funções no núcleo celular, ativando fatores de transcrição como FOS, ELK1, MEF, Pax6, como também podem modular proteínas de membrana e proteínas citosólicas como PDE (Fosfodiesterase), Syk, paxilin, além de outras proteínas cinases, conhecidas como proteínas cinases ativadas por MAPK, como RSK e MNK, controlando

funções vitais na regulação do ciclo celular (transição da fase G1 à S e da fase G2 à fase M) (DARD *et al.*, 2018; MARSHALL, 2017; TANG *et al.*, 2011).

Ademais, foi observado que as proteínas da família ERK estão envolvidas na regulação de processos autofágicos, como metabolismo de lipídios (importantes na fase de alongação do processo), contribuindo na sobrevivência das células cancerígenas (BRAVO-SAN PEDRO *et al.*, 2012; HOUEL-RENAULT *et al.*, 2013; LI, ZHIYUAN; ZHANG, 2017; XIAO, YUZHONG *et al.*, 2016).

2.3 Mecanismos de morte celular

No passado pensava-se a morte celular como produto de processos passivos de caráter degenerativo produto de infecção, ausência de fatores de crescimento ou lesão celular (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Atualmente os mecanismos de morte celular são vistos como processos de vital importância na homeostase de tecidos e/ou organismo, já que mediante estes processos são eliminadas células supérfluas ou defeituosas, tanto durante o desenvolvimento quanto na vida adulta (CHEN, YANZHAO *et al.*, 2017; LIN; BAEHRECKE, 2015). Assim, as células podem desencadear respostas de morte celular programada ou controlada, iniciadas e executadas por diferentes vias bioquímicas frente a estímulos intracelulares ou extracelulares (CHEN, QI; KANG; FU, 2018).

A importância de estudar os diversos tipos de morte celular reside no fato que as estratégias terapêuticas contra o câncer baseiam sua eficácia na ativação dos mecanismos de morte celular programada ou regulada (GUDIPATY *et al.*, 2018), dos quais os mais importantes ou desejados, seriam a ativação de morte celular por processos apoptóticos ou autofágicos (CASTEDO *et al.*, 2004; LIN; BAEHRECKE, 2015; OKADA; MAK, 2004; SCHWEICHEL; MERKER, 1973). Sendo bem conhecido que a perda de respostas apoptóticas da célula pode ser responsável pelo desenvolvimento do tumor (CHEN, DONGSHI; YU; ZHANG, 2016; GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2015, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011; LIN; BAEHRECKE, 2015; RICCI; ZONG, 2006). Perante o exposto, o estudo detalhado do mecanismo de ativação destes processos torna-se de destaque nas pesquisas de terapias cancerígenas.

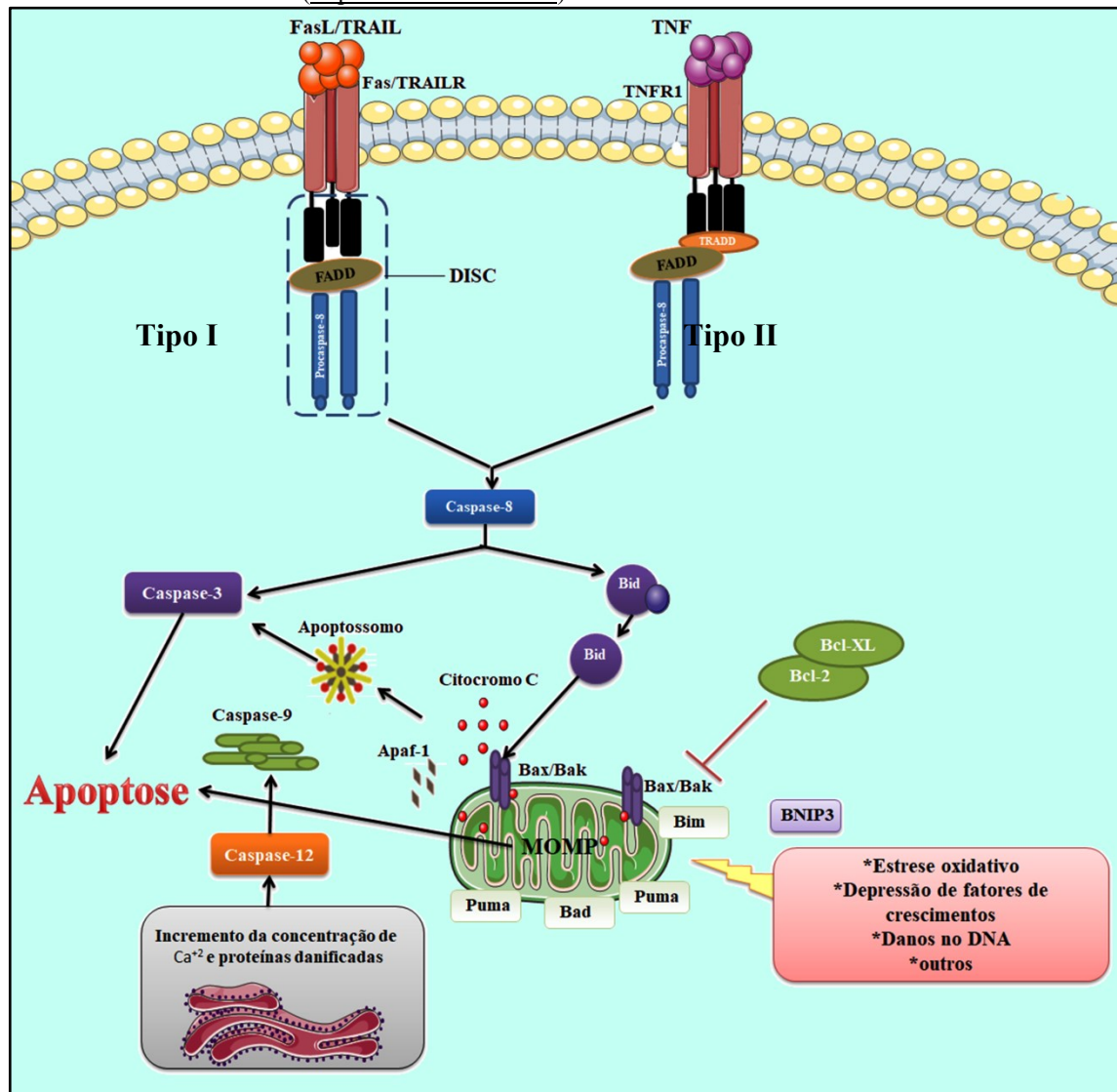
Tanto o início como a execução da morte celular são processos complexos, que envolvem critérios morfológicos e podem ser classificadas, de uma forma geral, como morte celular apoptótica, autofágica ou por necroptose.

2.3.1 Morte celular apoptótica

No processo apoptótico, geralmente considerado como a morte celular programada mediada por caspases, as células apresentam características morfológicas diferentes como arredondamento, retração dos pseudópodos, redução do volume nuclear e celular (picnose), condensação e fragmentação da cromatina (kariorexise), protuberâncias na membrana plasmática (*blebbing*), formação de corpos apoptóticos, e alterações bioquímicas como, por exemplo, a exposição da fosfatidilserina (PS) na superfície da membrana plasmática o que leva à invaginação das células pelos fagócitos em condições *in vivo* (GALLUZZI, L *et al.*, 2008; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; LOCKSHIN; ZAKERI, 2001).

Geralmente são descritos dois mecanismos de indução de apoptose (Fig. 2). Um desencadeado mediante ativação de receptores de morte celular, denominada via extrínseca de apoptose; e o outro dependente da mitocôndria e do estresse do retículo endoplasmático (RE), denominada via intrínseca de apoptose (CHEN, QI; KANG; FU, 2018). Além disso, recentemente o processo denominado *Anoikis* vem ganhando muito interesse na comunidade científica por ser a morte celular programada induzida pelo descolamento das células aderentes à MEC (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013).

Figura 2. Mecanismos bioquímico do processo de apoptose. A via extrínseca do processo de apoptose se dá durante a ligação de FASL, TNF- α ou TRAIL aos seus correspondentes receptores de morte celular que podem clivar procaspase-8 à caspase-8, que ainda pode se autohidrolisar. Nos receptores Tipo I, a ativação de caspase-8 pode ativar caspase-3 e levar a apoptose. Entretanto, nos receptores Tipo II, a ativação de caspase-8 cliva Bid em tBid, que interage com o complexo Bax/Bak na mitocôndria, induzindo a liberação de citocromo c, consequentemente ativando a apoptose. Porém, a via intrínseca da apoptose é resultado de privação de fatores de crescimento, danos no DNA, estresse oxidativo entre outros, que podem induzir alterações na homeostase da mitocôndria, tipicamente controlada pelos membros da família Bcl-2. Estes eventos levam a perda da integridade mitocondrial, com aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e consequente liberação de citocromo c. Adicionalmente, o citocromo c no citosol pode interagir com Apaf-1 e caspase-9, para ativar caspase-3 e induzir apoptose. Assim como estresse do RER produto do incremento de proteínas danificadas e a concentração de Ca^{+2} intracelular induz a ativação de apoptose mediada pela caspase-12; sendo a caspase-12 translocada do RER para o citosol onde cliva caspase-9 e caspase-3. Esta figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com>).



2.3.1 a) Via intrínseca

A via intrínseca é regulada por proteínas encarregadas de manter a integridade mitocondrial. Estas proteínas pertencem à família de proteínas Bcl-2 (do inglês *B cell lymphoma 2*) e são compostas por 25 membros que constituem o ponto chave na ativação da

via intrínseca da apoptose celular (CORY; ADAMS, 2002; MARZO; NAVAL, 2008; TAN, TING-TING; WHITE, 2008).

Pesquisas ao longo dos anos demonstraram que a família de proteínas Bcl-2 pode ser dividida em subfamílias, baseado na presença de determinados domínios de homologia Bcl-2 (BH) e seu envolvimento na regulação de apoptose.

Os domínios BH facilitam as interações dos membros das famílias e podem indicar funções pró ou anti-apoptóticas. Tradicionalmente, essas proteínas são categorizadas em uma das três subfamílias: proteínas anti-apoptóticas, apenas BH3 (pró-apoptóticas) e formadoras de poro ou “executoras” (pró-apoptóticas). Essa categorização tem sido principalmente baseada na presença dos domínios BH, domínio transmembrana, função anti ou pró-apoptótica, bem como capacidade de formação de poros. Assim a subfamília anti-apoptótica inclui as proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL-1, BCL2A1 e BCL-B (também chamadas de proteínas pró-sobrevivência) que contêm quatro domínios BH (BH1-4). A subfamília Bax (pró-apoptótica) ou executora inclui as proteínas Bax, Bak e Bok que contêm múltiplos domínios BH (BH1-3). Por fim, a subfamília BH3 ou *BH3-only* (pró-apoptótica) formada pelas proteínas Bim, Puma, Bid, Bad, NOXA, Bik, HRK e BMF que só apresenta o domínio BH3, domínio de morte celular (CORY; ADAMS, 2002; MARZO; NAVAL, 2008; SINGH, RUMANI; LETAI; SAROSIEK, 2019; WARREN; WONG-BROWN; BOWDEN, 2019)

Foi observado que mediante os domínios BH1, BH2 e BH3, as proteínas da subfamília anti-apoptótica formam uma região hidrofóbica de interação com os domínios BH3 das proteínas pró-apoptóticas, inibindo sua ação e dessa forma a liberação do citocromo c (BHAT *et al.*, 2018; CORY; ADAMS, 2002; RIKKA *et al.*, 2011; WESTPHAL *et al.*, 2011).

Nas células sadias, Bax e Bak aparecem como monômeros, estando Bax ancorada na face citoplasmática de várias organelas e Bak no interior da mitocôndria. Frente a sinais de morte celular, Bax insere-se na membrana externa da mitocôndria em forma de oligômeros e Bak sofre uma mudança conformacional (oligomerização) que leva à permeabilização da membrana externa mitocondrial e liberação do citocromo c. Por outro lado, as proteínas Bad, Bik, Bid, Bim, Puma e NOXA, sensores de estresse e de dano celular (GÓMEZ-FERNÁNDEZ, 2014), podem ser ativadas como consequência da ausência ou deficiência de fatores de sobrevivência, danos ao DNA, altas concentrações de Ca^{2+} intracelular entre outros eventos. Estas proteínas pró-apoptóticas *BH3-only* ligam-se e inativam as proteínas pró-sobrevivência, tais como Bcl-2 e Bcl-XL, ou podem ligar-se diretamente a Bax e Bak, aumentando a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria com subsequente liberação do citocromo c (proteína pequena que funciona como transportador eletrônico

mitocondrial entre os complexos respiratórios III e IV) e SMAC/DIABLO (proteína mitocondrial localizada no espaço intermembrana mitocôndria). Uma vez liberadas ao citosol, enquanto o citocromo c se liga a um fator ativador de protease apoptótica (Apaf-1) e a caspase-9, SMAC/DIABLO liga-se ao inibidor de proteínas de apoptose (IAP), removendo sua atividade de inibidor, e permitindo a formação do apoptossomo que ativa a caspase-3 (BHAT *et al.*, 2018; CORY; ADAMS, 2002; RIKKA *et al.*, 2011; WESTPHAL *et al.*, 2011).

Além disso, a proteína BNIP3 (siglas do inglês *Bcl-2/adenovirus E1B 19-KDa-interacting protein*) uma proteína pró-apoptótica atípica com domínio BH3-*only*, em condições de estresse celular pode translocar-se do núcleo ao citosol onde pode induzir danos na membrana mitocondrial e perturbar a sua função (PRATT; ANNABI, 2014). A dimerização da BNIP3 na membrana mitocondrial externa em resposta ao estresse celular tem sido associada à morte celular, assim como os heterodímeros BNIP3/Bax podem promover a modificação conformacional de Bak resultando na ativação da via intrínseca de apoptose (HENDGEN-COTTA *et al.*, 2017; RIKKA *et al.*, 2011).

Adicionalmente, o estresse do RE que pode ocorrer em consequência de desbalanço na homeostase de Ca^{2+} intracelular, acúmulo de proteínas desdobradas ou desancoradas do RE, bem como pela depleção de nutrientes ou condições de hipóxia, pode induzir a ativação de apoptose mediada pela caspase-12; sendo a caspase-12 translocada do RE para o citosol onde cliva caspase-9 e ativa caspase-3 (CHEN, QI; KANG; FU, 2018; MOREIRA, ANDREA JANZ *et al.*, 2015).

A ativação da via apoptótica tem sido explorada nos tratamentos do câncer por quimioterapia e radioterapia através da produção de danos no DNA ou nos microtúbulos, bem como mediante a modulação da proteína supressora de tumores p53 (MARZO; NAVAL, 2008; MOLLINEDO; GAJATE, 2003; TAN, TING-TING; WHITE, 2008) e de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 e proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bak (GÓMEZ-FERNÁNDEZ, 2014; JIANG, W.G. *et al.*, 2015; VAUX; CORY; ADAMS, 1988).

Por outro lado, as células tumorais podem evadir de apoptose mediante mutações inativadoras de p53 ou pela amplificação do regulador negativo de p53, o HDM2 (do inglês *murine double minute2*), que atua como uma ubiquitina ligase E3 reconhecendo o domínio de trans-ativação N-terminal (TAD) da p53 ou como um inibidor da ativação de p53, conferido resistência às células tumorais frente às terapias convencionais (FREDERIK H. IGNEY & PETER H. KRAMMER, 2002). Adicionalmente, em diversos tipos de tumores, a sobreexpressão de Bcl-2 ou a redução da expressão de Bax, assim como uma diminuição na

expressão de SMAC/DIABLO, associam-se em geral a um pior prognóstico (BAEKELANDT *et al.*, 2000; FIDLER *et al.*, 2002; MIZUTANI *et al.*, 2005).

2.3.1 b) Via extrínseca

A via extrínseca é independente de p53, sendo ativada por sinalização extracelular mediante ligação de agonistas dos receptores pró-apoptóticos (PARAs), como Apo2L/TRAIL ou FasL, que fazem um clusters com os receptores de morte celular DR4 e DR5 ou Fas (ITOH *et al.*, 1991; TRAUTH *et al.*, 1989). Após esta ligação, os domínios intracelulares dos receptores interagem com o domínio de morte associado a Fas, resultando na associação de uma complexa cascata de sinalização de morte e recrutamento das caspase-8/caspase-10 iniciadoras (CHEN, QI; KANG; FU, 2018; JIANG, W.G. *et al.*, 2015). Algumas vezes, Apo2/TRAIL podem ativar a via intrínseca mediante clivagem e ativação de Bid, uma proteína da família Bcl-2. Apo2/TRAIL podem induzir morte apoptótica seletivamente em alguns tipos de células cancerígenas, podendo estar relacionado à maior sensibilidade das células tumorais ao PARAs (GAZITT, 1999), esse aspecto pode estar relacionado ao fato de que oncogenes como Myc ou Ras aumentam a sensibilidade da via extrínseca, em parte facilitando o *crosstalk* com a via intrínseca (ASHKENAZI, 2008).

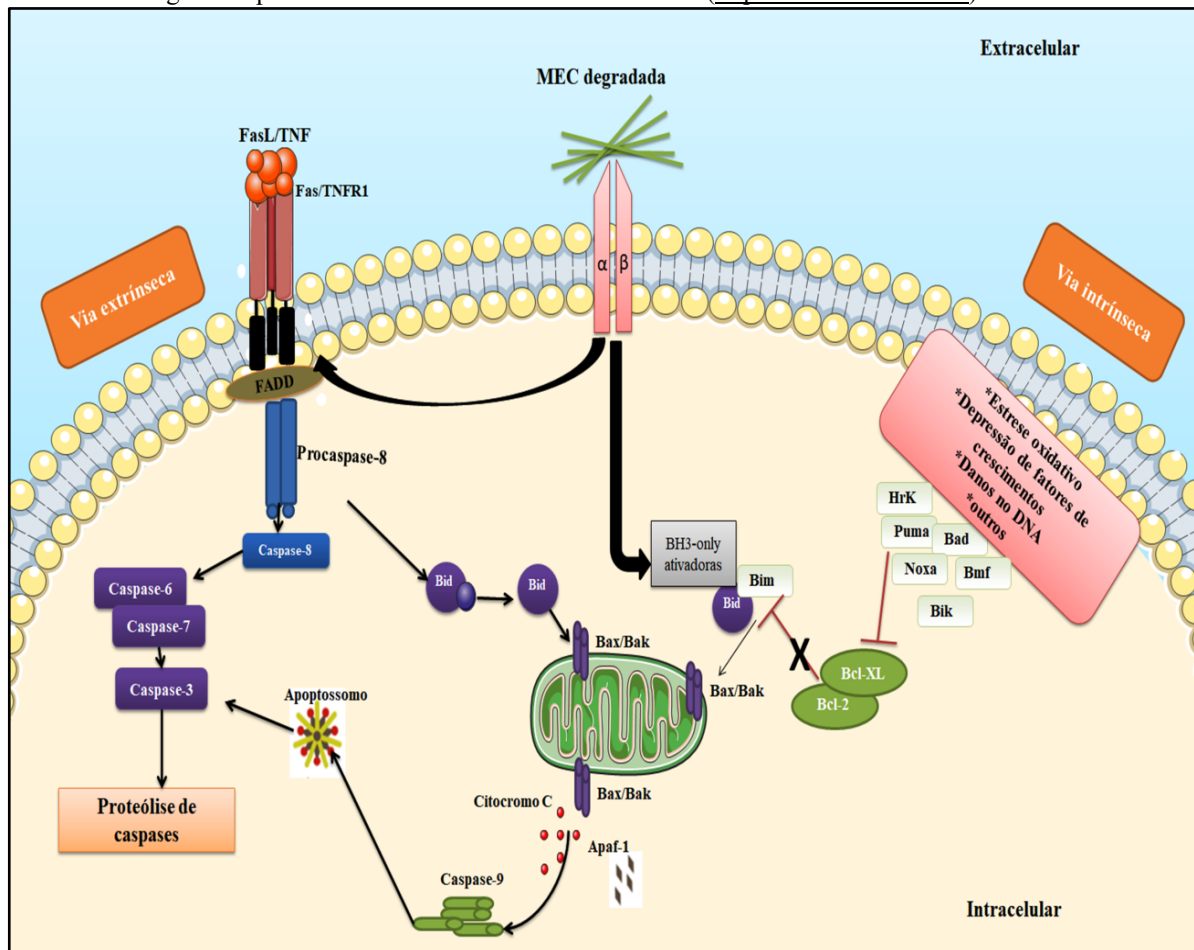
Porém, as respostas das células tumorais ao PARAs podem ser afetadas por mutações em Bax ou caspase-8, assim como alterações na expressão de proteínas anti-apoptóticas (ex. Bcl-2 ou cFLIP), proteínas pró-apoptóticas, ou ainda pela menor expressão da proteína inibidora de Raf-1 cinase e de Myc que diminui a resposta dos receptores de morte celular (ASHKENAZI, 2008).

2.3.1 c) Anóikis

O termo *anóikis* foi empregado para definir ao processo de morte celular programada produto da perda de contato celular ou pelo contato inadequado das células aos elementos da MEC. Este processo pode ser mediado por diferentes vias de sinalização, convergindo na ativação de caspase e de endonucleases, promovendo fragmentação do DNA e morte celular; envolvendo as vias extrínsecas e intrínsecas do processo de apoptose (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013), resumidas na figura 3.

Figura 3. Ativação do processo de *Anoikis* pelas vias apoptóticas extrínseca e intrínseca.

A perda de contato com a Matriz Extracelular (MEC), ou degradação dela, ativa o processo de morte celular por anoikis. Isto ocorre mediante a estimulação dos receptores de morte (via extrínseca) ou prejuízos no potencial de membrana mitocondrial (via intrínseca). Na via extrínseca haveria uma ativação da caspase-8 pela estimulação dos receptores de morte (por exemplo, Fas ou TNFR1) com consequente ativação das caspases efetadoras do processo. Na via intrínseca a ativação do complexo Bak/Bax é mediada pelas proteínas BH3-only. Como Bik, Bad, Bim, Puma, Hrk, Bmf e Noxa, como também mediante a ativação de Bid e Bim, que podem promover a oligomerização do complexo Bak/Bax. Por fim, ambos os mecanismos levariam ao bloqueio de Bcl-2 e Bcl-XL induzindo a liberação do citocromo c com a consequente formação do apoptossomo e ativação das caspases efetoras. Esta figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com>).



As proteínas transmembrana integrinas, constituem nos vertebrados uma família de glicoproteínas composta por 18 subunidade α e 8 subunidades β que se associam em 24 diferentes heterodímeros (ex. $\alpha5\beta1$, $\alpha v\beta3$, $\alpha1\beta1$ e $\alpha6\beta1$) que participam na ancoragem das células à MEC e na união célula-célula (BARCZYK; CARRACEDO; GULLBERG, 2010). As integrinas proporcionam proteção frente à apoptose e *anoikis*, ativando cascatas de sinalização envolvidas na sobrevivência celular incluindo FAK, Src, ILK (cinase ligada a integrinas do inglês, *integrin-linked kinase*), PI3K/Akt e MAPKs. Porém, na perda de adesão celular foi observado que seu efeito protetor é perdido (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013).

As proteínas da subfamília pró-apoptótica (BH3), especificamente Bim e Bid, são essenciais na ativação da cascata programada de *anoikis* pela sua sensibilidade ao estresse provocado durante a perda de adesão à MEC, que promove rapidamente a associação e oligomerização do complexo Bax-Bak, com consequentemente alteração do potencial de membrana mitocondrial (SOSA *et al.*, 2013). A perda de adesão celular provoca um acúmulo de Bim no citosol, mediante a inibição da degradação proteasomal, processo que normalmente está ativado via fosforilação de Bim por ERK e PI3K/Akt. Além disso, a perda de adesão também promove a liberação de Bim do citoesqueleto, a partir de complexos com dineína, proporcionando sua translocação para a mitocôndria (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013). Outras proteínas da subfamília BH3, como por exemplo Noxa e Puma, reguladas pela ativação de p53, também podem participar na execução de *anoikis* (NAKANO; VOUSDEN, 2001; PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013). O fator modificador de Bcl-2 (BMF) interage intracelularmente com a cadeia leve de dineína 2 (DLC2), que faz parte do complexo motor miosina V, é capaz de detectar danos no citoesqueleto e se translocar à mitocôndria para induzir a liberação do citocromo c, ativando a cascata de sinalização de morte celular (AKHTER *et al.*, 2018; TAN, B S *et al.*, 2015; WHELAN *et al.*, 2010). Em modelo 3D de tumoresferas de células de carcinomatose peritoneal e sarcomatose, foi observado que o complexo BNIP3/BNIP3L podia ativar o processo autofágico via Beclin-1, resultando na resistência de *anoikis*, no entanto os parâmetros de sobrevivência e morfologia das tumoresferas foram afetadas (CHEN, JAMES L *et al.*, 2017).

A perda de adesão celular envolve a ativação da via de sinalização dependentes de Fas e FasL, assim como inibição de FLIP [*“FADD-like IL-1 β -converting enzyme”* (FLICE) inhibitory protein], ativando a via extrínseca para induzir *anoikis* (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013). Adicionalmente, existem estudos reportando que a perda de adesão celular à MEC poderia induzir a liberação da proteína Bit1 da mitocôndria para o citosol mediando a ativação de apoptose independente de caspase (JAN *et al.*, 2004; JANES; WATT, 2004). No entanto, foi observado que a perda de caspase-8 e/ou a sua fosforilação no seu resíduo Tyr380 poderiam contribuir na transformação neoplásica das células cancerígenas conferindo resistência à ativação de *anoikis*, favorecendo processos de migração, invasão e metástase (FIANCO; CENCI; BARILÀ, 2016; OH, YOU-TAKE; SUN, 2021).

2.3.2 Morte celular autofágica

A palavra autofagia vem do grego e significa auto degradação, é um processo adaptativo conservado evolutivamente, que ocorre em resposta a estresse metabólico como

deficiência de nutrientes, organelas danificadas, hipóxia, ERO, estresse do retículo endoplasmático (RE) ou como resposta frente à fármacos (DANIAL; KORSMEYER, 2004; DEGTYAREV; REICHELTL; LIN, 2014; LEVINE; KLIONSKY, 2017; LUM; DEBERARDINIS; THOMPSON, 2005; OHSUMI, 2014).

Pode ser descrito como um processo de autodegradação e reciclagem dos componentes celulares mediante a formação de complexos lisossomais, cumprindo importantes funções na manutenção, diferenciação e defesa celular, remodelação de tecidos, controle do crescimento e adaptação metabólica (OHSUMI, 2014). Porém, nas células cancerígenas, a autofagia pode atuar mediando mecanismos fisiológicos de sobrevivência temporal, e/ou levar a morte quando o estresse se apresenta contínuo ou como produto de uma autofagia excessiva (BHUTIA *et al.*, 2019; JIANG, Q.-L. *et al.*, 2015; LIU, B.; WEN; CHENG, 2013; LIU, HE; SONG, 2016; SCHNEIDER; CUERVO, 2014).

Podemos subdividir o processo em três tipos de autofagia, dependendo do mecanismo de entrega da carga citoplasmática: macroautofagia, que envolve a formação do autofagossomo que se funde aos lisossomos; microautofagia, que se refere ao processo onde as proteínas citosólicas são diretamente englobadas pelos lisossomos; autofagia mediada por chaperonas, que utiliza as chaperonas citoplasmáticas para entregar as proteínas às superfícies dos lisossomos (COOPER, KATRINA F., 2018; DEGTYAREV; REICHELTL; LIN, 2014).

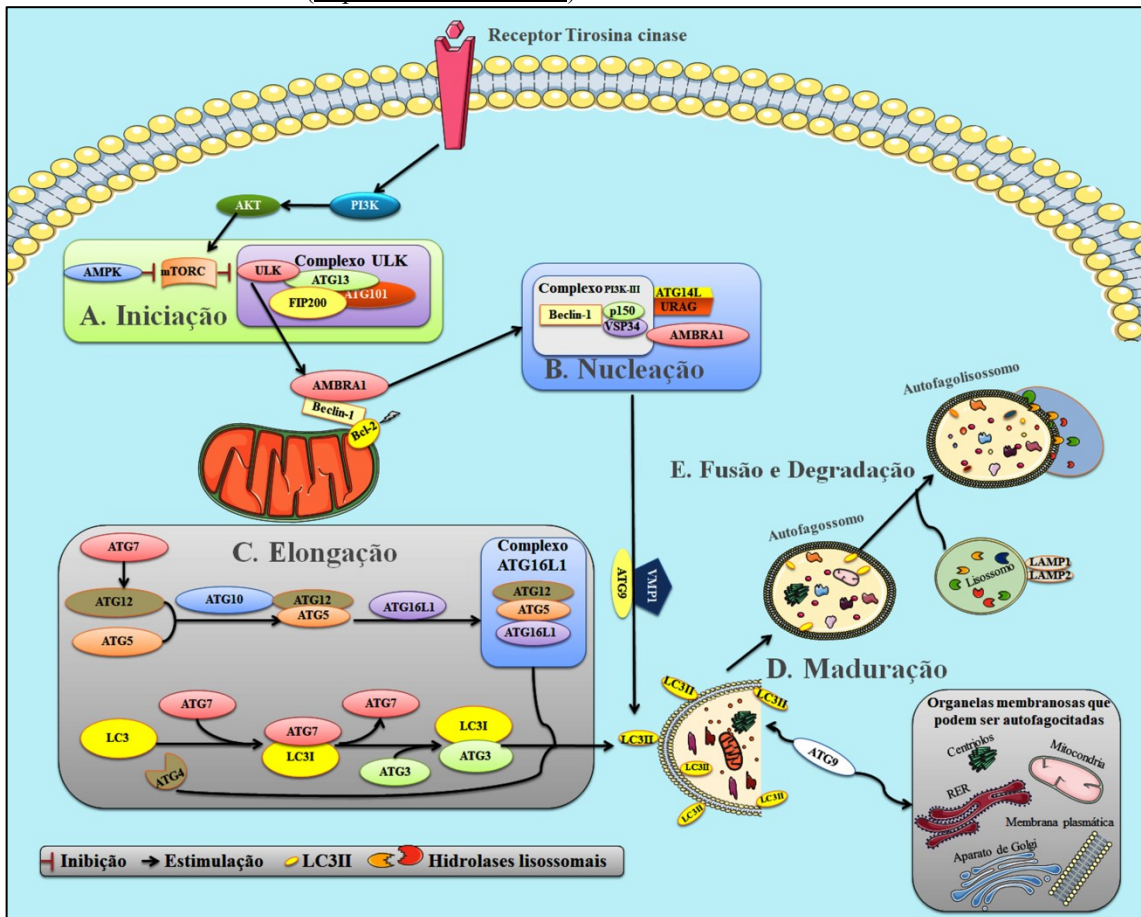
O processo de autofagia, pode ser dividido em 5 etapas: iniciação da formação do autofagóforo ou autofagossomo, alongação, maturação e fusão. De forma simplificada, o que ocorre basicamente é a formação inicial do autofagossomo, também chamado de estrutura pré-autofagossomal, esta estrutura se alonga, engloba as organelas, proteínas ou outros materiais que serão degradados e se funde para a formação do autofagossomo. Este autofagossomo, por sua vez, primeiramente se funde com o endossomo e posteriormente se funde com o lisossomo para iniciar a degradação propriamente (DIKIC; ELAZAR, 2018; RAVIKUMAR *et al.*, 2010; WEN *et al.*, 2013).

Conforme pode ser visto na figura 4, bioquimicamente a iniciação da autofagia se dá pela formação do complexo ULK, composto por ULK1/2, ATG13 e ATG101, o qual em condições fisiológicas encontra-se inibido pelo complexo mTORC1 (OHSUMI, 2014; TSAPRAS; NEZIS, 2017). Em contraste, em condições de estresse como, por exemplo, deficiência de nutrientes, as proteínas AMPK (sensores do nível de energia) fosforilam o complexo mTORC1 promovendo sua dissociação do complexo ULK; estas modificações pós-traducionais deixam o complexo ULK completamente livre (ativo) para ligar-se ao complexo fosfatidilinositol (PI)-3-cinase de classes III (PI3K-III), que auxilia no alongamento e

maturação do fagóforo, produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3) (TSAPRAS; NEZIS, 2017).

Subsequentemente, proteínas e lipídeos são recrutados pela membrana do autofagossoma para a etapa de nucleação vesicular, incluindo a ativação do complexo PI3K/Beclin-1 (DIKIC; ELAZAR, 2018; HE; LEVINE, 2010; OHSUMI, 2014). A formação do autofagossomo e o alongamento da vesícula são realizados mediante uma conjugação dependente de ATP e ativação de ATG7 e ATG10 que estimulam a formação do dímero ATG5-ATG12 que então liga ATG16L1, para criar o complexo ATG16L1 (TSAPRAS; NEZIS, 2017; YU, LI, 2004). Seguido das etapas de alongação e conclusão das vesículas, que envolve formação de dois sistemas conjugados semelhantes à ubiquitinação, a primeira via inclui a conjugação covalente de ATG5-ATG12; enquanto a segunda via inclui a ativação de LC3/ATG4 (DIKIC; ELAZAR, 2018; JIANG, LI-CHENG *et al.*, 2015; OHSUMI, 2014). ATG7 também é responsável de supervisionar junto com ATG4B e ATG3 a clivagem e lipidação da LC3 para LC3I e LC3II, esta última se ligará à membrana interna e externa do fagóforo em formação (TSAPRAS; NEZIS, 2017). LC3II atua como um marcador da carga de autofagossomos encaminhados para serem degradados. Após o fechamento do autofagossomo carregado, há remoção da LC3II da membrana externa, para o autofagossomo completo fusionar-se ao lisossomo, mediante um processo que envolve syntaxina e as proteínas lisossômicas LAMP1 e LAMP 2, criando o autofagolisossomo que promoverá a degradação do conteúdo para distribuição intracelular dos produtos e dessa forma eventualmente atender as demandas metabólicas celulares (NAGELKERKE *et al.*, 2015; OHSUMI, 2014; TSAPRAS; NEZIS, 2017).

Figura 4. Mecanismo bioquímico do processo de autofagia. As proteínas foram agrupadas segundo sua posição na cascata de sinalização. Cada complexo contém as proteínas-chave. A. Iniciação: o complexo mTORC1 pode ser fosforilado pelas AMPK frente à deficiência de nutrientes e/ou pela via PI3K/Akt mediado pela estimulação de receptores tirosinacina (RTK), ativando o complexo ULK. Uma vez que as proteínas do complexo ULK são fosforiladas, AMBRA-1 libera a Beclin-1 das Bcl-2 facilitando a interação de Beclin-1 com p152 e VPS34 no Complexo PI3K-III. Sendo o complexo PI3K-III estabilizado pelas proteínas UVRAG e ATG14L AMBRA-1. B. Nucleação: Os complexos ULK e PI3K-III translocam-se para o local de formação do autofagossomo com ajuda das proteínas ATG9 e VMP1. C. Elongação: Pouco tempo depois do começo da nucleação do autofagossomo, as proteínas ATG7 e ATG10 são ativadas e instigam a formação do dímero ATG5-ATG12 que depois liga o ATG16L1 para criar o complexo de alongamento ATG16L1. A proteína ATG7 também supervisiona juntamente com ATG4B e ATG3 a clivagem e lipidação de LC3 para LC3-I e depois LC3-II, que está ligada à membrana interna e externa do autofagossomo. A proteína LC3-II atua como um marcador de degradação da carga autofágica. D. Maturação: encerramento do autofagossomo carregado e remoção da fração exterior da LC3-II. E. Fusão e Degradação: agora o autofagossomo pode então fundir-se com um lisossomo, através de um processo de ancoragem que envolve as proteínas lisossômicas sintranxina e LAMP-1 E LAMP-2, entre outras, para criar o autofagolisossomo, no qual o seu conteúdo é degradado por hidrolases lisossômicas, e reciclado de volta para o espaço intracelular (efeito não mostrado). Esta figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com>).



A morte celular associada ao excesso de autofagia é conhecida como morte celular autofágica, atuando como um supressor tumoral (BHUTIA *et al.*, 2019; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2016; YE, JING *et al.*, 2018).

Notavelmente, os processos autofágicos e apoptóticos podem estar interconectados mediante um *crossstalk*, onde muitas ATGs podem ser reconhecidas e clivadas por caspases, ativando um processo autofágico ou pelo contrário, deslocando todo processo a favor de um

perfil apoptótico (BOOTH *et al.*, 2014; HOU *et al.*, 2010; LALAOUI *et al.*, 2015; OKADA; MAK, 2004; TREJO-SOLÍS *et al.*, 2018; WU, HAIJIAN *et al.*, 2014). Uma exemplificação destes eventos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos das caspase na ativação do processo autofágico.

Caspase	Função na Apoptose	Interação com o efetor da Autofagia	Efeito reportado em Autofagia
Caspase-1 Iniciadora	Envolvida na apoptose da resposta inflamatória durante a interação hospedeiro-patógeno	LC3 Beclin-1	↑ Autofagia possivelmente à sobrestimulação de LC3 e Beclin-1 (SUN, QIAN <i>et al.</i> , 2013)
Caspase-2	Resposta apoptótica induzida em condições de estresse redox, danos no DNA, choque térmico, alterações no citoesqueleto	Controle nos níveis mitocondriais de ER	↓ Autofagia por prevenir o acúmulo de ER. (TIWARI <i>et al.</i> , 2011, 2014)
Caspase-8	Caspase apical da via extrínseca Cliva as proteínas alvo e ativa as proteínas efetoras	ATG3 ATG5 Beclin-1 LC3 LAMP2	↕ Autofagia por clivar ATG3, ATG5 e Beclin-1. (KANG <i>et al.</i> , 2011); (YOUNG <i>et al.</i> , 2012) ↑ Mitofagia, aumentando LC3II e LAMP2 (HOU <i>et al.</i> , 2010)
Caspase-9	Caspase apical da via intrínseca. Ativada pelo citocromo c e APAF1. Cliva as proteínas alvo e ativa as proteínas efetoras	ATG7 ATG5 Beclin-1.	↑ Autofagia por perder sua atividade catalítica quando è ligada à ATG7, resultando no complexo casp9/ATG7 de maior afinidade para LC3 (JEONG <i>et al.</i> , 2011). ↓ Autofagia por clivar ATG5 e Beclin-1 (KANG <i>et al.</i> , 2011).
Efetora Caspase-3	Principal caspase efetora na iniciação da apoptose, tanto na via intrínseca quanto extrínseca.	Beclin-1 ATG5 ATG4D Autofagossomo	↓ Autofagia por clivar ATG5 e Beclin-1 (WIRAWAN <i>et al.</i> , 2010; YOU <i>et al.</i> , 2013; ZHU, YUSHAN <i>et al.</i> , 2010). ↓ Autofagia por clivagem de ATG4D resultando em fragmentos C-terminal com maior atividade de lipidação (BETIN; LANE, 2009) ↓ Autofagia por auxílio na exocitose de autofagossomo durante a degradação apoptótica (SIROIS <i>et al.</i> , 2012).

Tabela modificada de (TSAPRAS; NEZIS, 2017)

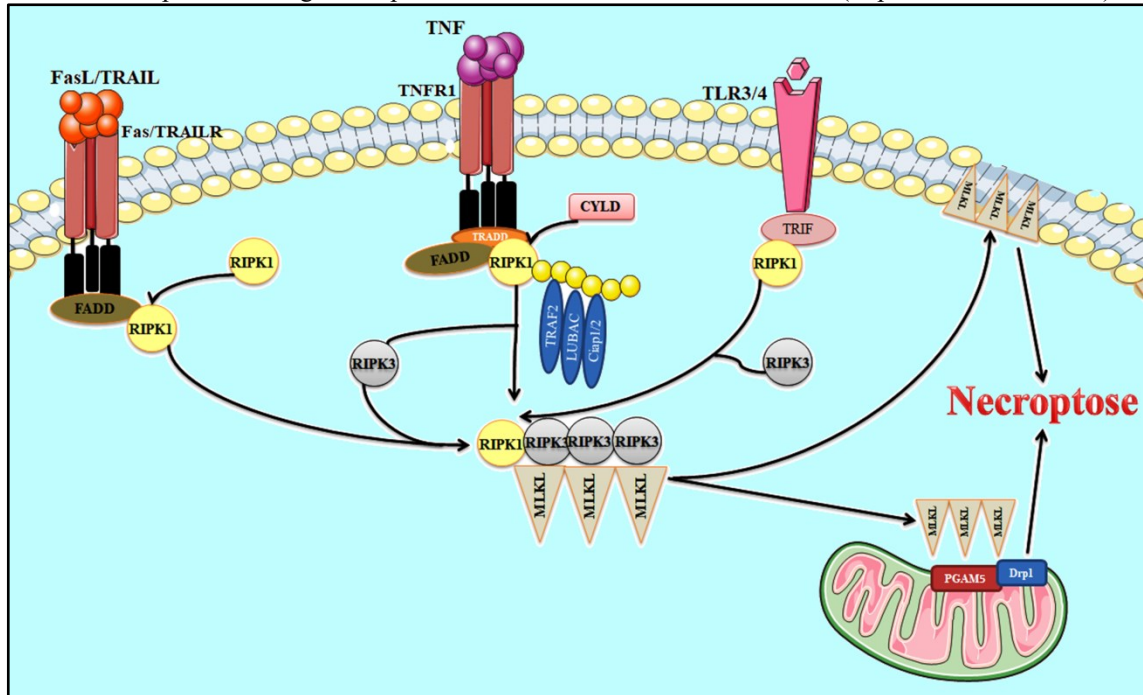
Tem sido amplamente demonstrando que várias proteínas que apresentam o motivo linear de interação com LC3, conhecido como LIR (do inglês “*LC3-interacting region*”) podem se ligar à proteína LC3 (ASHRAFI; SCHWARZ, 2013; YOULE; NARENDRA, 2011). LIR apresenta a sequência consenso W/F/Y-xx-L/I e representa uma região de interação de diversas proteínas envolvidas na via da mitofagia. Entre as proteínas que apresentam o motivo LIR podemos mencionar BNIP3, Nix, Puma, FUNDC1, VDAC1, PINK1, BCL1L13 e p62 (CHINNADURAI; VIJAYALINGAM; GIBSON, 2008; PANDA *et al.*, 2018; PRATT; ANNABI, 2014). BNIP3, por exemplo, pode ativar a autofagia em condições de hipóxia, através de um processo mediado pelo fator indutor de hipóxia (HIF)-1 α , e promover resistência ao estresse (CHINNADURAI; VIJAYALINGAM; GIBSON, 2008). Entretanto, em outras situações BNIP3 pode promover morte celular por autofagia (PRATT; ANNABI, 2014). Adicionalmente Puma pode ativar o processo de mitofagia, como resultado do incremento do nível de ERO e estresse do RE (PANDA *et al.*, 2018).

Foi observado que Beclin-1 possui domínios de homologia Bcl-2 (BH3), mediante o qual as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 ou Bcl-XL ligam-se formando o complexo Beclin-1/Bcl-2 inibindo a autofagia (DJAVAHERI-MERGNY; MAIURI; KROEMER, 2010). Alternativamente, a clivagem de Beclin-1, ATG5, ATG4D associada ao processo de apoptose resulta na abolição da autofagia citoprotetora (DJAVAHERI-MERGNY; MAIURI; KROEMER, 2010).

2.3.3 Necroptose

Os processos de necrose caracterizam-se pelas células sofrerem um insulto celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular, com liberação do conteúdo, causando um processo de inflamação local e danos às células vizinhas (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Ao contrário do processo de apoptose e autofagia, este processo não requer gasto de energia podendo se apresentar como uma morte acidental e pouco regulada (CHEN, QI; KANG; FU, 2018; WANG, KEWEI, 2014). Porém, foram relatados vários tipos de necrose programada entre elas a necroptose (Fig. 5). Este processo encontra-se conectado com outros tipos de morte celular programada, sendo que os mecanismos moleculares envolvidos no processo de necroptose, apresenta similaridade com a via extrínseca de apoptose. Entretanto, é independente da ativação de caspase e não envolve fragmentação de DNA (CHEN, DONGSHI; YU; ZHANG, 2016; CHEN, QI; KANG; FU, 2018; WU, NAN-LIN *et al.*, 2011).

Figura 5. Mecanismo bioquímico da Necroptose. As sinalizações do TNFR, do complexo I que contém TRADD, RIPK1, TRAF2, cIAP1/2 e LUBAC são instáveis quando RIPK1 é desubiquitinada pela CYLD. RIPK1 é o principal componente da formação do necrossomo que se forma da ligação de altos níveis de RIPK3 e MLKL. A função do necrossomo é inibir a caspase-8. Subsequentemente, RIPK3 no necrossomo oligomeriza e fosforila MLKL, que vai ser translocada à membrana plasmática causando danos e consequentemente ativando o processo de necroptose, ou também pode interagir com PGAM5 na membrana mitocondrial ativando o fator de fissão mitocondrial Drp1 que induz o processo de necroptose. Assim, por exemplo, nas vias de sinalização de Fas/TRAILR, quando cIAPs está ausente e a caspase-8 inibida, ativa-se o processo de necroptose. Esta figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com>).



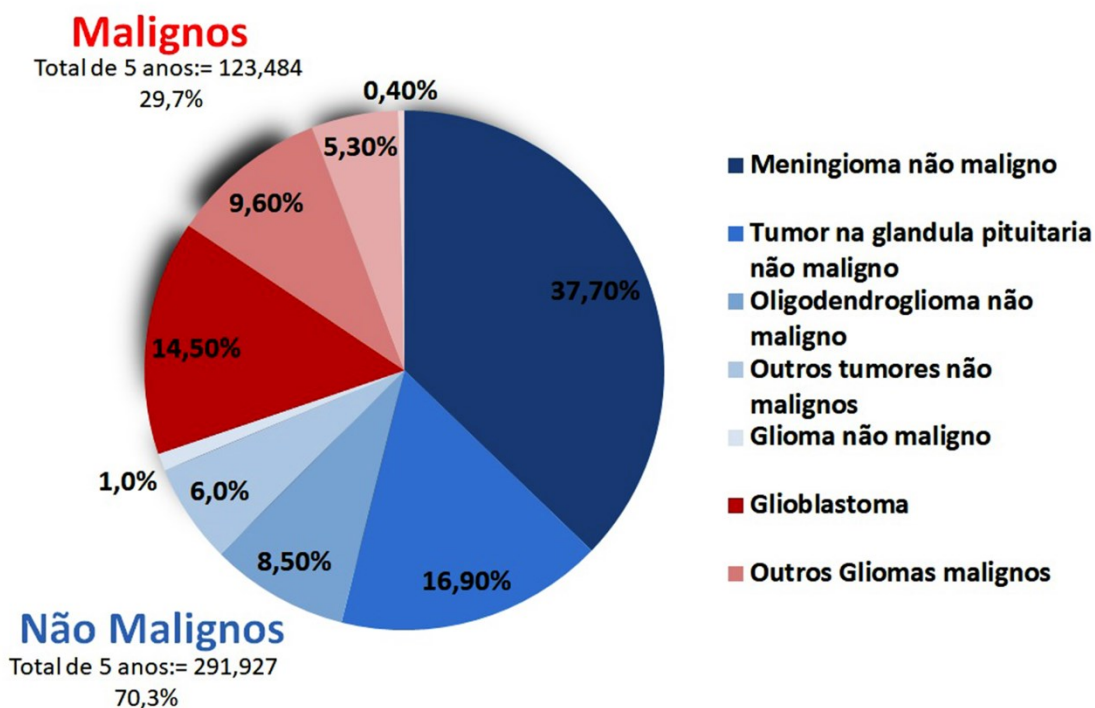
O protótipo deste tipo de morte é representado pela ação de TNF, que ativa TNFR1 levando à ativação da proteína cinase 1 de interação ao receptor (RIPK1), uma serina/treonina cinase que é ativada por fosforilação e que recruta e ativa a proteína cinase 3 de interação ao receptor (RIPK3) (CHO *et al.*, 2009). RIPK3 promove a ativação da proteína cinase de domínio de linhagem mista (MLKL), que por sua vez se associa a membrana plasmática provocando danos e morte da célula (CHEN, QI; KANG; FU, 2018; GALLUZZI, LORENZO *et al.*, 2017; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; NEWTON *et al.*, 2014).

2.4 Sinalização celular em Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores primários do SNC contribuem significativamente na morbidade de todos os grupos de idade. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os tumores do SNC representam de 1,4 a 1,8% dos tumores malignos no mundo sendo que 88% dos tumores do SNC têm incidência no encéfalo (INCA, 2020). O registro mais utilizado para conhecer a incidência mundial dos tumores cerebrais é o CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the

United State/Registro dos tumores cerebrais dos Estados Unidos) que recompila dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do Programa Nacional de Registro do Câncer e do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos. Segundo seu último informe, período 2013-2017 (OSTROM *et al.*, 2020), a taxa média anual de incidência dos tumores cerebrais malignos, não malignos e outros tumores do SNC foi de 23,79 pacientes por 100.000 habitantes (Fig. 6). As taxas tiveram variações em relação ao sexo e etnias, sendo maior no sexo feminino que no masculino (26,31 vs 21,09), em brancos que em negros (23,88 vs 23,83) e em não hispânicos em comparação com os hispânicos (24,23 vs 21,24). Aproximadamente 29,7% dos tumores cerebrais e outros tumores do SNC foram malignos enquanto 70,3% foram não malignos. O glioblastoma multiforme (GBM) o tumor de maior ocorrência dentre os tumores cerebrais e do SNC (14,5% de todos os tumores e 48,8% dos tumores malignos).

Figura 6. Distribuição dos tumores cerebrais e outros tumores do SNC. Total de 5 anos = 415.411 por 100.000 habitantes; média anual de casos = 83.082. CBTRUS Statistical Report: US Cancer Statistical – NPCR and SEER, 2013-2017.



Fonte: (OSTROM *et al.*, 2020).

Os tumores cerebrais apresentam características heterogêneas, com grandes variações quanto a sua origem, características morfológicas, alterações genéticas, crescimento, capacidade de invasão, assim como sua resposta frente aos tratamentos e sua propensão à reincidência (LOUIS *et al.*, 2007, 2016; OSTROM *et al.*, 2018). Estes tumores representam

um tipo de neoplasia de maior desafio em relação a terapia (RÍOS-MARCO *et al.*, 2015), sendo os gliomas responsáveis por 80% dos tumores primários no SNC (CHERRY; STELLA, 2014).

Os gliomas são tumores intracerebrais derivados das células da glia, classificados histologicamente de acordo com as semelhanças das células neoplásicas às células gliais precursoras e os relativos graus de malignidade (BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017). Assim, os astrocitomas são derivados de astócitos, oligodendrogliomas derivado de oligodendrócitos, ependimomas derivados de células ependimais e oligoastrocitoma que representam uma mistura de astrócitos e oligodendrócitos neoplásicos (LE MERCIER *et al.*, 2010; LOUIS *et al.*, 2007).

Os gliomas caracterizam-se por serem altamente heterogêneos em relação ao seu perfil genotípico e fenotípico, quanto a sua apresentação clínica. Do ponto de vista epidemiológico, o glioma é o tumor primário intracerebral de maior incidência e agressividade em humanos. Correspondem a 20% dos tumores cerebrais primários e 80% dos tumores primários malignos localizados no cérebro de humanos adultos (HANIF *et al.*, 2017; OSTROM *et al.*, 2018). Em decorrência destas variações genéticas, morfológicas e clínicas, surgiu a necessidade de criação de um esquema de estratificação para padronizar a comunicação e o plano de tratamento dos subtipos de glioma. Para isso, a OMS desenvolveu um sistema de classificação em quatro graus, baseado na malignidade segundo a histologia, localização, distribuição e comportamento (CAIRNCROSS *et al.*, 2006; D'HAENE *et al.*, 2014; LOUIS *et al.*, 2007; ROUSSEAU; MOKHTARI; DUYCKAERTS, 2008; SANSON *et al.*, 2009). Os gliomas de grau I em geral são circunscritos e apresentam um comportamento benigno comparado com os de grau II até IV, classificados como malignos por seu comportamento invasivo no cérebro (LE MERCIER *et al.*, 2010; LOUIS *et al.*, 2007). Nos últimos anos, com o avanço das técnicas de biologia molecular, foi desenvolvido um sistema de classificação tendo em conta também o perfil de expressão de alguns genes específicos (PISAPIA, 2017; REIFENBERGER *et al.*, 2017; WESSELING; CAPPER, 2018; YANG, PEI *et al.*, 2016).

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de glioma mais agressivo e frequente dentre os astrocitomas primários, representando 57,7% dos casos de tumores cerebrais malignos (HANIF *et al.*, 2017; OSTROM *et al.*, 2018, 2020). Caracteriza-se por apresentar alto grau de heterogeneidade inter e intratumoral e instabilidade genética, classificado pela OMS como grau IV (M. STRIK *et al.*, 2012; NUTT; MATTHEWS; HOCKFIELD, 2001; PARKER *et al.*, 2016; WOJTON; MEISEN; KAUR, 2016). Importante ressaltar que 90% dos

casos de GBM é originado de *novos*, como um tumor primário caracterizado por vários aspectos, que incluem: amplificação do gene EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal, do inglês *epidermal growth factor receptor*), perda da heterozigose (LOH) do cromossomo 10q, inativação do gene p16INK4A, conjuntamente com mutações e deleções no gene supressor do tumor PTEN. Porém, cerca de 5% dos casos o GBM pode ser originado como tumor secundário a partir de gliomas de grau II ou III, apresentando na maioria das vezes a enzima NADP⁺-dependente IDH1/2 (do inglês *isocitrate dehydrogenase*) mutada e caracterizando-se por apresentar mutações na proteína tumoral 53 (p53), que não é habitual de ser observado nos tumores primários (SASMITA; WONG; LING, 2018).

A massa tumoral do GBM encontra-se construída por uma população densa de células monomórficas pequenas, arredondadas e ligeiramente alongadas com núcleo grande e hipercromático (CHERAY *et al.*, 2011; KHASRAW; LASSMAN, 2010; LOUIS *et al.*, 2007; M. STRIK *et al.*, 2012). Os fenótipos celulares observados no GBM demonstram uma conexão entre o gene mutado e a modificação das principais vias de sobrevivência das células, incluindo as vias PI3K/PTEN-Akt-mTORC1 e MAPK (BRENNAN *et al.*, 2013; IVANOV; WU; HEI, 2017). Dentro deste contexto, parece que a capacidade de invadir o tecido envolve principalmente a ativação de Akt, refletindo as características de invasividade, migração e tumorigênese, enquanto a ativação de ERK levaria primariamente à proliferação celular e microvascular (AROUI *et al.*, 2016; CHEN, WEN-LIANG *et al.*, 2015; JURATLI; SCHACKERT; KREX, 2013; KANE, 2019; PONTES *et al.*, 2012; THEELER; GILBERT, 2015).

As células do GBM apresentam habilidade de auto-renovação e características indiferenciadas pela presença de subpopulação de células-tronco de glioma (GSCs), as quais são muito similares às células tronco neurais (NSCs) da zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e da zona subgranular (ZSG) do hipocampo. Inclusive, existe a hipótese de que poderiam dar origem às células tumorais, além do fato de vários genes utilizados no diagnóstico encontram-se altamente expressos nas células tronco, como por exemplo, PPEF1, ENPP1, PTPN9, PP4C e PPP2R2A (BAGERITZ *et al.*, 2014; LIEBELT *et al.*, 2016; LIM *et al.*, 2007; LIU, HE; SONG, 2016; MARTINEZ-LOPEZ *et al.*, 2013; SANAI; ALVAREZ-BUYLLA; BERGER, 2005).

Notavelmente, esses tumores apresentam resistência à quimioterapia e radioterapia e consequentemente alta taxa de recorrência (BAO *et al.*, 2006; LIEBELT *et al.*, 2016), existindo evidência na literatura que a co-expressão das proteínas de membrana CD24, CD44 e CD133, assim como Hes3⁺ (do inglês *Hes family bHLH transcription factor 3*) e nestina nas

GSC se relaciona a um prognóstico desfavorável, conferindo às células capacidade de sobrevivência frente aos tratamentos convencionais (MANNINO; CHALMERS, 2011; STOYANOV *et al.*, 2018; STROJNIK *et al.*, 2007; ZHANG, MINGYU *et al.*, 2008). Além disso, a expressão de CD133 correlaciona-se com um aumento do nível de HIF2 α (fator induzível de hipóxia) (MANNINO; CHALMERS, 2011; ZEPPERLICK *et al.*, 2008) que ativa a transcrição de genes responsáveis por codificar fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (CHEN, WEN-LIANG *et al.*, 2015; GOFFART; KROONEN; ROGISTER, 2013; KANE, 2019), estimulando o crescimento de novos vasos sanguíneos que ajudam no suprimento de oxigênio e nutrientes, sendo este processo uma possível via de escape de células cancerosas para formarem metástase (BENDAS; BORSIG, 2012; ROY, DEBARUN *et al.*, 2016).

Verhaak e colaboradores em 2010 dividiram o GBM em quatro subtipos. O subtipo clássico, representando 27% desses cânceres, caracteriza-se por apresentar deleções nos genes PTEN (que degrada PIP3) e um aumento na expressão do EGFR, juntamente com uma mutação, originando um receptor constitutivamente ativo, o EGFRvIII, que conduz a ativação de vias de sinalização pró-migratórias e proliferativas, exercendo um papel crucial no desenvolvimento de várias neoplasias (ALDAPE *et al.*, 2004; HANIF *et al.*, 2017; ZHANG, MINGYU *et al.*, 2008). O subtipo mesenquimal, compreende 29%, caracterizado pela mutação e deleção de NF1 (gene supressor do tumor de neurofibromatose 1) um regulador negativo da proteína Ras e PTEN, ambos importantes na via *downstream* dos RTKs, levando a ativação de fosfoinositol-3-cinase (PI3K) (HANIF *et al.*, 2017; VERHAAK *et al.*, 2010). E no subtipo pró-neural, representando 28% dos GBM, ocorre uma mutação no gene supressor de tumor p53 e uma amplificação do receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), o qual leva a ativação de vias de crescimento mitogênicas (CHERRY; STELLA, 2014; HANIF *et al.*, 2017). Por último, o subtipo neural, compreendendo apenas 16% dos GBM, é definido pela presença de marcadores neurais como NEFL (polipeptídeo de neurofilamento leve), subunidade $\alpha 1$ de receptor GABA (GABRA1) e sinaptotagmina 1 (SYT-1) (CHERRY; STELLA, 2014; HANIF *et al.*, 2017). Como podem ser observados, os diferentes subtipos apresentam desregulação na sinalização RTK, representando marcadores adquiridos de malignidade (CHERRY; STELLA, 2014).

Além das mutações nos RTK, foi observado que receptores de quimiocinas do tipo 4 e 7 (CXCR 4 e CXCR7) encontram-se superexpressos em diversas linhagens tumorais incluindo as de GBM, nas quais medeiam respostas proliferativas e migratórias (CHERRY; STELLA, 2014; RUBIN *et al.*, 2003). Em tecidos extraídos de pacientes com GBM, CXCR4

aumenta sua expressão na área de hipóxia favorecendo a angiogênese (CALATOZZOLO *et al.*, 2011; EHTESHAM *et al.*, 2013).

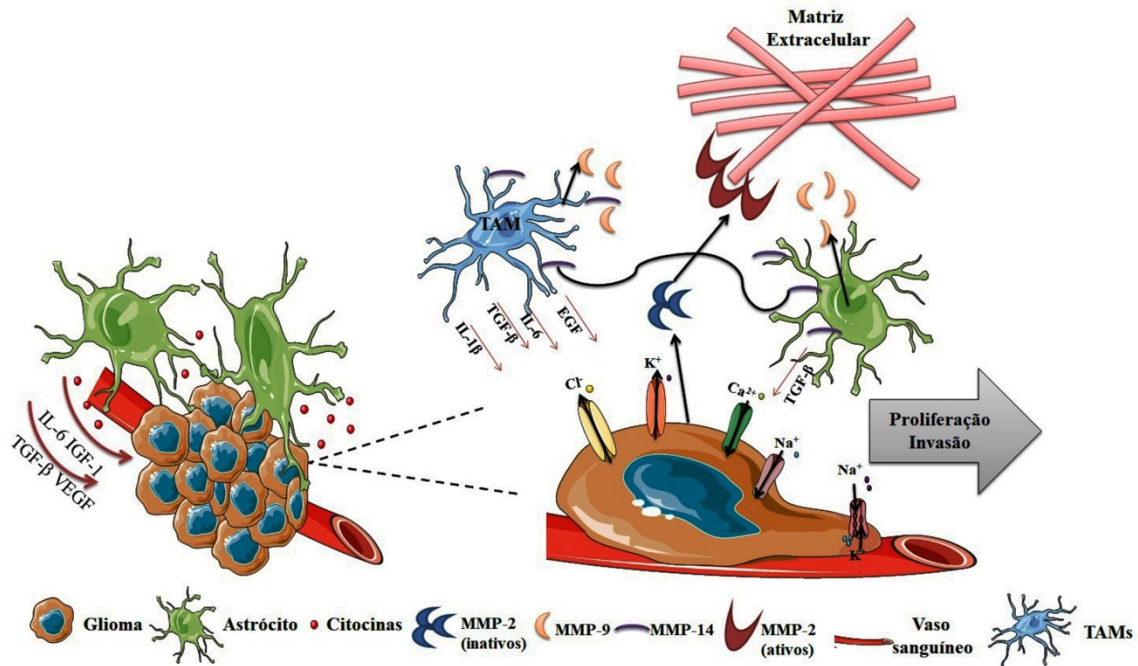
Estudos prévios demonstram, que as enzimas glicosil transferases, glicosil hidrolases e os genes que regulam a sua expressão, também apresentam uma significativa alteração na transformação oncogênica das GSCs (BURCHELL, 2003; CHAKRABORTY; PAWELEK, 2003; DRINNAN; HALLIDAY; RAMSDALE, 2003; MOSKAL; KROES; DAWSON, 2009). A análise de 119 linhagens de cânceres humanos, mostrou que a síntese de mRNA da enzima de O-glicosilação, ppGalNacT-12, encontra-se correlacionado com a sensibilidade à morte celular das células tumorais ($p < 0,0003$; $n=87$). Importante ressaltar que a alteração na O-glicosilação dos receptores de morte celular nas células tumorais pode modular a sensibilidade de Apo2L/TRAIL, considerando que este processo pode regular a aglomeração dos receptores e conseqüentemente ativação de caspase-8 (WAGNER, KLAUS W. *et al.*, 2007). Neste sentido, quando comparadas com células normais do encéfalo, observa-se nas células tumorais um incremento significativo principalmente β -galactose e/ou β -GalNac nas glicoproteínas do glicocálix (HE; LEVINE, 2010; MOSKAL; KROES; DAWSON, 2009; XU, SONGLI *et al.*, 2001). Este padrão de glicosilação alterado modula a função de receptores de morte celular, por dificultar estericamente a união ao seu ligante (LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013; LIU, B.; WEN; CHENG, 2013; MORIWAKI; SHINZAKI; MIYOSHI, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2018; SHATNYEVA *et al.*, 2011).

Porém, não são somente as características biológicas das células de GBM que contribuem na progressão do tumor. O microambiente tumoral dos gliomas (Fig. 7), além das células cancerígenas, também conta com diferentes tipos de células sadias, que participam ativamente no processo de tumorigênese, progressão, invasão, angiogênese e resistência ao tratamento (GUAN *et al.*, 2018; QUAIL; JOYCE, 2017). Vários desses tipos de células encontram-se aumentadas nos tumores cerebrais, sendo consideradas como importantes marcadores de diferenciação entre um cérebro normal e um tecido cancerígeno. Assim, é muito importante a composição da MEC onde residem diferentes tipos de células que são fisicamente protegidos da circulação periférica pela barreira hematoencefálica (BHE). Durante muitos anos o cérebro foi considerado um órgão “privilegiado imunologicamente” por estar protegido de diferentes reações e/ou a entrada de células imunes (ENGELHARDT; VAJKOCZY; WELLER, 2017). Entretanto, hoje é bem reconhecido que a atividade das células imunes produzem fatores inflamatórios que podem atravessar a BHE e serem citotóxicos e até neurodegenerativos (ENGELHARDT; VAJKOCZY; WELLER, 2017; WALKER, 2019).

Em alguns tumores cerebrais, a BHE encontra-se comprometida pela ativação de astrócitos (GUAN *et al.*, 2018) o qual leva a uma robusta infiltração de múltiplos tipos de células imunes da circulação periférica (QUAIL; JOYCE, 2017). Assim, 40-50% da massa tumoral é constituída de astrócitos reativos, micróglia e macrófagos infiltrados, sendo importante ressaltar que num cérebro saudável a micróglia representa de 10 a 15% da massa cerebral (GRAEBER; SCHEITHAUER; KREUTZBERG, 2002; GUAN *et al.*, 2018). Diversas evidências têm demonstrado que estes macrófagos infiltrados no interior do tumor teriam a capacidade de ativar a expressão de genes específicos da micróglia como *Cx3cr1* (BOWMAN *et al.*, 2016; HAMBARDZUMYAN; GUTMANN; KETTENMANN, 2016; RESENDE *et al.*, 2016). Além disso, esta população de macrófagos associados ao tumor ou TAMs, podem auxiliar na degradação da MEC e da MB pela ativação e liberação principalmente de MMP-2 e MMP-9 (AROUI *et al.*, 2016; KUMAR, ANUPMA *et al.*, 2010; M. STRIK *et al.*, 2012; NAMBIAR *et al.*, 2016), processo associado à angiogênese e resistência às terapias anti-angiogênicas, contribuindo na colonização e difusão tumoral (BUONFIGLIOLI; HAMBARDZUMYAN, 2021; QUAIL; JOYCE, 2017).

Outro dado importante a ressaltar é o papel dos astrócitos reativos que interagem com a massa tumoral mediante junções comunicantes e integrinas, estimulando a capacidade de proliferação através da secreção de SDF1 (do inglês *cell-derived factor-1*) que modula a via NF- κ B e a liberação de IL-6 (interleucina 6, um fator pró-oncogênico), ativando a via STAT3 e as vias PI3K/Akt ou Akt/p38^{MAPK}/ERK nas células de GBM, dessa forma incrementando a capacidade de migração e invasão por aumentar a expressão de MMP-14, MMP-2 e MMP-9 (BUONFIGLIOLI; HAMBARDZUMYAN, 2021; GUAN *et al.*, 2018). O crescimento da massa tumoral de GBM também é estimulado pela interação com os astrócitos através de canais iônicos e transportadores de íons, os quais desempenham um papel importante na manutenção da homeostase iônica, estabelecendo o potencial da membrana, regulando o volume celular, pressão osmótica, e equilíbrio ácido-base em condições fisiológicas. Estudos recentes mostraram que a expressão e ativação dos canais de Ca²⁺ e K⁺ regulam o influxo ou efluxo destes íons e estão envolvidos na proliferação, migração, e sobrevivência do glioma (BUONFIGLIOLI; HAMBARDZUMYAN, 2021; GUAN *et al.*, 2018).

Figura 7. Representação esquemática do microambiente tumoral dos gliomas. Os astrócitos associados aos gliomas interagem de forma complexa com as células da massa tumoral, endotélio e microambiente tumoral para liberar citocinas que ajudam na proliferação, invasão e resistência ao tratamento. Além das junções comunicantes, canais iônicos e transportadores de íons desempenham funções fundamentais na progressão, metástase e tumorigênese do GBM. As células TAM (macrófagos associados ao tumor) e as células da micróglia também segregam citocinas que promovem a invasão das células de glioma. Tanto os astrócitos reativos, a micróglia e as TAMs segregam TGF- β , que desencadeia a liberação de pró-MMP2 pelas células de glioma. A pró-MMP2 é clivada e ativada a MMP2 pela MMP-14 expressa na membrana da micróglia e astrócitos. Desse modo, os astrócitos e TAM ajudariam na degradação da MEC e da membrana basal segregando MMP-9 ativa. Esta figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com>).



Considerando todos esses fatos se faz necessário o desenvolvimento de novos compostos antiglioma capazes de sobrepor as respostas de sobrevivência das células cancerígenas e sua interação com o microambiente tumoral (MESSAOUDI; CLAVREUL; LAGARCE, 2015; SHI; LI; ZHAN, 2017; WAIT *et al.*, 2015).

2.4.1 Tratamentos

Os pacientes de GBM apresentam distúrbios neurológicos progressivos e os sintomas comumente apresentados incluem dor de cabeça, aumento da pressão intracraniana e crises epiléticas secundárias (GUAN *et al.*, 2018). Sendo os tratamentos atualmente disponíveis a cirurgia de resseção total ou subtotal, radioterapia padrão ou de curta duração, terapia antiangiogênica, terapia gênica, tratamento com esteróides, além dos agentes alquilantes utilizados como drogas anticancerígenas sintéticas: carmustatina (BCNU), lomustatina (CCNU), nimustatina (ACNU) e temozolomida (TMZ) (LANZETTA; MINNITI, 2010; THEELER; GILBERT, 2015; THUMMA *et al.*, 2012). Sendo o tratamento padrão: a resseção cirúrgica, seguido por seis meses de radioterapia e quimioterapia sistêmica concomitante, com

agente alquilante TMZ, que será mantido como tratamento adjuvante pelo período mínimo de seis meses (6 -12 ciclos) (BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017; BRYUKHOVETSKIY *et al.*, 2017; KUMAR A; ABRAHAM KOSHY, 2017).

Badke e colaboradores na sua revisão publicada no ano de 2014 sobre tratamentos e abordagem cirúrgica (BADKE *et al.*, 2014) discutem que os objetivos da ressecção do tumor incluem: descompressão do órgão, alívio dos sintomas, redução da massa tumoral, realização do diagnóstico histopatológico e melhorias nas taxas de sobrevivências. Relatos de casos clínicos têm demonstrado que a ressecção de mais de 98% do volume tumoral mostra ser benéfica, na medida em que aumenta a eficácia das terapias adjuvantes e proporciona maior amostra para as análises histopatológicas (HERVEY-JUMPER; BERGER, 2014; LANZETTA; MINNITI, 2010). Ressecções menores parecem em geral proporcionar sobrevivência semelhante à dos pacientes não abordados, e têm riscos de exacerbar o edema tecidual e de levar a sangramento no pós-operatório (HENTSCHEL; LANG, 2003; PANG *et al.*, 2007).

Em termos anatômicos o GBM se localiza principalmente na substância branca subcortical, sendo que as regiões mais frequentemente acometidas são os lóbulos temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%), occipital (16%) bem como em combinação fronto-temporal. Além de poder atingir mais de um lobo causando assimetria dos hemisférios, alargamento dos giros e distorção dos ventrículos (BADKE *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2012). A propriedade infiltrativa das células cancerígenas torna impossível a ressecção total sem que haja dano neurológico no paciente, aumentando a probabilidade de uma possível recorrências do tumor a cada 6 meses (BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017).

A radioterapia, utilizada pela primeira vez em 1951, baseia-se na incidência de grandes doses de feixes de radiações de alta energia sobre um pequeno local; também tem sido utilizada como uma opção terapêutica (BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017; SKEIE *et al.*, 2012). Sendo importante ressaltar que apesar de ser um tratamento de primeira linha, foi observado que a irradiação, mesmo em dose baixa (≤ 10 Gy) pode provocar alterações histopatológicas mínimas, mas suficientes para acarretar graus variáveis de disfunção cognitiva associada ao esgotamento das células estaminais neurais (ACHARYA *et al.*, 2010; GREENE-SCHLOESSER *et al.*, 2012; VAN KESSEL *et al.*, 2017). Análises recentes de retrospectiva mostraram que a radioterapia + TMZ aumenta a sobrevida média dos pacientes (BADKE *et al.*, 2014; BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017; PERRY *et al.*, 2008; SKEIE *et al.*, 2012).

Entre os anos 1990 e 2000, a TMZ foi considerada a droga mais promissora no tratamento contra GBM (DRESEMANN, 2010), por observar-se um aumento em aproximadamente 2,5 meses da sobrevida dos pacientes (STUPP *et al.*, 2009). O fármaco é classificado como um agente alquilante de segunda geração e com moderada toxicidade, pode ser administrado via oral e atua como um pró-fármaco estável em pH ácido e que sofre transformação química no pH fisiológico resultando um composto quimicamente ativo (NEWLANDS *et al.*, 1992). Considerando que é uma substância lipofílica de baixa massa molecular (194,15 g/mol), possui a capacidade de atravessar integralmente a BHE, alcançando os tumores intracerebrais com uma meia vida no plasma de 1,8 horas em pH 7,4 (BADKE *et al.*, 2014; NAGASAWA *et al.*, 2012; NEWLANDS *et al.*, 1992; TSANG *et al.*, 1990).

Assim, no pH fisiológico, a TMZ é rapidamente absorvida, sofrendo hidrólise espontânea para formar o composto ativo: monometil triazeno 5-(3-metiltriazeno-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC). A função do MTIC é adicionar um grupo metil no DNA nas posições N⁷ e O⁶ da guanina e N³ da adenina (BADKE *et al.*, 2014; DENNY *et al.*, 1994; MUTTER; STUPP, 2006; NEWLANDS *et al.*, 1992; ZHANG, JIHONG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012). Esta metilação do DNA é o mecanismo responsável pela citotoxicidade nas células malignas. Nesse sentido, a metilação N³-metiladenina (N³-metil-A) leva a uma lesão geralmente considerada altamente citotóxica, devido a sua capacidade de bloquear a duplicação do DNA após sua interação com as DNA polimerases induzindo trocas entre cromátides irmãs (SCE – *Sister Chromatid Exchanges*), quebras e *gaps* cromossômicos, bloqueio na fase S do ciclo celular e consequentemente ativação dos processos apoptóticos (ENGELWARD *et al.*, 1998; FRONZA; GOLD, 2004). Em relação a base nitrogenada guanina, embora a maioria das lesões ocorra na posição N⁷ (N⁷-metil-G), o produto de metilação O⁶-metilguanina (O⁶-metil-G) é a principal responsável pelos efeitos mutagênicos e citotóxicos provocados por agentes alquilantes (BERANEK, 1990).

Embora o tratamento com TMZ prolongue significativamente a sobrevida dos pacientes, esta não excede 12 ou 15 meses de vida (BRYUKHOVETSKIY *et al.*, 2017; KUMAR A; ABRAHAM KOSHY, 2017; RAMALINGAM; BELANI, 2008; STUPP *et al.*, 2009). O mecanismo de ação da TMZ acaba ativando diversas vias de sinalização, incluindo: PI3K/Akt, envolvida na capacidade tumorigênica e invasiva das células cancerígenas; ERK1/2, envolvida na proliferação celular. Em conjunto, algumas destas alterações podem levar por consequência a ativação de mecanismos de resistência das células cancerígenas frente ao fármaco (BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017; KLEIHUES; SOBIN, 2000).

Várias vias de reparo do DNA encontram-se envolvidas na resistência das células de GBM frente às lesões de base induzidas pela TMZ (YOSHIMOTO *et al.*, 2012). Dentre elas, a mais bem caracterizada é a mediada pela enzima metil-guanina-metil-transferase (MGMT), uma proteína monomérica de 22 KDa, que desmetila O⁶-metil-G mediante a transferência do grupo metil para um resíduo interno de cisteína (KAINA *et al.*, 2007; MITRA, 2007; SILBER *et al.*, 2012; TUBBS; PEGG; TAINER, 2007). Entretanto, esta modificação do sítio ativo da enzima pode ser removida, sendo ubiquitinada e degradada após a remoção do grupo alquila. Dessa forma, este mecanismo ‘suicida’ dependerá da taxa de sínteses de *novos* desta enzima, a qual é relativamente restrita (TUBBS; PEGG; TAINER, 2007). Contudo foi observado aumento da atividade de MGMT em tumores de colón, pulmão, mama e ovário (KAINA *et al.*, 2007); enquanto que nas células de GBM foi observada uma correlação entre a expressão aumentada de MGMT com a ausência de resposta dos gliomas ao tratamento com TMZ (FRUEHAUF *et al.*, 2006; HERMISSON *et al.*, 2006; KUMAR A; ABRAHAM KOSHY, 2017; MA *et al.*, 2002; VAN NIFTERIK *et al.*, 2010).

Outro mecanismo de reparo de O⁶-metil-G relacionado com a resistência à TMZ decorre do reparo *mismatch* (MMR-DNA *mismatch repair*), que ocorre quando a MGMT não chegou a reparar o DNA antes da duplicação (YOSHIMOTO *et al.*, 2012). Assim, as lesões O⁶-metil-G não reparadas podem parear erroneamente no momento de duplicação do DNA com citosina (C) ou timidina (T). As O⁶-Metil/C ou O⁶-Metil/T são reconhecidas pelo sistema MMR, gerando uma cisão na fita recém-sintetizada, mas sendo mantida intacta a lesão O⁶-Metil-G produzida pelo agente alquilante. Este processo pode acionar outras vias de reparo e/ou vias apoptóticas (BIGNAMI *et al.*, 2000; KAINA *et al.*, 2007). Esta função normal da via de reparo MMR é pré-requisito para a citotoxicidade induzida pela lesão O⁶-Metil-G, e sua inativação tem sido associada com a tolerância aos efeitos de agentes alquilantes (KINSELLA, 2009).

As lesões do tipo N⁷-metil-G, N³-metil-A compreendem mais de 80% das lesões induzidas pela TMZ as quais são eficientemente removidas do DNA pela via de reparo por excisão de bases (BER – Base Excision Repair), que consiste na substituição de nucleotídeos de base danificada (DIANOV; HÜBSCHER, 2013; PARSONS; DIANOV, 2013; TENTORI; GRAZIANI, 2009). No caso da TMZ, a porcentagem de N³-metil-A gerada é baixa, sendo eficientemente reparada pela via BER antes de se tornarem letais para a célula cancerígena. Entretanto, a ausência do mecanismo de reparo pode aumentar o efeito citotóxico do fármaco (SOBOL *et al.*, 1996; ZHANG, JIHONG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012).

Conjuntamente aos mecanismos de resistência das células de GBM frente aos tratamentos de radioterapia e quimioterapia com TMZ, foi observado que as junções comunicantes *gap* (GJC, do inglês *Gap junction communication*), entre as células de glioma e os astrócitos no microambiente tumoral, são importantes na resistência frente ao tratamento. Assim, os astrócitos reativos expressam um aumento de Cx43 modulando os níveis de Bcl-2 e Bax, inibindo a ativação da via apoptótica intrínseca, por bloquear a liberação do citocromo c. Adicionalmente, podem estimular a expressão de EGFR na superfície das células tumorais, com consequente ativação das vias JNK e ERK que levam a modulação do fator de transcrição AP1 (GUAN *et al.*, 2018).

Conforme o exposto, apesar da citotoxicidade dos tratamentos utilizados convencionalmente frente ao GBM, os mecanismos que promovem a sobrevivência/resistência das células tratadas apresentam um impacto negativo na eficácia do tratamento, considerando que cerca de 50% dos pacientes com GBM não respondem ao tratamento ou respondem por um curto prazo (AVGEROPOULOS; BATCHELOR, 1999; BUONFIGLIOLI; HAMBARDZUMYAN, 2021; GUAN *et al.*, 2018; MADHUSUDAN; HICKSON, 2005; PRADOS, 2001). Assim, se torna necessário a investigação de novos compostos capazes de controlar a quimiorresistência característico das células de GBM (BRYUKHOVETSKIY *et al.*, 2017) ou de compostos que possam ser utilizados como coadjuvantes ao tratamento. Como por exemplo, o estudo “*A phase II trial of arsenic trioxide and temozolomide in combination with radiation therapy for patients with malignant gliomas*” (KUMTHEKAR *et al.*, 2017) que utiliza o trióxido de arsênio como agente sinérgico à radioterapia ou o estudo “*Phase I trial of dimethyl fumarate, temozolomide, and radiation therapy in glioblastoma*” (SHAFER *et al.*, 2020) que utiliza o fumarato de dimetila como coadjuvante do tratamento.

Dentro desses paradigmas, têm sido investigadas novas moléculas bioativas tais como as lectinas, um grupo de proteínas amplamente distribuídas na natureza que contêm pelo menos um sítio de reconhecimento a glicanos. Diversos estudos demonstraram que as lectinas podem ser utilizadas como biomarcadores, além de induzir efeitos citotóxicos sobre células tumorais humanas (AKLA; PRATT; ANNABI, 2012; BHUTIA *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA FIGUEIROA *et al.*, 2017; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; NANNI *et al.*, 2016; PRASANNA; VENKATESH, 2015; PRATT; ANNABI, 2014; XIAO, XIUQING *et al.*, 2015). O efeito das lectinas tem sido relacionado à sua capacidade de interagir com o estado de glicosilação anormal de glicolípidos e/ou glicoproteínas nas células tumorais (BHUTIA *et al.*, 2019; DAWSON; MOSKAL; DAWSON, 2004; HAKOMORI, 2002;

JIANG, LI-CHENG *et al.*, 2015; PINTO-JUNIOR, VANIR REIS *et al.*, 2017; YAU *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2010).

2.5 Lectinas

As lectinas representam um grupo de proteínas que vem sendo estudadas e caracterizadas a mais de 40 anos (RYVA *et al.*, 2019). A primeira lectina a ser descrita na literatura foi em 1888 quando Peter Hermann Stillmark publicou a propriedade hemaglutinante da ricina, uma lectina tóxica presente nas sementes de mamona (*Ricinus communis*) (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004; VAN DAMME *et al.*, 2003).

As lectinas encontram-se amplamente distribuídas na natureza e contêm pelo menos um domínio não catalítico de reconhecimento a carboidratos (CRD), através do qual são capazes de reconhecer e de se ligar reversivelmente, de maneira específica, a carboidratos de glicoproteínas, proteoglicanos e glicolípidos, bem como a monossacarídeos solúveis ou glicoconjugados, sem modificar a estrutura do açúcar ao qual se ligam (JIANG, Q.-L. *et al.*, 2015; LIU, Z. *et al.*, 2013; SINGH, SUSHMA; SINGH, 1999; VAN DAMME *et al.*, 2003). Conforme essa característica, as lectinas são capazes de decodificar a informação contida no glicocálix da superfície celular e podem regular a homeostase celular mediante a modulação de sinais, incluindo tráfego e endocitose de receptores (FUSTER; ESKO, 2005; HERNANDEZ; BAUM, 2002; LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013).

As lectinas encontradas nos animais são classificadas em lectinas tipo C ou tipo R, galectinas e lectinas intracelulares pertencentes à família calnexina (tipo M, tipo L e tipo P) (GUPTA, 2012; ROY, DEBARUN *et al.*, 2016). Estas proteínas estão envolvidas em diversos processos, incluindo: interações célula-célula e célula- MEC, interações entre gametas na fertilização, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interações de patógenos, dobramento e rotação de glicoproteínas, indução mitogênica bem como nos processos de tumorigênese e metástase (D'HAENE *et al.*, 2014; DRICKAMER; TAYLOR, 1993; JIANG, XIAO NING *et al.*, 2019; ROY, DEBARUN *et al.*, 2016). Há muitos dados na literatura mostrando que um aumento particularmente das galectinas-1, -3, -4 e -8 nas células de GBM contribuem na migração e proliferação celular (LE MERCIER *et al.*, 2010; M. STRIK *et al.*, 2012; RORIVE *et al.*, 2001; STRIK *et al.*, 2001; STRIK; HOFFMANN, 2008).

Não obstante, as lectinas extraídas de plantas compreendem um grupo de proteínas homólogas, as quais apresentam funções que incluem proteção contra potenciais agentes

patogênicos ou para evitar predadores (YAU *et al.*, 2015). Segundo a estrutura e especificidade de seus domínios podem ser classificados em quatro grupos, apresentados na Tabela 2, e segundo sua estrutura molecular em seis famílias de lectinas apresentados na Tabela 3.

Tabela 2. Classificação das lectinas vegetais em função dos seus domínios.

Tipo de lectina	Definição
Merolectinas	Possuem um domínio único de ligação a carboidratos, são monovalentes, portanto, não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.
Hololectinas	Contém pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos homólogos ou estruturalmente semelhantes. São di- ou multivalente, dessa forma podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.
Quimerolectinas	São proteínas de fusão que consistem em um domínio de ligação a carboidratos e um domínio enzimático bem definido, ou um domínio com atividade biológica que atua independentemente do domínio de ligação a carboidratos. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos podem se comportar como merolectinas ou hololectinas.
Superlectinas	Contém pelo menos dois ou mais domínios de ligação a carboidratos estruturalmente não relacionados. Também podem ser considerados um grupo especial de quimerolectinas.

Fonte: (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Tabela 3. Classificação das lectinas vegetais com base na sua sequencia estrutural.

Família de lectinas	Definição
Lectinas de leguminosas	Representa a família mais estudada, geralmente constituídas por duas ou quatro subunidades idênticas de 25 a 30 KDa. Cada subunidade contém um sítio de união para íons metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} . Cada subunidade contém aproximadamente 250 aminoácidos e apresenta grande homologia umas as outras. São constituídas por 12 folhas β antiparalelas conectadas mediante dobras, gerando uma estrutura aplanada, com quatro dobras localizadas nas extremidades do monômero e que formam o sítio de reconhecimento a carboidratos.
Lectinas de ligação a quitina	Seus membros geralmente apresentam duas subunidades idênticas ricas em cistina. Uma subunidade está constituída por quatro domínios tipo heveína, contendo quatro pontes dissulfetos. Não há estruturas secundárias regulares, com exceção de uma pequena α hélice de cinco resíduos. Cada domínio apresenta um sítio de reconhecimento a carboidratos, que não precisam de íons metálicos.
Lectinas de monocotiledôneas específicas de manose	Pertencem às orquídeas, alho e amarílis, com sequências de aminoácidos altamente conservados. São lectinas tetraméricas, cada monômero tem peso molecular de 12 KDa, assim como uma sequência de 36 aminoácidos repetidos três vezes. O sítio de reconhecimento a carboidratos é constituído por quatro folhas β antiparalelas unidas por dobras. O conjunto se associa formando uma coroa aplanada, apresentando um grande túnel central.
Lectinas tipo Jacalina ou forma de prisma β	São lectinas tetraméricas glicosiladas onde cada subunidade contém uma cadeia pesada (α) e uma leve (β) e três folhas β antiparalelas arranjados como num prisma triangular.
Lectinas associadas com proteínas inativadoras de ribossomo	Estas proteínas representam um dos venenos mais tóxicos. Sua estrutura molecular é complexa. São constituídas por duas cadeias, A e B, bem diferentes e unidas por pontes dissulfeto. A cadeia A é responsável toxicidade (atividade de N-glicosidase no ribossomo, que leva à inativação da tradução), enquanto a cadeia B possui atividade de lectina. A cadeia B é constituída por dois domínios que apresentam quatro subunidades de α hélices e folhas β .
Lectinas da família Amarantina	Estas proteínas se apresentam como dímeros, onde cada monômero apresenta dois domínios (N e C), unidos por uma pequena hélice, cada domínio mostra uma conformação de tripol β semelhante à conformação observada na cadeia B da <i>Ricinus communis</i> .

Fonte: (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As lectinas de plantas têm sido estudadas sob o ponto de vista estrutural bem como em relação às atividades biológicas de importância biomédica, incluindo: aglutinação de células,

modulação de mitogenicidade, atividade insulino-mimética, atividade antifúngica e inseticida, ação anticancerígena e ação neuroprotetora (BHUTIA *et al.*, 2019; CAVADA, BENILDO *et al.*, 2018).

A subtribo *Diocleinae* da tribo *Phaseoleae* (*Leguminosae*, *Papilionoidea*) de videiras ou cipós com folhas trifolioladas e nodoso pseudoracemes (FLORES; RODRIGUES, 2017), inclui aproximadamente 40 espécies distribuídas principalmente no neotrópico, porém no Brasil são encontradas 32 espécies distribuídas nos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (FLORES; RODRIGUES, 2017; REFLORA, 2020; SCHRIRE; LEWIS; LAVIN, 2005). As suas sementes têm mostrado ser uma fonte importante de diversas lectinas, já isoladas e caracterizadas (CAVADA, B.S. *et al.*, 1994; CORREIA *et al.*, 2011; PINTO-JUNIOR, VANIR R. *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2009). Esta subtribo compreende 13 principais gêneros, dos quais *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* estão presentes na biodiversidade brasileira. A ConA isolada das sementes da leguminosa *Canavalia ensiformes*, foi a primeira lectina isolada, sequenciada e cuja estrutura foi determinada por cristalografia de raios X, publicada pela primeira vez em 1919 (CAVADA, B. *et al.*, 2001; CAVADA, BENILDO *et al.*, 2018). Após ela, 22 lectinas com similaridade na estrutura e propriedades físicas têm sido purificadas e caracterizadas por espectrometria de massa e sequenciamento gênico (CAVADA, BENILDO SOUSA; OSTERNE; LOSSIO; *et al.*, 2019). As mesmas compartilham os seguintes padrões: são compostas de dois ou quatro monômeros ligados por interações não covalentes; têm alta homologia, com massa molecular de 25-30 KDa, onde cada monômero apresenta um CRD específico para glicose/manose; exibem um equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH e propriedades físico-químicas similares (BRINDA *et al.*, 2004). No entanto, apesar da alta homologia elas diferem marcadamente quanto à atividade biológica, sendo algumas delas metaloproteínas que necessitam dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para exibir suas atividades (ASSREUY *et al.*, 2009; BARROSO-NETO *et al.*, 2014; CAVADA, B. *et al.*, 2001; PINTO-JUNIOR, VANIR R. *et al.*, 2016). As alterações nas sequências de aminoácidos relacionados com o a região do CRD e a oligomerização dependente do pH podem estar associadas com algumas das atividades das lectinas (CAVADA, BENILDO SOUSA; OSTERNE; LOSSIO; *et al.*, 2019). Um exemplo disso é a substituição de Ser202 do CRD da *Concanavalina A* (ConA) por Pro202 na lectina *Canavalia maritima* (ConM) a qual muda sua afinidade por dissacarídeos (BARROSO-NETO *et al.*, 2014; BEZERRA *et al.*, 2013).

2.5.1 Atividade antitumoral das lectinas

As lectinas extraídas de plantas possuem grande interesse farmacológico e biológico, considerando sua alta especificidade pelos glicanos e a capacidade de modular atividades celulares, como por exemplo, processos de morte celular por apoptose e autofagia (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; BHUTIA *et al.*, 2019; CAVADA, BENILDO *et al.*, 2018; JIANG, W.G. *et al.*, 2015; PINTO-JUNIOR, VANIR R. *et al.*, 2016; PRASANNA; VENKATESH, 2015; RYVA *et al.*, 2019; XIAO, XIUQING *et al.*, 2015). Estes processos se caracterizam por serem alterados e ou inibidos nas células cancerígenas, e é nesse contexto que as lectinas vêm sendo observadas com grande interesse farmacológico como potencial aplicação terapêutica. O mecanismo detalhado da atividade antitumoral das lectinas de vegetais ainda não foram bem determinadas, porém várias lectinas já apresentam registros pré-clínicos e clínicos no tratamento do câncer (BHUTIA *et al.*, 2019).

Recentemente, lectinas de plantas também foram utilizadas para desenvolver “*microarrays*” a fim de reconhecer padrões de glicosilação específicos de células tumorais malignas, auxiliando no diagnóstico do câncer (BHUTIA *et al.*, 2019; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020). Além disso, foi observado que mediante análises histoquímicas as lectinas derivadas de plantas podem servir de ferramenta para determinar a estrutura de oligossacarídeos das glicoproteínas da superfície celular. Com isso, pode ser estimado o potencial de progressão, malignidade e poder metastático de alguns tipos de tumores, considerando que a alteração do padrão de glicosilação representa uma das estratégias utilizadas pelas células cancerígenas para estimar a progressão tumoral (BHUTIA *et al.*, 2019; JACQUES *et al.*, 2013; LIU, BO; BIAN; BAO, 2010; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; MILDE-LANGOSCH *et al.*, 2015). Dentro dessa visão, foram identificadas estruturas de oligossacarídeos associados a tumores cerebrais (RODRIGUES *et al.*, 2018; TANIGUCHI *et al.*, 2019; VEILLON *et al.*, 2018) e outros tumores (BROOKS; LEATHEM, 1995; HANDERSON *et al.*, 2005).

Assim por exemplo, lectinas de origem vegetal como a Ricina e lectinas extraídas da família *Santalaceae* demonstraram possuir atividade antiproliferativa e induzir ativação dos processos apoptóticos em células de carcinoma de cólon e adenocarcinoma de pulmão (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005) como também na indução de apoptose pela via extrínseca nas células da linhagem U937 de leucemia (LYU; CHOI; PARK, 2002). Outro exemplo de lectinas com potencial anticancerígeno é a lectina de *Polygonatum cyrtonema* (PCL), com afinidade manose e ácido siálico, e a lectina *Polygonatum odoratum* (POL), com afinidade por manose, que têm sido estudadas pela capacidade de induzir processos de morte celular,

por ser internalizada ou mediante a ligação com receptores glicosilados nas células tumorais (LIU, BO *et al.*, 2009; WANG, SHU-YA *et al.*, 2011).

Uma das lectinas mais estudada em relação à propriedade anticancerígena é a ConA, isolada das sementes da leguminosa *Canavalia ensiformes*. Como já referido ConA é considerada a primeira lectina isolada, sequenciada e que teve a estrutura cristalográfica determinada (CAVADA, B. *et al.*, 2001; CAVADA, BENILDO *et al.*, 2018). Possui afinidade glicose/manose dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$, com uma estrutura tetramérica cujos monômeros contem 237 resíduos de aminoácidos (LI, WEN WEN *et al.*, 2011). Numerosos estudos na literatura têm demonstrado que ConA pode induzir morte celular por meio da via mitocondrial em diversas células tumorais como, por exemplo, na linhagem celular A375 de melanoma humano, aumentando os níveis de citocromo c citoplasmático o qual estimula as caspases-3 e 9 levando a apoptose (JIANG, LI-CHENG *et al.*, 2015; LI, WEN WEN *et al.*, 2011; LIU, BO; MIN; BAO, 2009). Além disso, na linhagem U-87 MG de glioblastoma humano, a lectina ConA via modulação de metaloproteinase de matriz tipo 1 de membrana (MT1-MMP), proporcionou aumento de expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), via IKK/NF κ B (fator nuclear kappa B), bem como uma concomitante inibição da fosforilação de Akt, sugestivo de morte celular (PRATT; ANNABI, 2014; SINA *et al.*, 2010). Outros estudos demonstraram que células das linhagens U-87 MG e HepG2 de carcinoma hepático humano tratadas com ConA exibiam aumento da expressão de BNIP-3, Atg3, Atg12 e Atg12-L1 o qual leva à morte celular mediante mitofagia (PRATT; ANNABI, 2014; YAU *et al.*, 2015). Bem como os estudos realizados em modelo murino de células hepáticas, sugerem que ConA poderia ser internalizada e ativar a autofagia por induzir dano mitocondrial (CHANG *et al.*, 2007; ROY, BIBHAS *et al.*, 2014). Trabalhos realizados no nosso laboratório, demonstraram que além dos efeitos citotóxicos na linhagem de glioma U-87 MG, a lectina ConA provoca alterações morfológicas e moleculares na linhagem de glioma C6, induzindo morte celular por autofagia a qual foi detectada pela clivagem da proteína LC3 e em associação com efeitos citostáticos, indicados pela inibição da migração celular, proliferação e capacidade clonogênica (NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2018, 2019).

Recentemente nosso grupo demonstrou que as lectinas ConV (*Canavalia virosa*), CaBo (*Canavalia bonariensis*), DLL (*Dioclea lasiocarpa*) e DlyL (*Dioclea lasiophylla*), lectinas purificadas de leguminosas presentes na biodiversidade brasileira, possuem a capacidade de reduzir a viabilidade e migração celular em modelo *in vitro* da linhagem C6 de glioblastoma (CAVADA, BENILDO SOUSA *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2018; NASCIMENTO, KYRIA SANTIAGO *et al.*, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017). Além destas, a

lectina DvL, isolada da leguminosa *Dioclea virolea* também da flora brasileira, foi estudada com mais profundidade e demonstrou efeito citotóxico nas linhagens de glioma C6 e U-87 MG, promovendo a morte por ativação do processo autofágico. Inclusive apresentando efeitos aparentemente mais proeminentes quando comparados com a lectina ConA (NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2018, 2019).

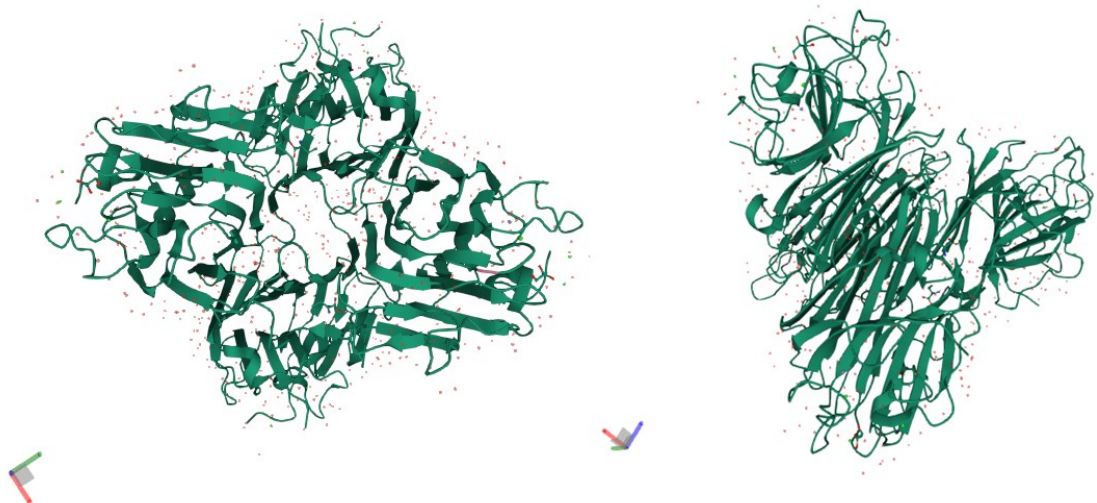
Recentemente também foi demonstrado que a lectina de *Viscum* combinada com anticancerígenos foi capaz de inibir o crescimento de células de glioma por estimular a função de células T, aumentando a sobrevida média dos camundongos que foram inoculados com o tumor. Estes dados sugerem um efeito sinérgico e adjuvante da lectina com a radioquimioterapia (BHUTIA *et al.*, 2019; SCHÖTTERL *et al.*, 2018).

Em função dos diversos estudos relatados na literatura e dos trabalhos gerados no nosso laboratório, um ponto que continua sendo de grande importância é a identificação dos mecanismos utilizados pelas lectinas para indução de seus efeitos anticancerígenos. Este aspecto é de grande relevância, considerando o potencial para a utilização das lectinas como estratégias terapêuticas, em especial para remissão dos gliomas, caracterizados por terapias convencionais pouco eficazes e que apresentam uma alta taxa de mortalidade.

2.5.2 *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A lectina ConBr (Fig. 8) foi purificada há 40 anos (16 anos após a purificação da ConA) a partir de sementes da *Canavalia brasiliensis*, também conhecido como “Cow Bean”, uma leguminosa nativa do Brasil e América do Sul, pertencente à subtribo *Dioclenae*. Uma Hololectina que possui afinidade específicas para glicose/manose, sendo dependente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ (CAVADA, BENILDO SOUSA; OSTERNE; LOSSIO; *et al.*, 2019; GRANGEIRO *et al.*, 1997). Em comparação à ConA, a sequência e estrutura cristalográfica de ConBr revela que ela possui dois resíduos de aminoácidos substituídos, e que embora fora do CRD, esta pequena alteração pode ser responsável pelas diferenças na afinidade de ligação à carboidratos e na atividade biológica destas duas lectinas (GRANGEIRO *et al.*, 1997; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

Figura 8. Estrutura cristalográfica da lectina isolada de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) complexada com o ácido alfa-aminobutírico.



Disponível no PDB como 3JU9

Diversos estudos tem demonstrado uma diversidade de ações biológicas sobre células do sistema imune e nervoso (BATISTA *et al.*, 2017; CAVADA, BENILDO SOUSA; OSTERNE; LOSSIO; *et al.*, 2019; CAVADA, BENILDO SOUSA; OSTERNE; PINTO-JUNIOR; *et al.*, 2019), além de ter sido verificado um efeito anti-proliferativo nas linhagens celulares de leucemia (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012) e melanoma (SILVA *et al.*, 2014), porém o mecanismo de ação envolvido na atividade anticancerígena não tenha sido totalmente desvendado.

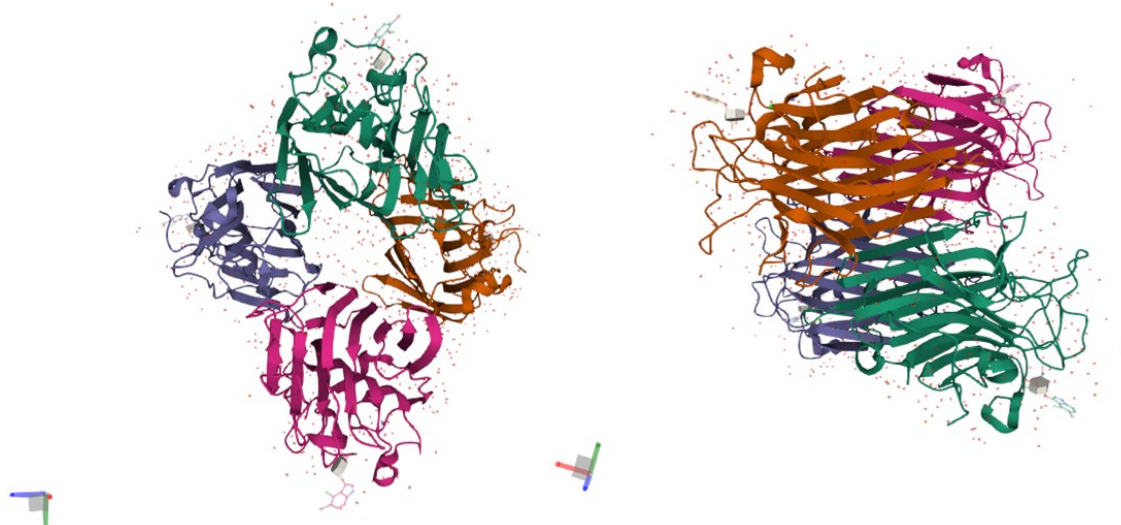
Estudos prévios do nosso grupo também demonstraram efeitos da ConBr sobre a neurotransmissão e neuroplasticidade, além de ação neuroprotetora. Assim, as ações relatadas sobre a função neural, incluem: ação tipo antidepressivo em modelos animais, que parecem envolver a indução da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), assim como respostas neuroprotetoras envolvendo principalmente a transmissão glutamatérgica em modelos *in vivo* e *in vitro* (BARAUNA *et al.*, 2006; JACQUES *et al.*, 2013; RIEGER, D. K. *et al.*, 2017; RIEGER, DÉBORA K.; COSTA; *et al.*, 2014; RIEGER, DÉBORA K.; CUNHA; *et al.*, 2014).

2.5.3 *Dioclea reflexa* (DrfL I)

A lectina DrfL I (Fig. 9), purificada das sementes da leguminosa *Dioclea reflexa*, também uma hololectina que apresenta afinidade por glicose/manose e dependência por $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$, constituída por três cadeias (α , β e γ) com massas de 25.562, 12.874 e 12.706 KDa, respectivamente, sem ligações dissulfeto ou glicosilações (PINTO-JUNIOR, VANIR R.

et al., 2016). A sua estrutura cristalográfica revela que diferente da ConA esta lectina possui uma histidina na posição 131 (PINTO-JUNIOR, VANIR REIS *et al.*, 2017). Na literatura não há estudos em relação ao possível efeito anti-tumoral da lectina DrfL, mas há relacionando sua participação na resposta inflamatória, sua capacidade de causar uma inibição parcial na resposta edematogênica e de promover relaxamento de baixa intensidade nos anéis aórticos em modelos *in vivo* de rato Wistar (CAVADA, BENILDO *et al.*, 2018; PINTO-JUNIOR, VANIR R. *et al.*, 2016; PINTO-JUNIOR, VANIR REIS *et al.*, 2017).

Figura 9. Estrutura cristalográfica da lectina isolada de sementes de *Dioclea reflexa* (DrfL) complexada com X-man.



Disponível no PDB como 5TG3.

Recentemente, mediante a técnica de simulação “docking” demonstrou-se que a DrfL I possui a habilidade de interagir fortemente com manose e ligar-se em N-glicanos presentes nos resíduos de glicoproteínas e glicocojugados da superfície celular, com a mesma intensidade ao observado com as lectinas CaBo, DlyL e DLL (CAVADA *et al.*, 2019a), as quais, como foi demonstrado recentemente no nosso laboratório, apresentaram efeitos citotóxicos na linhagem C6 (CAVADA, BENILDO SOUSA *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2018; NASCIMENTO, KYRIA SANTIAGO *et al.*, 2017).

2.6 Cultura celular e linhagens celulares de câncer

O pilar central dos avanços na saúde humana é o desenvolvimento de novos fármacos, existindo evidências que entre 2004 e 2014 os gastos em pesquisas de compostos anticancerígenos foram duplicados (HAY *et al.*, 2014).

Um dos modelos de pesquisa pré-clínicos mais utilizados é a cultura de células derivada diretamente de um paciente ou animal de estudo, chamadas de *cultura primária*. Com exceção das células derivadas de tumores, as maiorias das células de culturas primárias têm um período relativamente pequeno de vida útil. Ou seja, depois de um determinado número de duplicações populacionais as células entram em um estado de senescência e param de se dividir independentemente de ter viabilidade (TANNOCK *et al.*, 2013).

Dessa forma, baseado nas características e capacidade de proliferação descontrolada das células cancerígenas *in vivo*, foram criadas condições *in vitro* que permitiram o desenvolvimento de inúmeros modelos de linhagens celulares cancerígenas (CLARK *et al.*, 2010; COOPER, GM (BOSTON UNIVERSITY), 2000). A primeira linhagem foi criada em 1951 após a remoção de um tumor de câncer cervical da paciente Henrietta Lacks. Algumas células da massa tumoral foram removidas e observou-se que elas se multiplicavam extremamente rápido - a cada 24h - algo nunca observado antes. Desde então suas células, chamadas células HeLa, são amplamente cultivadas, sendo posteriormente estabelecidas outras linhagens a partir dos mais diversos tumores (MASTERS, 2002).

Embora as linhagens celulares sejam utilizadas como modelos pré-clínicos, há uma série de aspectos que devem ser considerados e cuidados, sob pena de limitar a validade do modelo (TANNOCK *et al.*, 2013):

- a) O número de células por volume de meio de cultivo é crítico para alguns tipos de cultura.
- b) Contaminação cruzada com outras linhagens celulares que pode ser devido à proximidade de linhagens celulares de rápida proliferação durante a cultura.
- c) Como as células continuam a se dividir em cultura, crescem preenchendo a área ou volume disponível, o qual pode levar ao esgotamento dos nutrientes no meio de crescimento, acumulação de células apoptóticas/necróticas (mortas), alterações do contato celular, levando à inibição ou senescência por contato. Além disso, as células tumorais cultivadas continuamente em culturas podem adquirir outras mutações e alterações epigenéticas que podem alterar as suas propriedades e sua capacidade de reiniciar o crescimento tumoral *in vivo*.

d) O grau em que as linhagens celulares refletem a neoplasia original da que derivam é variável. Por exemplo, a linhagem celular DU145 de câncer de próstata deriva de uma metástase cerebral característica deste tipo de tumor; porém não de um tumor na próstata.

Com o avanço do entendimento sobre as diferenças genéticas e bioquímicas das células tumorais foi possível imortalizar células normais com genes virais, cujos produtos

ligam e inibem proteínas-chave, tais como p53 e Rb (proteína de retinoblastoma) (MASTERS, 2002) ou mediante a expressão forçada da telomerase (TANNOCK *et al.*, 2013), dando lugar às células de linhagens celulares com a capacidade de proliferar indefinidamente. É importante ressaltar que as linhagens celulares são utilizadas não somente em pesquisas sobre o câncer, mas também em outras análises biomédicas.

Nos últimos anos, diferentes modelos celulares de glioblastoma foram estabelecidos e utilizados em numerosas pesquisas (CLARK *et al.*, 2010), das que detalharemos aqui as linhagens C6 e U-87 MG, foram utilizados como modelo de estudo no presente trabalho.

2.7.1 Linhagem celular C6

A linhagem celular C6 (ATCC CCL-107) de glioma, foi originalmente isolada de um tumor cerebral de rato Wistar, induzido pela injeção de N-nitrosometilurea, sendo uma linhagem celular com característica astrocitárias, parcialmente diferenciada, e apresentando elevada expressão da proteína S100 (BENDA *et al.*, 1968; DONTA, 1973; WOLFF *et al.*, 1997). As células C6 caracterizam-se por ser uma linhagem homogênea do tipo aderente e de rápida proliferação (NAGANO *et al.*, 1993; WHITTLE *et al.*, 1998). Notavelmente, quando injetadas no cérebro de ratos neonatos estas células reproduzem um tumor que apresenta similaridades morfológicas com o glioblastoma humano, incluindo: polimorfismo nuclear, altas taxas mitóticas, focos de necrose, infiltração linfocitária (AUER; MAESTRO; ANDERSON, 1981; BENDA *et al.*, 1968; GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002) e neovascularização (SAN-GALLI *et al.*, 1989; WHITTLE *et al.*, 1998).

Sendo importante ressaltar que as células C6 possuem características que as diferenciam das células provenientes dos gliomas malignos humanos (GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002; JACOBS *et al.*, 2011). O gene supressor de tumor p53, um dos genes mais frequentemente mutados nos tumores e também no GBM, só se encontra mutado nas células C6 provenientes de células tronco neurais ou “*neural stem cells*” (BARTH; KAUR, 2009; ZHANG, P. Y. *et al.*, 2015). Por outro lado, o gene p16, supressor de tumor, possui uma alta taxa de mutação no GBM e também nas células C6 (JACOBS *et al.*, 2011). Uma característica imunocitoquímica que vale citar é que C6 não expressa muito a proteína ácida fibrilar glial (GFAP do inglês *Glial fibrillary acidic protein*) (GALLAND *et al.*, 2019; JACOBS *et al.*, 2011).

Na atualidade, esta linhagem celular é utilizada como modelo *in vitro* de astrocitoma, em pesquisas do mecanismo de crescimento tumoral, angiogênese, invasão e como material

biológico no planejamento de terapias anti-GBM (AUER; MAESTRO; ANDERSON, 1981; CHAO *et al.*, 2015; LIANG, SHUMIN; CHEN; WANG, 2018).

2.7.2 Linhagem celular U-87 MG

A linhagem U-87 MG (ATCC HTB-14) é derivada de um tumor maligno de uma paciente de 44 anos pela técnica de explante (PONTÉN; MACINTYRE, 1968), sendo muito utilizada como modelo de estudo de glioma grau IV ou GBM (CLARK *et al.*, 2010), existindo (até 17 de agosto de 2021) 3.629 publicações no Pubmed, quando utilizada a palavra chave “U87 cell line”. Esta linhagem se caracteriza por apresentar heterogeneidade de populações celulares, onde algumas são aderentes e outras capazes de formar esferóides ou pequenos aglomerados (PONTÉN; MACINTYRE, 1968). Os esferóides são ricos em células tronco neurais ou “*neural stem cells*”, que conferem ao tumor a resistência às terapias convencionais e consequentemente a recorrência do tumor (LIEBELT *et al.*, 2016; OH, SE-JEONG JEONG *et al.*, 2017), além de possuir a capacidade de formar tumores com características típicas de GBM, quando implantadas em camundongos imunocomprometidos (ALLEN *et al.*, 2016; YU, SUN-NYOUNG *et al.*, 2017).

2.7.3 Tumoresferas

Apesar dos inumeráveis benefícios dos modelos *in vitro* em monocamada ou 2D, baseados no cultivo celular em superfícies rígidas tratadas para facilitar a adesão e a proliferação celular, estes modelos limitam as interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Sendo estas interações determinantes para as células *in vivo* (HOARAU-VÉCHOT *et al.*, 2018; SANTO *et al.*, 2016). Porém, os modelos tumorais pré-clínicos *in vivo* em animais baseiam-se em tumores murinos transplantados em ratos singênicos, modelos xenográficos ou modelos de ratos geneticamente modificados. Esses modelos não se comportam como os tumores humanos. Além disso, cabe destacar que o local de implantação do tumor em geral não corresponde à localização natural, assim como o sistema imune e a taxa de crescimento das células tumorais encontram-se comprometidos (SANT; JOHNSTON, 2017).

Os tumores sólidos caracterizam-se por serem constituídos por células tumorais, células do estroma (células vasculares, imunes e fibroblastos) e por componentes da ECM onde existe uma alta competição pelas interações célula-célula, célula-ECM, assim como pelos gradientes locais de fatores de crescimento, nutrientes e oxigênio (SANT; JOHNSTON, 2017). Em comparação com culturas em monocamadas 2D, o modelo 3D pode mimetizar de

forma mais apropriada o contexto celular e os gradientes patofisiológicos relevantes de tumores *in vivo*, à medida que são expostos a forças topográficas e mecânicas que as células em monocamada normalmente não apresentam (SANT; JOHNSTON, 2017; SANTO *et al.*, 2016).

As culturas tumorais no formato esferóides ou 3D são culturas automontadas de células tumorais em condições em que as interações célula-célula predominem sobre as interações célula-ECM (SANT; JOHNSTON, 2017). As tumoresferas multicelulares apresentam *cancer stem-like cells* (CSC), ou células tronco cancerígenas, as quais são relacionadas à resistência tumoral frente à quimio- e radioterapia, a reincidência tumoral, bem como invasão e metástase tumoral. Assim, esse modelo celular é interessante para se investigar novos alvos e regimes terapêuticos para combater as CSC (KRAMER *et al.*, 2013; PAOLILLO *et al.*, 2019; SANT; JOHNSTON, 2017; SANTO *et al.*, 2016; SLUKVIN; KUMAR, 2018; SONG, LIQING *et al.*, 2019; VINCI *et al.*, 2012, 2013; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

3 HIPÓTESE

As lectinas DrfL I e ConBr, isoladas de sementes de leguminosas brasileiras, por sua capacidade de reconhecer o padrão de glicosilação de células tumorais poderiam ser capazes de interagir especificamente com as células de GBM e ativar processos de morte celular, com potencial de serem aplicadas como ferramentas de estudo, agente terapêutico ou adjuvante de fármacos antitumorais convencionais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a capacidade antitumoral das lectinas isoladas de sementes de leguminosas *Dioclea reflexa* (DrfL I) e *Canavalia brasiliensis* (ConBr) sobre culturas celulares de glioma em modelos *in vitro*. Além disso, verificar a seletividade do efeito citotóxico das lectinas sobre as células tumorais e se possuem capacidade adjuvante no tratamento com temozolomida (fármaco de escolha para o tratamento convencional do GBM).

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Comparar o efeito citotóxico das lectinas DrfL I e ConBr, relativo à diminuição da viabilidade celular em culturas de glioma, com a resposta de células normais (culturas primárias de astrócitos corticais) frente ao mesmo tratamento.
- ✓ Avaliar a ultraestrutura de células C6 expostas a DrfL I e ConBr.
- ✓ Avaliar a modulação de vias de sinalização intracelular dependentes de MAPKs, Akt, mTORC, bem como as vias relacionadas a autofagia e apoptose na resposta das células C6 e U-87 MG expostas a DrfL e ConBr.
- ✓ Comparar o efeito citotóxico das lectinas DrfL I e ConBr, isoladamente ou em combinação com o agente alquilante temozolomida (TMZ), relativo à diminuição da viabilidade celular em culturas de glioma.
- ✓ Avaliar a modulação de vias de sinalização intracelular dependentes de MAPKs, Akt, mTORC e LC3 na resposta das células de glioma frente à terapia combinada de TMZ e às lectinas DrfL I e ConBr.

5 JUSTIFICATIVA

As estatísticas atuais apontam que a mortalidade relacionada com o câncer tem aumentado nos últimos anos (INCA 2020). Dentro desse espectro os gliomas correspondem ao terceiro tipo de câncer, sendo os mais comuns dos tumores primários do SNC e apresentando a maior taxa de mortalidade (OSTROM *et al.*, 2019). Um aspecto que se destaca é que os tratamentos convencionais como a ressecção cirúrgica e radioterapia oferecem um benefício paliativo no controle do GBM (BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017). Além disso, as drogas anticancerígenas disponíveis e utilizadas no tratamento parecem ter pouca eficiência e baixa especificidade, causando dano celular não específico e devastadores declíneos neurocognitivos (BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017; JURATLI; SCHACKERT; KREX, 2013; THEELER; GILBERT, 2015). Portanto, estudos de novos compostos que sejam capazes de interagir com alta especificidade sobre as células tumorais para levar à morte ou inibição da proliferação dessas células representam um desafio.

Assim a nossa pergunta de investigação foi: as lectinas isoladas de sementes de leguminosas brasileiras (DrfL I e ConBr) seriam capazes de interagir especificamente com as células de glioblastoma, levando a morte e/ou inibição da proliferação celular?

Portanto, o presente trabalho tem como foco pesquisar o mecanismo de ação citotóxico desencadeado pelas lectinas DrfL I e ConBr, sobre linhagens de glioma (C6 e U-87 MG), visando obter uma compreensão básica para uma futura utilização de lectinas como: 1) agentes anti-tumorais diretos; 2) coadjuvantes de quimioterápicos; 3) marcadores de progressão tumoral e metástase; 4) elementos constituintes de complexos quimioterápicos, que poderiam dirigir seletivamente agentes anti-tumorais, para uma ação mais restrita sobre as células neoplásicas.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 4- Relação de reagentes utilizados.

Reagentes	Sigla	[] de uso	Fabricante	Código
3-metiladenine	3-MA	2 mM	Sigma-Aldrich®	M9281
Acridine Orange	LA	3 mg/mL	Sigma-Aldrich®	A8097
Annexin-V-FITC	A	2 µL	Thermo Fischer Scientific	A13199
Antibiotic Antimycotic Solution	-	100X	Sigma-Aldrich®	A5955
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride - Hoechst	H	0,01 mg/mL	Sigma Aldrich®	B2261
Bovine serum albumin	BSA	2%	INLAB	1870
Bromophenol Blue		40%	USB™	US12370
Caspase-8/FLICE Inhibitor, Z-IETD-FMK	IETD-fmk	2 µM	Clontech®	S1500
Chloroquine diphosphate salt	CQ	10 µM ou 20 µM	Sigma-Aldrich	C6628
Crystal Violet	-	-	Sigma Aldrich®	548-62-9
Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose	DMEM	-	Sigma-Aldrich®	D5523
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham	DMEM-F12	-	Sigma-Aldrich®	D6421
ECL Select Western Blotting Detection Reagent	Super ECL	-	Sigma-Aldrich®	GERPN2235
EnzChek® Caspase-3 Assay Kit	-	-	Thermo Fischer Scientific	ab39401
Fetal Bovine Serum	FBS	10%	Gibco™	00997
Leite desnatada		5%	MOLICO	-
Pluronic® F-127	-	2%	Sigma Aldrich®	P2443
Poly-L-lysine hydrobromide	-	0,01 mg/mL	Sigma-Aldrich®	P6282
Ponceau S		0,5 mg/mL	USB™	33819
Propidium Iodide	IP	0,01 mg/mL	Sigma Aldrich®	P4170
Sonda 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate	DCF-DA	10 µM	Sigma Aldrich®	D6883
Sonda JC-1	-	0,01 mg/mL	Sigma Aldrich®	T4069
SP600125		10 µM	Cell Signaling	8177
Staurosporine	-	1 µM	MERCK	37095
Temozolomide	TMZ	50 – 500 µM	Sigma-Aldrich	T2577
Tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio	MTT	0,5 mg/mL	Sigma-Aldrich	M2128
Trypan Blue Solution		0,02%	Gibco™	15250061
Trypsin-EDTA	-	0,05%	Gibco™	03729
U0126	U0126	10 µM	Cell Signaling	9903S
β - Mercaptoethanol	-	8%	VETEC®	V000590

6.1 Isolamento, Diluição e Desnaturação de Lectinas.

As lectinas de interesse foram extraídas de sementes das leguminosas oriundas da flora brasileira: *Dioclea reflexa* (DrfL I) e *Canavalia brasiliensis* (ConBr). A purificação das mesmas foi realizada por cromatografia de afinidade em Sephadex®-G50, conforme descritos previamente por Moreira e colaboradores (MOREIRA, R. A.; GAVADA, 1984) e Mackler e colaboradores (MACKLER; WOLSTENCROFT; DUMONDE, 1972). A pureza das lectinas foi verificada por SDS-PAGE segundo protocolo descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970), usando um aparelho MiniProtean II (BioRad, Milão, Itália) de placas de gel vertical de 0,75 mm com 15% de acrilamida no gel de separação e 4% no gel de entrada.

O processo de purificação descrito foi realizado no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, coordenado pelo Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Após o isolamento, as lectinas DrfL I e ConBr foram diluídas em tampão HEPES-salina sem glicose composto por NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1.2 mM, HEPES 25 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.4. Sendo este tampão utilizado como o controle biológico do tratamento.

A fim de avaliar se o efeito biológico é dependente da sua estrutura proteica, as lectinas já diluídas foram desnaturadas por aquecimento (100°C) em banho seco durante 10 minutos.

Para determinar se a ação das lectinas é dependente do seu domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) foi bloqueado, através da diluição da lectina em tampão HEPES-salina sem glicose contendo 0,1 M de seu açúcar ligante específico (α -metil-D-manosídeo) e mantida durante 30 minutos a 37°C.

6.2 Cultura Celular e Manutenção.

As células da linhagem C6 (ATCC/CCL-107) oriunda de glioma de rato (*Rattus norvegicus*) e U-87 MG (ATCC/HTB-14) referente a glioma humano (*Homo sapiens*), ambas linhagens foram fornecidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em cultura em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose) acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Antibiotic Antimycotic Solution), a 37 °C em atmosfera umidificada de 95% O₂ e 5% CO₂. Ao atingir confluência de 80% as células foram repicadas utilizando tripsina 0,05%.

As células GBM-1 foram isoladas a partir da recessão cirúrgica de um paciente sexo feminino de 64 anos no Hospital Celso Ramos em Florianópolis, Santa Catarina-posteriormente os especialistas confirmaram histopatologicamente o diagnóstico de GBM (BITTENCOURT *et al.*, 2016). A amostra foi coletada por neurocirurgiões em 15 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12) contendo 10% de SFB, sendo levada à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para posteriores processamentos. No fluxo laminar, as meninges cerebrais e vasos sanguíneos foram removidos, sendo o tecido dissociado mecanicamente com tripsina e com ajuda de uma pipeta Pasteur. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão fosfato-salina (PBS 0,1 M; composto por 0,14 M de NaCl, 0,003 M de KCl, 0,01 M de Na₂HPO₄ e 0,002 M KH₂PO₄) e cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², contendo DMEM-F12 acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (0,06%), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, a 37 °C em atmosfera umidificada de 95% O₂ e 5% CO₂. Todos os procedimentos e formulários de autorização para obtenção das amostras foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CEPSH número de protocolo 108.286).

O cultivo primário de astrócitos corticais foi realizado com a finalidade de que pudessemos avaliar o perfil de toxicidade das lectinas nas células saudáveis (DAL-CIM *et al.*, 2019). Anterior ao cultivo celular, cada poço da placa de 24 poços foi previamente tratado com 250 µL Poly-L-lysine hydrobromide (0,01 mg/mL) para promover a adesão das células, após 24 h a placa foi lavada 3X com água ultrapura autoclavada.

Inicialmente os ratos neonatos de p0 ou p1 foram decapitados e as cabeças foram esterilizadas com álcool 70% e condicionadas em PBS 1X estéril. Posteriormente as estruturas foram transferidas para outra placa com PBS 1X-glicose (1% de glicose 1 M) e então colocadas na cabine de segurança biológica para a etapa de dissecação das estruturas cerebrais. Com o auxílio da lupa as meninges são retiradas e o telencéfalo é dissecado sempre mantendo a estrutura em PBS 1X-glicose no gelo.

Após a dissecação, as estruturas foram mantidas em 1 mL de tripsina por 20 min em tubos cônicos de 15 mL em banho a 37 °C. Posteriormente foi adicionado 1 mL do inibidor da tripsina-DNase, e a amostra foi centrifugada a 1500 rpm por 5 min e retirado o sobrenadante com cuidado para que não seja suspenso o precipitado formado pelas estruturas. Posteriormente foi adicionado 1 mL de meio DMEM-F12 (suplementado com SBF 10% e Bicarbonato de sódio 2,44 g), e as estruturas foram dissociadas até que uma solução homogênea fosse obtida.

Em seguida 4 mL do mesmo meio de cultura foram adicionados, aguardou-se a sedimentação e então o sobrenadante que continha as células oriundas da dissociação foi coletado e centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 min, descartado o sobrenadante e suspenso em 4 mL de meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SBF. As células foram diluídas e submetidas à contagem em câmara de Neubauer para estabelecer o número de células obtidas. O plaqueamento foi realizado na densidade de 35×10^4 células por poço.

Uma vez plaqueadas, as células foram condicionadas em meio DMEM-F12, sendo o meio de cultura substituído no dia seguinte com a finalidade de remoção de debris celular e células mortas ou não aderentes e a cada dois dias o meio foi trocado até que a cultura tivesse entre 7 e 10 dias de cultivo ou até atingir 80% da confluência celular.

6.3 Tratamentos Realizados nas Culturas Celulares.

Para a realização dos experimentos nas células de glioma, a densidade celular foi estabelecida através da contagem em câmara de Neubauer, onde a determinação das células viáveis foi realizada através do corante vital azul de tripan (0,02%).

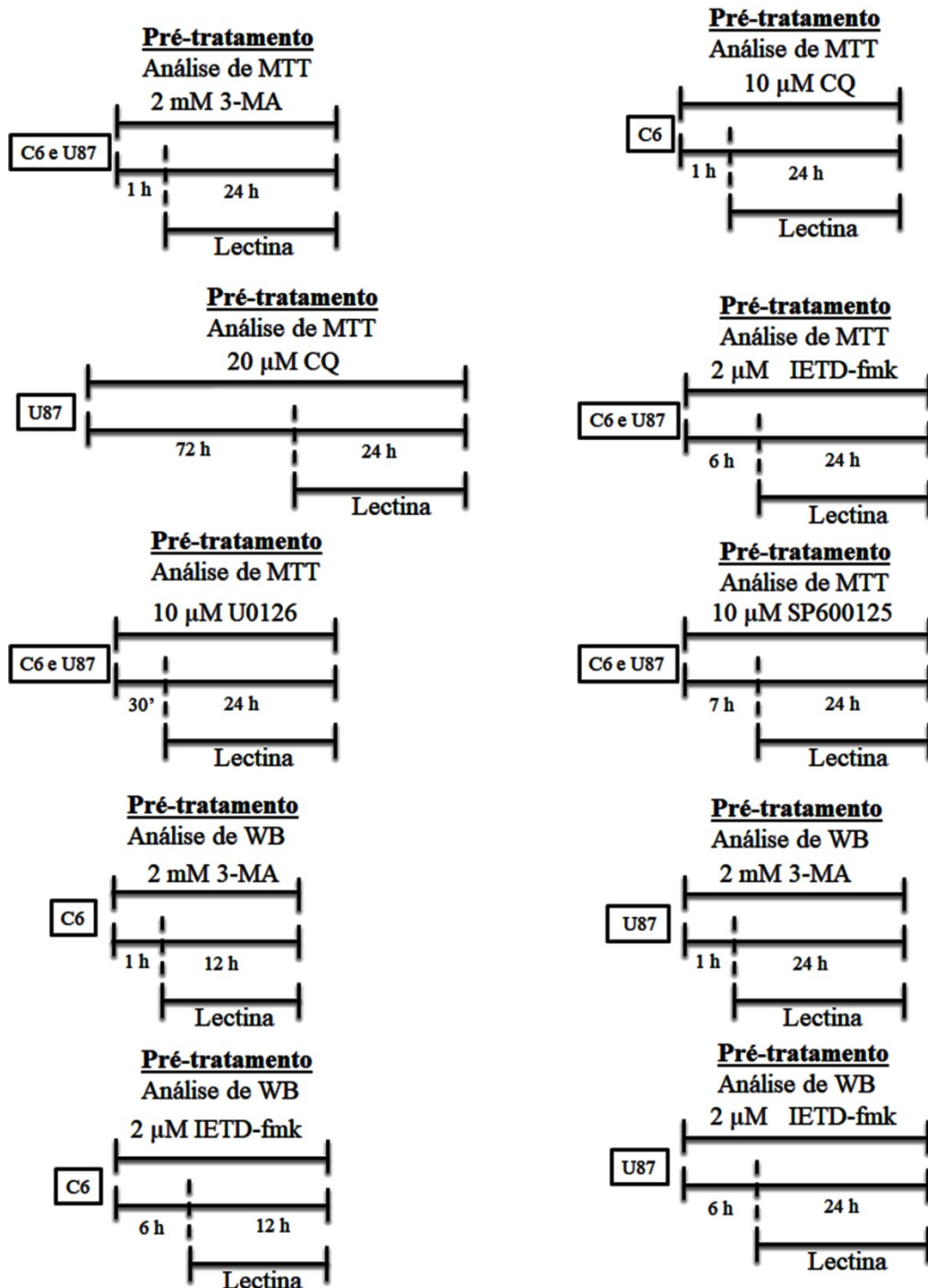
As células da linhagem C6 foram tratadas com veículo (controle) ou 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I ou ConBr por 3, 6, 12, 24 e 48 h, a fim de analisar a dose-resposta e o tempo de resposta das lectinas nos modelos testados. Para avaliar a importância do processo de autofagia, ativação da caspase-8 e modulação das MAPKs (ERK e JNK) na viabilidade celular, foram realizados experimentos com, 3-metiladenine (3-MA) um inibidor da autofagia que bloqueia a formação do autofagossomo mediante a inibição de PI3K classe III (ZHANG, XUDONG *et al.*, 2014) e chloroquine (CQ) um bloqueador da fusão entre autofagossomo e lisossomo (YE, HONGXING *et al.*, 2016). 3-MA e CQ foram utilizados na concentração de 2 mM e 10 μM , respectivamente, sendo adicionados 1 h antes do tratamento com as lectinas. U0126 é um inibidor seletivo de MEK1/2, que bloqueia a ativação de ERK1/2 (MARAMPON *et al.*, 2009; RAMASWAMY *et al.*, 2019) e foi utilizado na concentração de 10 μM e adicionado 30 min antes do tratamento com as lectinas. SP600125 é um inibidor seletivo de JNK1/2 (BENNETT *et al.*, 2001; HIDESHIMA *et al.*, 2003) e foi adicionado 7 horas antes do tratamento com as lectinas na concentração de 10 μM . O inibidor FLICE (1mM IETD-fmk) é um inibidor de apoptose induzida por FasL, por bloquear a ativação de caspase-8 e consequentemente caspase-3 (LAWRENCE; CHOW, 2012), foi utilizado na concentração de 2 μM sendo adicionado 6 h antes do tratamento com as lectinas.

As células da linhagem U-87 MG foram tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I por 12, 24, 48 e 72 h, a fim de analisar o efeito da lectina na

linhagem. 3-MA, U0126, SP600125 e IETD-fmk foram utilizados na mesma metodologia que na linhagem C6, porém o tempo de pré-exposição à CQ foi de 72 h na concentração de 20 μM .

Desenhos experimentais:

Figura 10. Desenho experimental do pré-tratamento com os inibidores a fim de avaliar a importância do processo de autofagia, ativação da caspase-8 e modulação das MAPKs (ERK e JNK) na viabilidade celular.

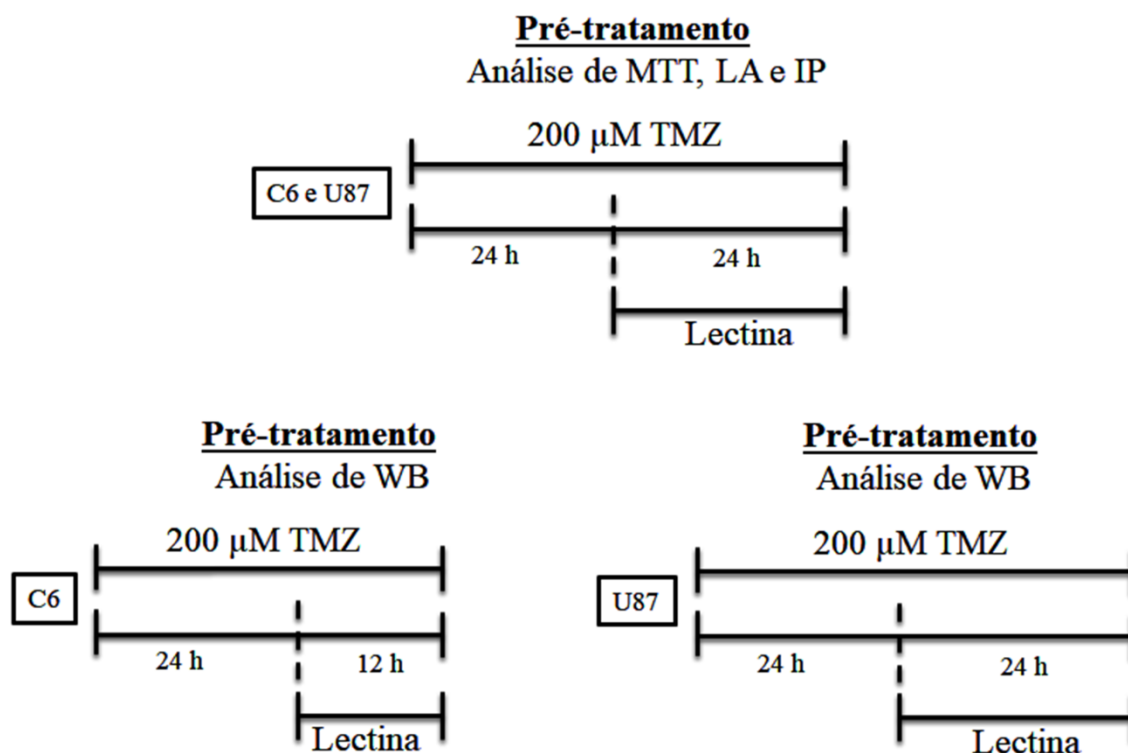


Uma das drogas de escolha, utilizadas no tratamento de gliomas atualmente é a temozolomida (TMZ), um agente alquilante utilizado no tratamento de gliomas recorrentes de alto grau (WICK; PLATTEN; WELLER, 2009). Trabalho realizado por Stupp e colaboradores (STUPP, 2002), apontaram uma taxa de sobrevivência promissora em pacientes submetidos à radioterapia e concomitantemente tratados com TMZ, porém até o momento esta taxa de sobrevivência ainda é muito baixa e a toxicidade do TMZ também é algo a ser considerado. Para avaliar se poderia haver uma ação sinérgica entre as lectinas e o TMZ sobre as linhagens celulares C6 e U-87 MG, foram realizados tratamentos simultâneos e tratamentos combinados com este fármaco.

Inicialmente, para avaliar a sensibilidade das linhagens ao fármaco, realizou-se uma curva de viabilidade na densidade de 10^3 células, as linhagens foram tratadas com as seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300, 400 e 500 μM de TMZ por 24 e 48 h de exposição. Sendo escolhida a concentração de 200 μM de TMZ para posterior análise.

Desenhos experimentais:

Figura 11. Desenho experimental do pré-tratamento com 200 μM de TMZ a fim de avaliar ação sinérgica diminuição da viabilidade celular.



As células GBM-1 foram tratadas com veículo (controle) ou 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DrfL I ou ConBr por 24 h, a fim de realizar uma comparação do efeito citotóxico das

lectinas em dois modelos de glioma humano; considerando que 24 h de tratamento foi o tempo mínimo para observar diminuição na viabilidade celular nas células U-87 MG.

Por fim, a avaliação do perfil de toxicidade das lectinas nas células saudáveis foi realizada no tempo de 24 h, nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

6.4 Microscopia de Luz.

As alterações morfológicas das células frente a cada tratamento foram fotografadas em microscopia de luz com o auxílio do microscópio invertido NIKON® eclipse T2000-U.

6.5 Determinação de Viabilidade Celular pelo Método de MTT.

Para avaliar a viabilidade celular após o tratamento, foi utilizado o teste colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Para isso, placas de 96 poços foram semeadas com 0,1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB contendo as células das linhagens C6 e U-87 MG em uma densidade de 1×10^4 células/poço, entanto que as células GBM-1 foram semeadas na densidade 5×10^3 . As placas foram incubadas por 24 h, em estufa a 37°C numa atmosfera umidificada com 95% O_2 e 5% CO_2 até confluência de 80%. Após este período, o meio foi substituído por um novo meio e acrescido de veículo (controle) ou lectina.

As células da linhagem C6 foram tratadas com lectina nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas em estufa por 3, 6, 12, 24 ou 48 h. Enquanto as células GBM-1 foram tratadas com 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h. Passado o período de tratamento, o conteúdo de cada poço foi substituído por 0,1 mL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão HBSS). As placas foram incubadas por 1 h a 37°C ao abrigo da luz. Em seguida, foi retirada a solução de MTT e adicionou-se 0,05 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, por 30 min, para a dissolução dos cristais de formazan.

As células da linhagem U-87 MG foram tratadas com lectina nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas em estufa por 12, 24, 48 ou 72 h de acordo com o tempo de tratamento que se pretendia analisar. Passado o tempo de tratamento, foram acrescentados 0,1 mL da solução de MTT (sem retirar o meio de cultura com o tratamento). A placa foi incubada por 4 h a 37°C ao abrigo da luz. Em seguida, foi retirado todo o conteúdo existente na placa e adicionado 0,05 mL de DMSO em cada poço, permanecendo incubado por 1 h também ao abrigo da luz a 37°C (HONG *et al.*, 2016).

As células das culturas primárias de astrócitos, foram expostas às lectinas por 24 h nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Após este período, foram incubadas por 2 h com

MTT na concentração de 0,5 mg/mL a 37 °C e posteriormente os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO.

As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia Lameb/CCB/UFSC, no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorbância foram transformados em porcentagens de viabilidade celular, em relação à média dos controles celulares, considerados 100% viáveis. Realizando-se 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempos testados.

6.6 Ensaio de Microscopia de Fluorescência com Iodeto de Propídio.

A fim de elucidar se a morte das células estava associada a danos na membrana celular, foi realizado um ensaio de microscopia de fluorescência com Iodeto de Propídio (IP), seguindo protocolo adaptado de Singh e colaboradores (SINGH, RUBY *et al.*, 2016). Para isso, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas nas mesmas condições do item 6.5, os corantes: IP (1 mg/mL) e Hoechst (1 mg/mL) foram acrescentados diretamente no meio de cultivo, na concentração final de 0,01 mg/mL. A placa foi mantida ao abrigo da luz e permaneceu em estufa a 37 °C por 20 minutos. Posteriormente as células foram visualizadas pela técnica de microscopia de fluorescência também com auxílio do equipamento com Nikon® Eclipse, modelo T2000-U usando o conjunto de filtros: 488 nm excitação e 560 nm emissão para IP e 353 nm excitação e 483 nm emissão para Hoechst.

6.7 Ensaio de Microscopia de Fluorescência com Laranja de Acridina.

O ensaio de Laranja de Acridina (LA) é realizado para determinar a formação de organelas vesiculares ácidas (OVA), o que pode surgir como consequência do aumento do processo autofágico. Com o intuito de avaliar se o tratamento com as lectinas era capaz de modular este evento, as células foram submetidas a essa coloração seguindo protocolo adaptado de Singh e colaboradores (SINGH, RUBY *et al.*, 2016).

Para isso, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas nas mesmas condições do item 6.5, após o período de tratamento as células foram coradas. Inicialmente 50 µL do meio de cultura foram removidos, acrescentando-se 20 µL de LA (10 mg/ml), na concentração final de 3 mg/mL; a placa foi incubada a 37 °C por 20min ao abrigo da luz.

As células foram visualizadas pela técnica de microscopia de fluorescência através do aparelho Nikon® Eclipse microscópio invertidos T2000-U usando conjuntos de filtros,

470 nm excitação e 525 nm emissão para análise da cromatina (Cr), e 350 nm excitação e 615 nm emissão para análise da presença de OVA.

6.8 Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Foi realizada uma análise das células C6 por microscopia eletrônica, com o objetivo de avaliar as características morfológicas das células no nível subcelular, seguindo o protocolo descrito por De Paul e colaboradores (DE PAUL *et al.*, 2009).

Para realização do ensaio, foram semeadas 5×10^5 células por poço em placas de cultura de 6 poços e incubadas nas mesmas condições do item 6.2 por 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com veículo ou lectinas na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ por 12 h e posteriormente coletadas com auxílio de 200 μL de tripsina e a cada dois poços as células foram unidas, chegando na concentração final de 10^6 , seguidas de lavagens com PBS e suspensas em mistura Karnovsky (4% de formaldeído e 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M e 7% de sacarose).

As células fixadas foram centrifugadas e o pellet formado foi tratado com OsO_4 a 1% durante 1 h, seguidamente o pellet foi tratado com acetato de uranilo 1% em tampão acetato 0,1 M a pH 5,2 durante 20 min. Então foram feitas uma série de desidratações com acetonas frias graduadas, para posteriormente as células serem embebidas em resina Araldite (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Cortes finos foram realizadas usando ultramicrotomo JEOL (Nikon, Tóquio, Japão) com uma lâmina de diamante, que foram corados com acetona de uranilo/citrato de chumbo e examinados usando um microscópio eletrônico Zeiss Leo 906-E equipado com a câmera digital Megaview III (Oberkochen, Alemanha). As amostras foram enviadas ao Centro de Microscopia Eletrônica-FCM da Universidad Nacional de Córdoba (UNC), onde foram realizados os procedimentos de inclusão, cortes e visualização no microscópio.

6.9 Ensaio de Sobrevivência Clonogênica.

Para verificar se após o tratamento as células U-87 MG apresentavam capacidade de recuperar o seu crescimento, foi realizado um ensaio de sobrevivência clonogênica. Para isso as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na mesma densidade e tratamento descritos no item 6.3. Após os períodos de 24, 48 e 72 h as células foram submetidas ao processo de clonagem por diluição limitante. Onde as células foram contadas e diluídas na concentração final de 0,5 célula/poço com o intuito de que durante o plaqueamento tivéssemos apenas uma célula por poço.

Após semear as células, estas foram observadas em microscopia de luz e aquelas que continham apenas uma célula por poço foram selecionadas para o ensaio, onde permaneceram nas condições de cultivo já descritas no item 6.2 por um período de 10 dias. Posteriormente, as células e as colônias formadas foram contadas e o seguinte cálculo foi realizado com o intuito de obter a eficiência clonogênica (CE), de acordo com o que foi descrito por Munshi e colaboradores (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005):

$$(CE) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células semeadas}} \times 100.$$

6.10 Ensaio de Migração - “*Scratch*”.

Para que fosse possível avaliar a capacidade de migração e também de proliferação das células GBM-1 após o tratamento com as lectinas, foi realizado o ensaio de migração seguindo protocolo adaptado de Liang e colaboradores (LIANG, CHUN-CHI; PARK; GUAN, 2007). Em resumo: as células foram inicialmente plaqueadas na concentração de 5×10^4 células por poço em placas de 48 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi removido e foi realizado um risco com uma ponteira de 200 μL no tapete celular, as células que permaneceram eram lavadas com PBS, adicionado então o meio de cultura novamente acrescido com veículo (controle) ou lectinas nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Imediatamente após o tratamento as células foram fotografadas para que tivéssemos um registro do tempo 0, 24 e 48 h após o tratamento.

Após os registros, as imagens foram analisadas pelo software livre imageJ® com o intuito de mensurar a área residual após o tratamento afim de avaliar a capacidade de inibição que as lectinas poderiam causar sobre o fechamento do tapete celular.

6.11 Ensaio de migração - “*Transwell*”.

Para confirmar os dados obtidos no meu mestrado a respeito do potencial citostático das células submetidas ao ensaio de migração por “*Scratch*”, e também para avaliar se as células não estavam apenas proliferando, foi realizado o ensaio de migração com *transwell*.

Para isso, células C6 e U-87 MG foram plaqueadas no interior dos poços “*transwell*” na densidade de 50×10^3 por poço, estas células estavam suspensas em 100 μL de seus respectivos meios de cultivo já descritos anteriormente e posicionados no interior dos poços da placa de 24 poços. Após semear as células, estas foram imediatamente submetidas ao tratamento com veículo (controle) e com as lectinas nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$

devido ao fato de gerarem prejuízos à célula, porém ainda sendo capazes de manter parte da viabilidade preservada. Após a adição do tratamento aguardou-se 10 min e a parte inferior da placa (abaixo do *transwell*) foi completada com 600 μL de meio DMEM-F12, suplementado com 20% de SBF, como fator “quimiotático”. O tempo de tratamento escolhido foi de 24 h.

Após o período de incubação, os “*transwells*” foram retirados das placas de 24 poços e com o auxílio de um *Swab*, as células do interior do Transwell que não migraram foram retiradas; enquanto que as células que haviam migrado e ficado na parte externa do *Transwell* foram coradas com Cristal Violeta por 20 min, lavadas com PBS 2X e posteriormente recolocadas nas placas de 24 poços para os registros fotográficos pela técnica de microscopia de luz, no mesmo aparelho microscópico mencionado anteriormente.

6.12 Formação de Tumoresferas e Tratamento.

Previamente ao cultivo celular, cada poço da placa de 6 poços foi tratado com 1 mL de Pluronic F-127 na concentração de 2% para inibir a adesão das células, após 24 h o composto foi retirado e os poços lavado com PBS. Posteriormente foram semeadas 6×10^5 células/poço da linhagem U-87 MG, sendo mantidas nas condições citadas no item 6.2 para a mesma linhagem.

Após 24 h, as células foram visualizadas com microscopia de luz com o auxílio do microscópio invertido NIKON® eclipse T2000-U para conferir a formação das tumoresferas. Essas tumoresferas foram transferidas para uma placa de 24 poços e tratadas com veículo (controle) ou lectinas nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Imediatamente após o tratamento as células foram fotografadas para que tivéssemos um registro do tempo 0, 24, 48 e 120 h após o tratamento.

Feitos os registros, as imagens foram analisadas com o intuito de mensurar a área residual após o tratamento a fim de avaliar a capacidade de inibição que as lectinas poderiam causar sobre a migração/adesão das tumoresferas ao substrato do poço.

6.13 Ensaio de Anexina-V-FITC e Iodeto de Propídeo por Citometria de Fluxo.

Com a finalidade de avaliar através de outra metodologia, o potencial das lectinas em gerar morte celular do tipo apoptose ou necrose, também foi realizado o ensaio Anexina/IP por citometria de fluxo.

Para isso, as células C6 foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 por poço em placa de 6 poços. Após a confluência de 80%, foi realizado o tratamento com 10, 30, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lectinas por 6 h. Posteriormente ao período de tratamento, as células eram tripsinizadas e cada

dois poços unidos para obter a concentração final de 10^6 células por amostra. A seguir as células foram lavadas 1X com PBS e então suspensas em 200 μ L de tampão de ligação (10 mM HEPES, 140 mM NaCl and 25 mM de CaCl_2 , pH 7.4).

Neste tampão de ligação, foram adicionados 2 μ L de Anexina-V-FITC e 2 μ L de IP (1mg/mL), onde as células ficaram incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz. As amostras do tratamento foram duplamente marcadas, e foram realizados: um controle negativo para Anexina-V-FITC, um controle negativo para IP, um controle negativo duplamente marcado, um controle positivo com Anexina-V-FITC (Staurosporina 1 μ M por 3 horas de exposição) e um controle positivo para IP (células submetidas ao nitrogênio líquido por 20 min) também foram realizados.

A leitura foi realizada no Aparelho FACS Canto (Becton Dickson®) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (Lameb)/CCB/UFSC. Para cada amostra foi contabilizado um total de 10.000 eventos. Após a leitura, os dados foram submetidos à análise no software livre Flowing 2.5.1®. Utilizando os canais FITC e PE para análise de Anexina-V-FITC e IP respectivamente.

6.14 Medida do Potencial de Membrana Mitocondrial com a Sonda JC-1.

Com o intuito de avaliar se as lectinas seriam capazes de causar danos no potencial de membrana mitocondrial nas células C6, optou-se por utilizar a sonda JC-1, um indicador de alteração no potencial de membrana mitocondrial. Para isso, placas de 96 poços foram utilizadas para o ensaio, as condições de plaqueamento e tratamento foram as mesmas descritas anteriormente no item 6.3. O tempo de interação com as lectinas foi de 6 h.

Após este período de incubação, o meio de cultura foi retirado acrescentando-se 0,1 mL/poço de JC-1 (1mg/mL), na concentração final de 0,01 mg/mL, e posteriormente a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 20 min, ao abrigo da luz. Posteriormente, as células eram lavadas 1 X com PBS, e suspendidas na mesma solução (0,1 mL/poço) para leitura e registros microscópicos.

Realizou-se leitura da fluorescência por espectrofotometria (SpectraMax® Molecular device) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia Lameb/CCB/UFSC, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 490 nm e emissão 520 nm para detecção da fluorescência verde e 525 nm de excitação e 590 nm de emissão para a detecção da fluorescência vermelha. Os valores da fluorescência foram transformados em porcentagens, em relação à média dos controles celulares, considerados como 100%. Os ensaios foram realizados em 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempo testado.

6.15 Análise de Espécies Reativas de Oxigênio.

A fim de analisar se as lectinas seriam capazes de gerar um aumento no estresse oxidativo celular, foi realizado um ensaio com a sonda Sonda 2',7'-Dichlorofluoresceína diacetate (DCF-DA) para analisar as espécies reativas de oxigênio (ERO). Para isso, 1×10^4 células C6 foram plaqueadas por poço em placas de 96 poços e após 24 h tratadas com as lectinas (1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$) por 6 h. Posteriormente o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS 1X e 100 μL da sonda DCF-DA na concentração de 10 μM foi adicionada por poço e incubada ao abrigo da luz a 37 °C por 20 min.

Após os períodos de incubação, as células foram lavadas com PBS 1X e suspendidas em 100 μL da mesma solução. Como controle positivo, utilizou-se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10% por 15 minutos antes de iniciar a lavagem das células. A leitura foi realizada a 485 nm de excitação e 520 nm de emissão (SpectraMax® Molecular device) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (Lameb)/CCB/UFSC. Os valores da fluorescência foram transformados em porcentagens, em relação à média dos controles celulares, considerados como 100%. Os ensaios foram realizados em 4 experimentos independentes em triplicata para cada lectina e tempo testado.

6.16 Ensaio de Atividade de Caspase-3.

Com o intuito de investigar se as lectinas seriam capazes de induzir morte celular do tipo apoptótica, foi realizado um ensaio para avaliar a atividade enzimática de caspase-3. Para isso foi utilizado o Kit comercial “EnzChek® Caspase-3 Assay Kit”.

As células C6 foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 por poço em placas de 6 poços e tratadas com ambas as lectinas nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Foi realizado um controle positivo com Staurosporina (1 μM) e um controle negativo com as células tratadas apenas com o veículo. Dois poços foram submetidos à mesma concentração da lectina e unidos depois do tratamento, para que a concentração final por reação fosse igual a 10^6 células, de acordo com as recomendações do fabricante.

Foi estabelecido um tempo de tratamento de 6 h, para que as células pudessem sofrer a ação da lectina, sem, no entanto, causar alterações em relação à integridade da membrana celular, uma vez que a enzima que se pretendia detectar é citoplasmática. Após o tratamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram tripsinizadas, coletadas em tubos de 1,5 mL e posteriormente centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, após isso elas foram lavadas com PBS e estocadas a -80 °C overnight para favorecer o processo de lise das células. Posteriormente as células foram incubadas com um tampão de lise comercial no banho de gelo por 30 min e

centrifugadas nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços preta (PerkElman®) e adicionado o substrato da reação. Uma curva padrão foi realizada com uma solução de AMC (10 mM) para observar a linearidade da reação. Imediatamente após a colocação do substrato as células foram submetidas a um ensaio cinético fechado de 1 h, sendo cada leitura realizada a cada 30 segundos, com as seguintes condições: 342 nm de excitação, 435 nm de Cut-off e 446 nm de emissão.

6.17 Western Blot.

O ensaio de Western blot foi realizado para analisar a expressão de proteínas relacionadas a apoptose (Bak, Bax, Puma, Bad, Bid, Bim, BNIP3, caspase-3), a autofagia (Beclin-1, Atg5, Atg7, LC3I/II), bem como a expressão e fosforilação de proteínas de sinalização intracelular como Akt, mTORC1 e MAPKs (p38^{MAPK}, ERK1/2, JNK p46 e p54). Inicialmente, as células foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço em uma placa de 6 poços, e após 24 h de incubação, as células foram tratadas por 12 h para a linhagem C6 e 24 h para a linhagem U-87 MG com as lectinas ou veículo. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado e as células homogeneizadas em 200 µL de “Stop-solution” (Tris 50 mM, EDTA 2 mM, SDS 4%, pH 6,8). Para obter um nível de proteína total mais adequado, cada dois poços eram reunidos e as amostras colocadas em tubos de 1,5 mL e imediatamente aquecidas a 100 °C durante 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13.000 rpm durante 5 min) e mantidas a -20 °C overnight. Passado este período, as amostras foram descongeladas a 100 °C, submetidas ao vórtex e então centrifugadas novamente sob as mesmas condições.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado, e subsequentemente foi adicionado sobre este uma solução de glicerol 40% (40% de glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) na relação 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%). As amostras foram armazenadas a -80 °C até a eletroforese ser realizada. A mesma quantidade de proteína para cada amostra (30 µg por poço) foi submetida a eletroforese em minigel de SDS-PAGE a 12, 10 e 6% e transferida para membranas de nitrocelulose utilizando um aparelho de transferência semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5 h). Para verificar a eficiência de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S.

Para a imunodeteção, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em solução salina tamponada com Tris (TBS) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Os níveis de expressão proteica ou fosforilação foram detectados após incubação “*overnight*” com anticorpos específicos diluídos em solução salina tamponada com Tris e Tween a 0,01%

(TBS-T), contendo 2% de albumina (BSA) com as especificações descritas na tabela 5 a seguir:

Tabela 5- Relação de anticorpos utilizados no ensaio de Western blot

Alvo	Diluição	Fabricante	Código
Akt	1:1000	Cell Signaling	46855
Atg 5	1:1000	Cell Signaling	12994
Atg 7	1:1000	Cell Signaling	8558
Bad	1:1000	Cell Signaling	9239
Bak	1:1000	Cell Signaling	12105
Beclin- 1	1:1000	Cell Signaling	3495
Bid	1:1000	Cell Signaling	2002
Bim	1:1000	Cell Signaling	2933
BNIP3 -Humano	1:1000	Cell Signaling	44060
BNIP3- Murino	1:1000	Cell Signaling	3769
Caspase-3	1:1000	Cell Signaling	9662S
ERK 1/2	1:20000	Sigma	M5670
JNK (p46/p54)	1:1000	Sigma	559304
LC3	1:1000	Cell Signaling	12741
mTORC1	1:1000	Cell Signaling	2972
p38 ^{MAPK}	1:10000	Sigma	M0800
pAkt	1:1000	Cell Signaling	92715
pBad	1:1000	Cell Signaling	5284
pERK 1/2	1:5000	Sigma	M8159
pJNK (p46/p54)	1:1000	Cell Signaling	92515
pmTORC1	1:1000	Cell Signaling	2971
pp38 ^{MAPK}	1:10000	Millipore	9211
Puma	1:1000	Cell Signaling	12450
β -actina	1:2500	Santa Cruz	47778

Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase (HRP) para detecção das bandas proteicas.

As reações reveladas por substrato quimioluminescente (Super ECL). Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por lavagens (3X-5 min/lavagem) com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 a 0,1%, pH 7,5). Todas as membranas foram incubadas com anticorpo anti- β -actina (1:2500) para verificar que quantidades iguais de proteínas foram aplicadas no gel.

O nível de fosforilação das proteínas ERK1/2, Akt, JNK, p38^{MAPK} e mTORC1 foi determinado pela razão da densidade óptica (DO) da forma fosforilada pela DO da forma total. Os níveis de expressão das proteínas associadas aos eventos autofágicos ou apoptóticos foram determinados como uma razão entre a DO de cada proteína testada pela DO de β -actina. No caso da LC3II foi realizada uma razão da DO (previamente normalizada pela β -actina) de LC3II por LC3I. A revelação dos imunoblottings foi realizada através de Super ECL (Cytiva Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent), utilizando o aparelho Fotodocumentador ChemiDoc (BioRad®), disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (Lameb)/CCB/UFSC. As bandas foram quantificadas usando o software Image Lab®.

6.18 Análise Estatística.

Os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad Prisma versão 5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados apresentados possuem distribuição normal, de acordo com o teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e, desta forma, foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido por teste post-hoc de Bonferroni.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

6.19 Docking e dinâmica molecular da interação entre a lectina ConBr e os glicanos da MMP-1

O “*Molecular docking*” foi realizado utilizando o software GOLD V. 5.5 (CDCC, Cambridge, England). As coordenadas estruturais da lectina ConBr foram obtida da base de dados PDB com o id: 4H55, enquanto os glicanos da MMP-1 foram desenhados usando o servidor Carbohydrate Builder (<http://glycam.org>), usando como referências as informações de estrutura de glicanos do trabalho de Saarinen e colaboradores (SAARINEN *et al.*, 1999).

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas utilizando o programa GROMACS com uso do campo de força CHARMM 36 m (as coordenadas do *Docking* forma consideradas como coordenadas iniciais). Foram escolhidos o centro de cavidade do CRD e

todos os resíduos num raio de 10 Å para a realização do algoritmo. Utilizamos a função PLANTSPLP score (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009) e os seguintes parâmetros: tamanho da população de 100, pressão de seleção de 1,1, número de operações de 10.000, número de ilhas de 5, tamanho de nicho de 2, frequência de cruzamento de 95, número de poses de 20. As poses mais baixas de energia foram escolhidas através da combinação da pontuação de acoplagem, ligação de hidrogênio, critérios geométricos para avaliar o grau de complementariedade estereoscópica entre ligante e domínio de ligação e as interações hidrofóbicas (DE ÁVILA *et al.*, 2017; HECK *et al.*, 2017; XAVIER *et al.*, 2016).

Foram realizados os seguintes gráficos:

Gráfico de RMSD (Root-mean-square deviation): Usado para avaliar a trajetória a partir do posicionamento de todos os átomos do sistema em cada *frame* comparado as coordenadas iniciais da simulação. Uma dinâmica é ideal para análise quando entra em equilíbrio, ou seja, não há variações bruscas no posicionamento dos átomos do sistema. Cada ponto do gráfico representa uma média do posicionamento de todos os átomos em cada *frame* da simulação.

Gráfico de RMSF (Root-mean-square fluctuation): Usado para avaliar a estabilidade dos resíduos de aminoácidos ou átomos durante a trajetória. Valores do gráfico representam a média de flutuação de um determinado resíduo ou átomos considerando todos os *frames* da dinâmica. Quanto maior esse valor mais instável é aquele resíduo naquela simulação e quanto menor o valor mais estável é aquele resíduo.

Ligações de Hidrogênio: Avalia a quantidade de ligações de hidrogênio por *frame* da simulação entre duas entidades selecionadas.

Capítulo 1

- 7 Mecanismo de ação biológica da lectina ConBr sobre linhagens de glioma.**

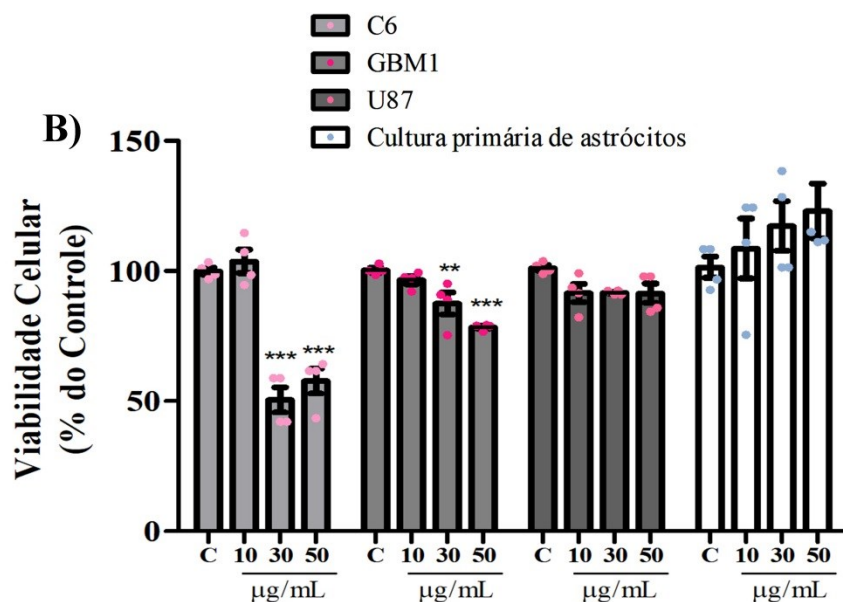
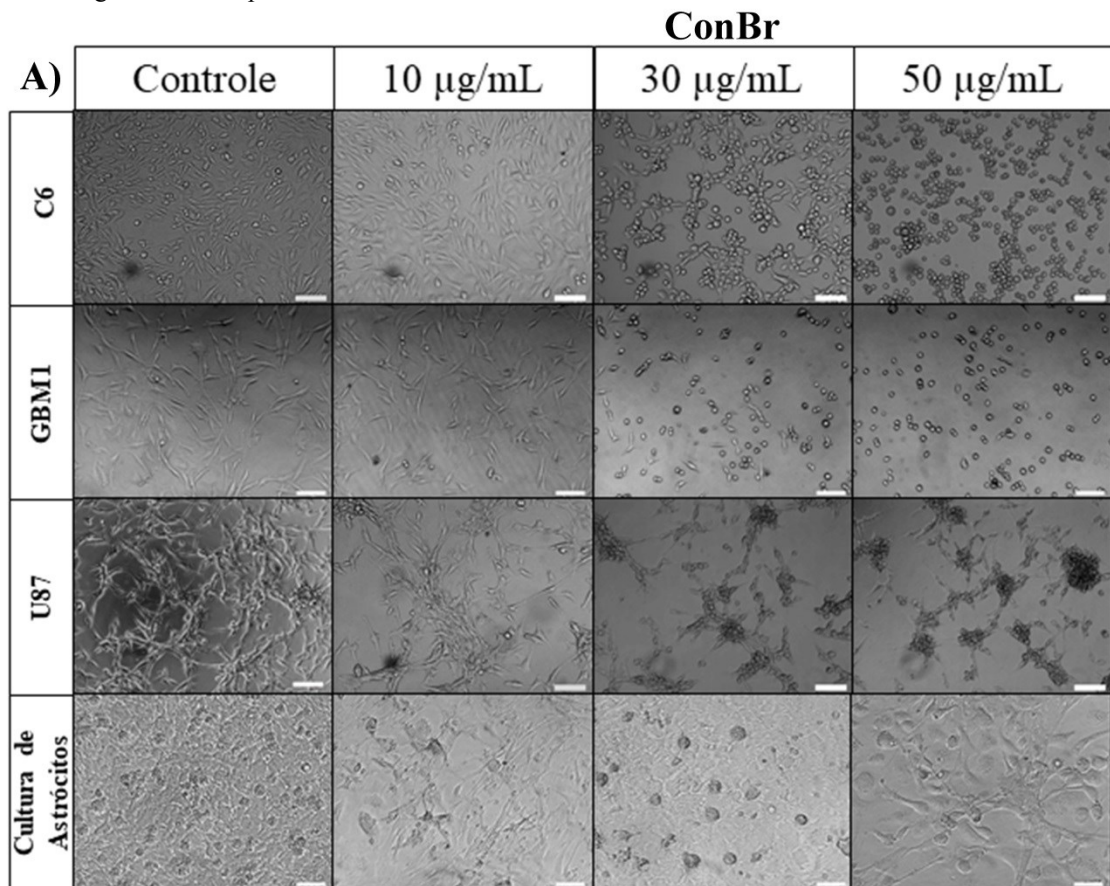
7.1 ConBr induz alterações morfológicas nas células de glioma.

A fim de avaliar a capacidade citotóxica da lectina ConBr nas células de glioma, foram utilizadas três linhagens celulares diferentes: células C6 uma linhagem comercial de rato; células U-87 MG uma linhagem comercial de glioma humano; células GBM1 de glioblastoma, uma cultura primária a partir de um tumor de GBM.

A figura 12 mostra o efeito da lectina ConBr (10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a morfologia e viabilidade das células de glioma e astrócitos normais (obtidos a partir de cultura primária) tratados por 24 h.

A figura 12A mostra a retração dos prolongamentos citoplasmáticos e perda de adesão celular das células de glioma a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No entanto, astrócitos primários corticais não apresentam alterações morfológicas evidentes frente ao tratamento com a lectina. Estas alterações morfológicas nas células C6 e GBM1 foram acompanhadas por diminuição da viabilidade celular. A figura 12B mostra que a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as células da linhagem C6 apresentam redução de mais que 50% da viabilidade celular [$F_{(3,12)} = 3,207$; $p < 0,001$], enquanto que a cultura primária de GBM1 mostra uma redução de mais de 20% [$F_{(3,12)} = 3,207$; $p < 0,01$]; já a linhagem U-87 MG não apresentou uma redução significativa na viabilidade celular. Esses resultados constataam a sensibilidade da linhagem C6 frente ao tratamento, considerando que apresentou a maior queda na viabilidade celular frente ao tratamento com ConBr.

Figura 12. Comparação da perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular em modelos celulares tratados com ConBr. Células de cultura primária de um tumor de GBM (GBM1), linhagens C6 e U-87 MG de glioma e cultura primária de astrócitos foram expostas a ConBr nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ou veículo (Tampão HEPES-salina, controle) por 24 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da ConBr sobre a morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 200 μm . B) Viabilidade celular frente ao tratamento com ConBr medido pelo método da redução do MTT. Os experimentos (N=4) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



Com a finalidade de obter uma melhor compreensão do mecanismo de ação da lectina, as linhagens foram avaliadas separadamente.

7.2 Mecanismos de ação biológica da lectina ConBr nas células da linhagem C6

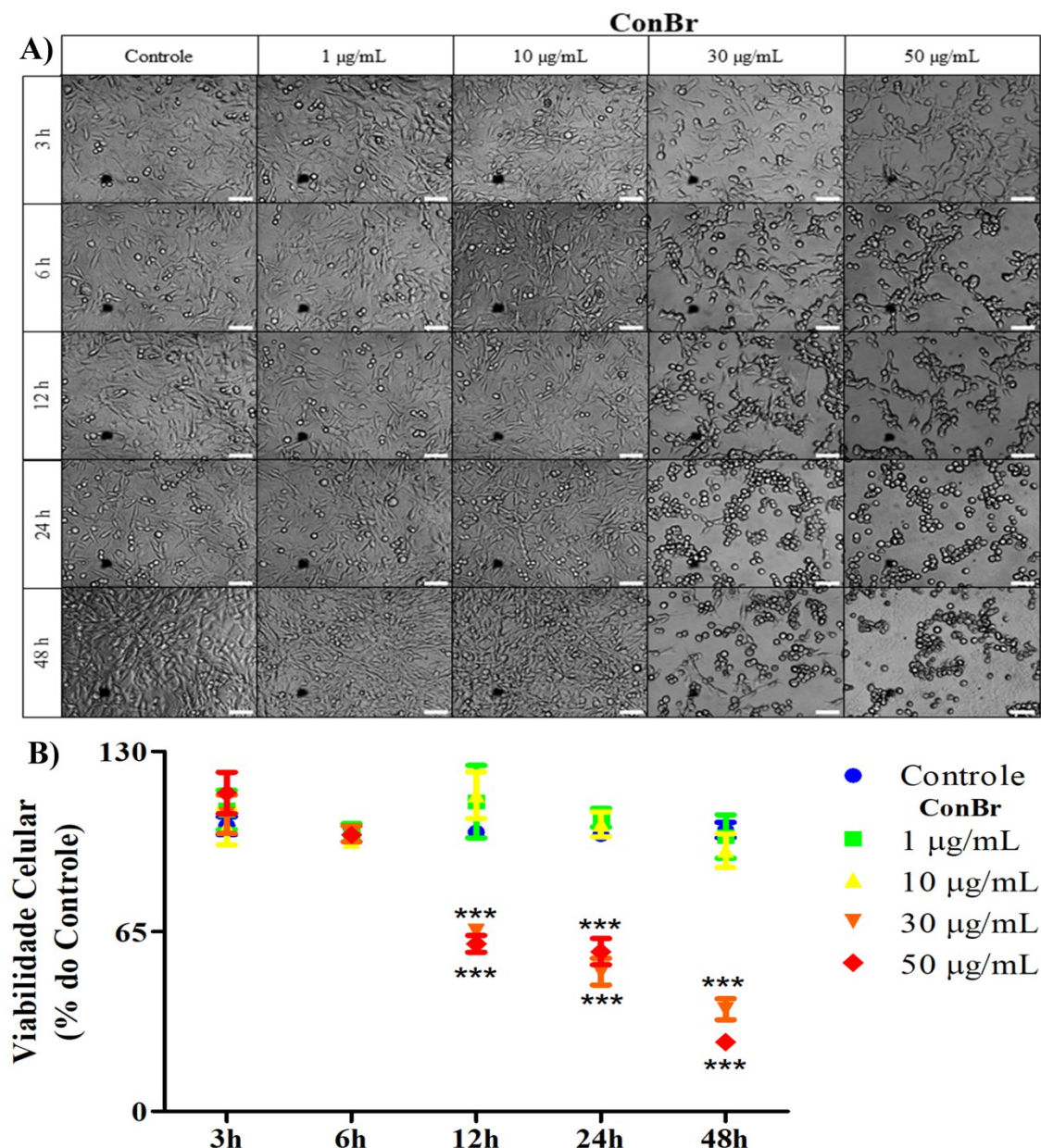
7.2.1 A perda de adesão celular e redução da viabilidade celular das células C6 são dependentes da concentração e tempo de tratamento com ConBr.

Para estabelecer uma curva de tempo e concentração resposta das células C6 de glioma frente ao tratamento com ConBr, as células foram incubadas por 3, 6, 12, 24 e 48 h com veículo ou lectina (1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$), conforme apresentado na figura 13.

A figura 13A demonstra que existe uma dependência de concentração e tempo nas repostas morfológicas das células frente ao tratamento com ConBr. Observando-se que as células C6 mostram retração dos prolongamentos citoplasmática a partir de 3 h de exposição a 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo que após 6 h de exposição estas alterações ocorrem a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$. Porém, a perda de adesão celular, que envolve a mudança morfológica das células de uma morfologia plana para uma morfologia esférica, só foi observada a partir de 12 h de exposição.

A perda de adesão celular foi acompanhada por uma queda na viabilidade celular. Como mostra a figura 13B as concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ induziram uma redução na viabilidade em cerca de 30% [$F_{(4,12)} = 5,969$; $p < 0,01$] e 40% [$F_{(4,12)} = 5,969$; $p < 0,01$], respectivamente, após 12 h de tratamento. Por outro lado, em 24 h de tratamento foi observado uma redução de mais de 40% [$F_{(4,12)} = 5,969$; $p < 0,01$] da viabilidade celular frente a ambas concentrações, enquanto a partir de 48 h a redução da viabilidade celular foi de mais de 80% [$F_{(4,12)} = 5,969$; $p < 0,01$].

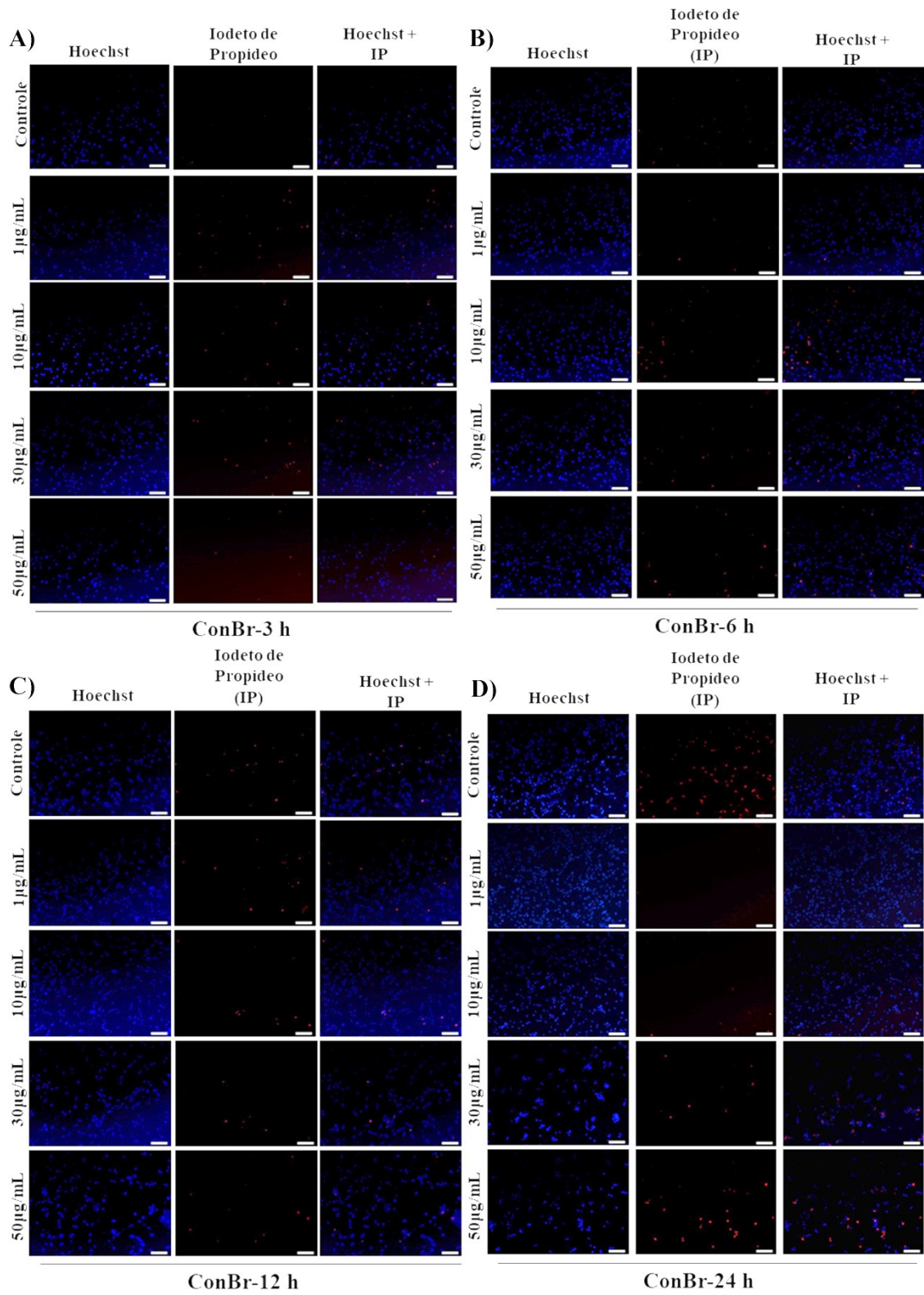
Figura 13. Perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular nas células C6 de glioma pelo tratamento com ConBr. Células da linhagem C6 foram expostas a ConBr nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ou veículo (Tampão HEPES-salina, controle) por 3, 6, 12, 24 e 48 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da ConBr na morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 200 μm . B) Viabilidade celular frente ao tratamento com ConBr medido pelo método de redução do MTT. Os experimentos (N=4) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.

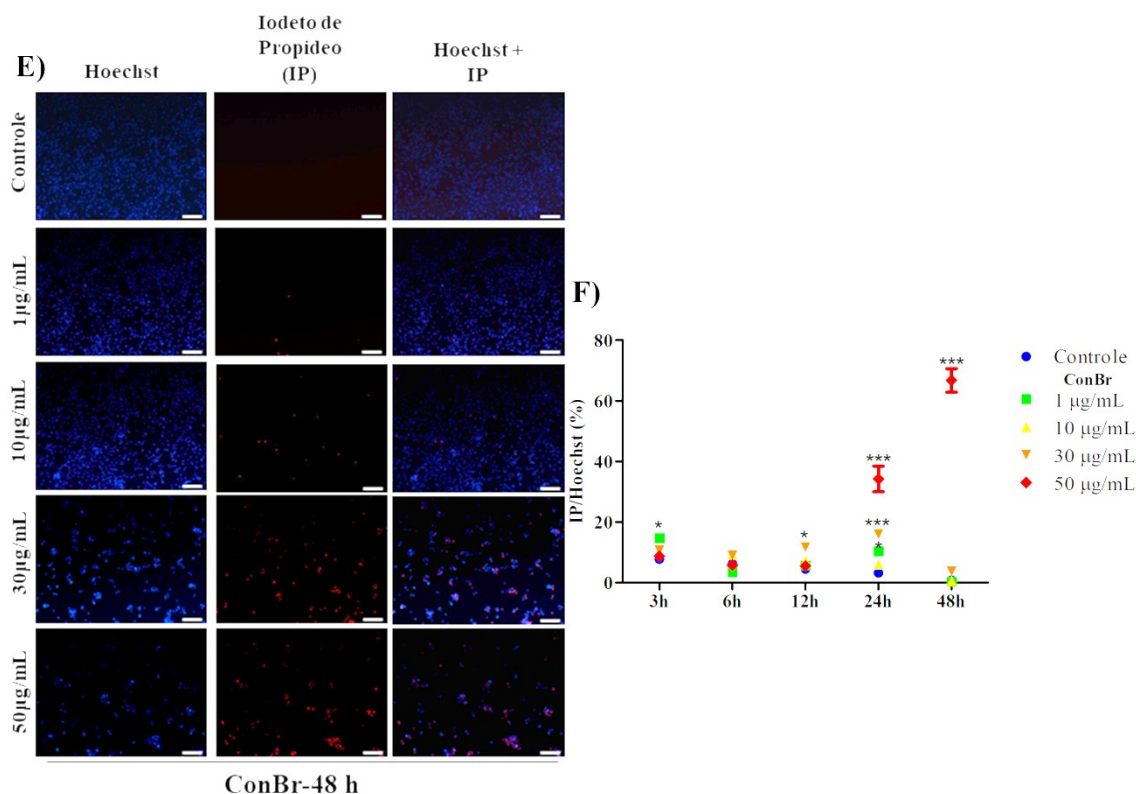


Para verificar se as alterações morfológicas poderiam estar associadas a prejuízos na membrana celular e confirmar a redução na viabilidade celular observado pelo método de MTT, realizou-se a coloração com IP, que marca células que perderam a integridade da membrana plasmática.

A figura 14A-E é um representativo das células coradas com IP e Hoescht, em cada tempo de exposição à ConBr. Conforme exibido no painel 14F, a marcação com IP foi muito pouco alterada por ConBr (1-30 $\mu\text{g/mL}$) independente do tempo de incubação avaliado. Entretanto, a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr, promoveu um aumento pronunciado na marcação para IP [$F_{(4,3)}=0,4756$; $p < 0,001$], mas somente após 24 e 48 h de exposição. Assim, como já demonstrado na figura 13, as células da linhagem C6 são sensíveis ao tratamento com 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr a partir de 12 h. Porém, um marcado efeito citotóxico somente foi observado após tempos de exposição mais prolongados.

Figura 14. Perda de integridade de membrana plasmática nas células C6 de glioma produto do tratamento com ConBr. Células da linhagem C6 foram expostas a ConBr nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ por 3, 6, 12, 24 e 48 h (veículo: Hepes-buffer salina, controle). Após o período de tratamento as células foram coradas com Iodeto de Propídeo (IP) e Hoechst e visualizadas através de microscopia de fluorescência com auxílio do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. A-E) Papineis representativo da incorporação de IP nas células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm . F) Quantificação da fluorescência nas células expostas aos diferentes tratamentos. Os experimentos (N=4) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem dos valores absolutos obtidos em cada tratamento. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.





Estes dados em conjunto sugerem que o efeito citotóxico da lectina ConBr sobre as células de glioma da linhagem C6 seja mediado, possivelmente, por mecanismos de morte celular programada, como por exemplo apoptose ou autofagia.

7.2.2 A ConBr diminui a capacidade de migração celular nas células C6

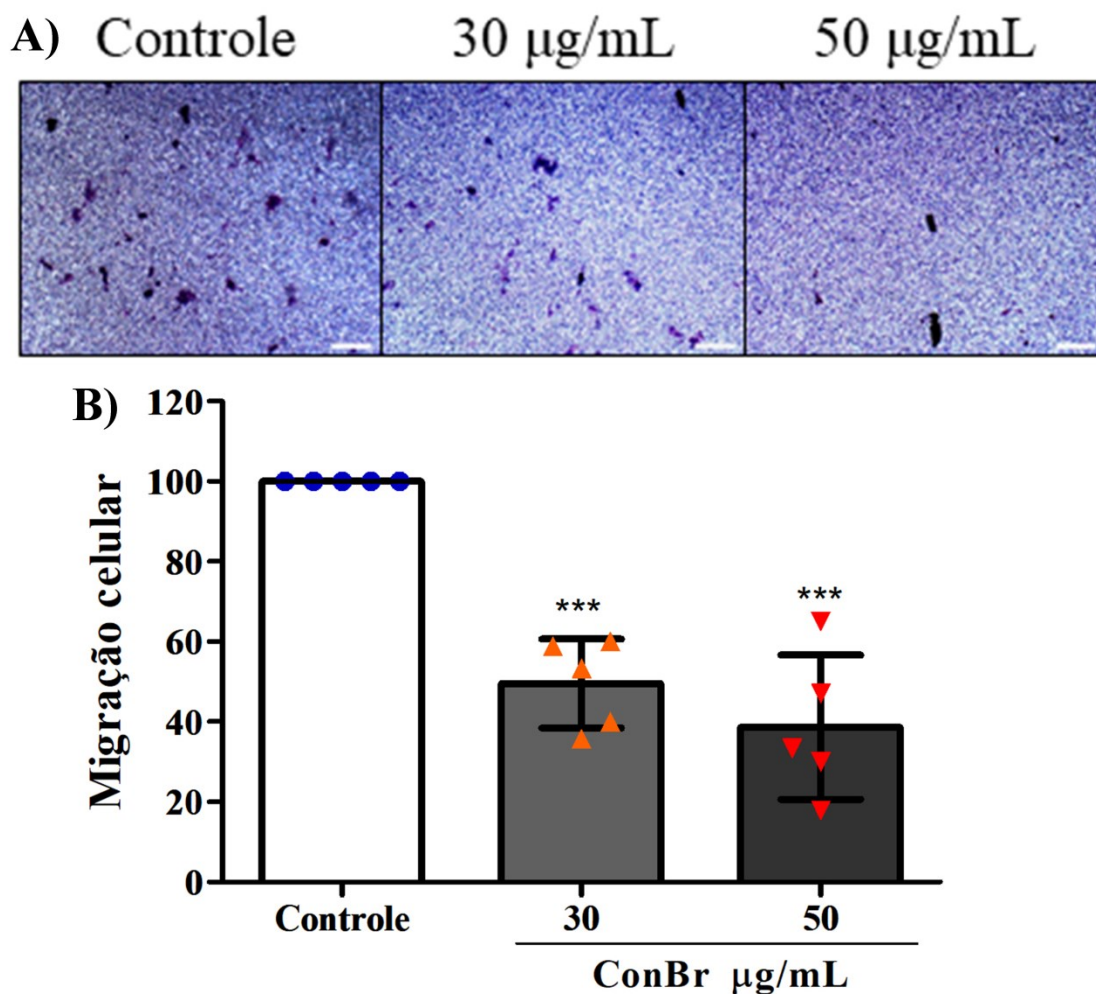
As vias de migração e motilidade celular são processos chaves do comportamento infiltrativo das células de glioma *in vivo*. Como já tínhamos mostrado previamente mediante o ensaio de migração por “*scratch*”, no estudo de mestrado (WOLIN, INGRID ALESSANDRA VICTORIA, 2017), após 24 h de exposição ConBr induz uma diminuição significativa na migração celular mesmo em concentrações menores onde não foi apresentado efeito citotóxico nas células.

Com a finalidade de confirmar que estes resultados prévios, obtidos no ensaio de migração por “*scratch*”, e com o objetivo de mostrar a capacidade da lectina de diminuir a migração e não somente a motilidade celular, foi realizado o ensaio de migração no “*transwell*”.

Na figura 15 se apresenta a resposta das células C6 expostas por 24 h a veículo ou 30 e 50 µg/mL de ConBr. Como é visível na figura 15A, as células expostas ao veículo migraram muito mais em direção ao meio quimioatraente (DMEM F12 + 10% SFB) que as células

tratadas com a lectina. A figura 15B, mostra uma inibição na migração celular das células expostas a 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 50 e 60%, respectivamente [$F_{(2,5)}=1,628$; $p < 0,001$].

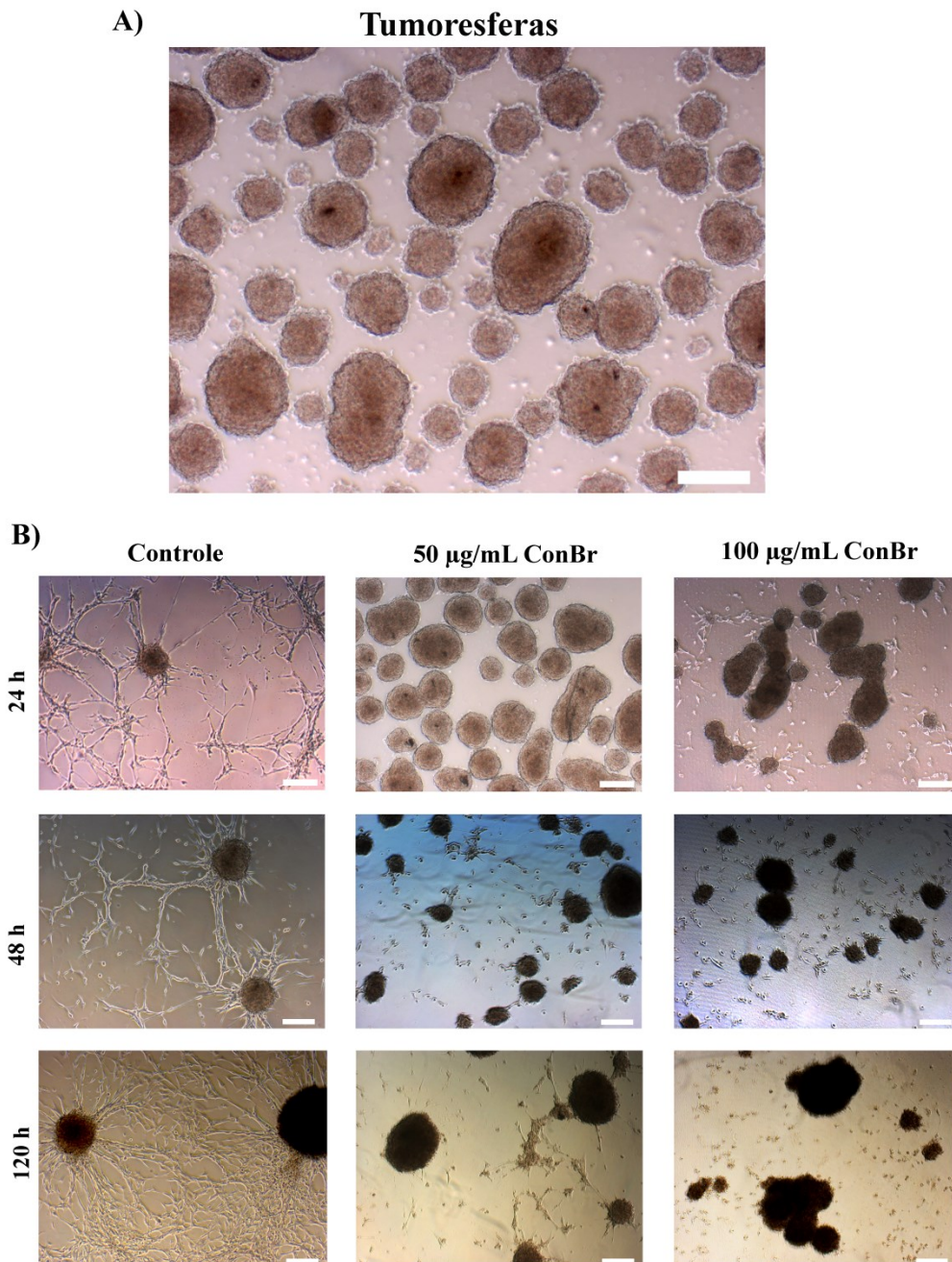
Figura 15. O tratamento com ConBr possui efeito citostático nas células C6 de glioma diminuindo a capacidade de migração celular no poço de *transwell*. Células da linhagem C6 foram expostas a ConBr nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou veículo (Tampão HEPES-salina; controle) por 24 h. Após o período de tratamento as células foram fixadas com paraformaldeído (4 %) e coradas com Cristal violeta. As células foram visualizadas através do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. A) Representativo da coloração das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm . B) Quantificação da migração. Os experimentos (N=5) foram realizados em quintuplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



Tendo em conta que as culturas 3D (tumoresferas) da linhagem U-87 possuem similaridades morfológicas e funcionais com a estrutura do tecido tumoral *in vivo*, fomos avaliar a migração celular nesse modelo em resposta ao tratamento com ConBr. Um aspecto importante a ser ressaltado é que a linhagem U-87 MG não tinha apresentado diminuição da viabilidade celular frente ao tratamento com ConBr, como apresentado na figura 12.

Como pode ser observado na figura 16B o tratamento com ConBr retardou a capacidade das tumoresferas de se aderirem à superfície da placa, mostrando que a lectina pode prejudicar a repopulação celular. Como pode ser observado as tumoresferas tratadas com o veículo (controle), após 24 h de sua transferência para a placa de 24 poços, sem Pluronic F-127, conseguiram se fixar ao substrato e começaram a migrar, aumentando o deslocamento das células e igualando-se a adesão e espalhamento celular de uma cultura da linhagem U-87 MG. Dessa forma, pode ser sugerido que, embora não tenha mostrado uma capacidade de diminuir a viabilidade das células U-87 MG, ConBr aparentemente poderia se ligar a alguma estrutura celular ou da matriz reduzindo a capacidade migratória das células de glioma.

Figura 16. O tratamento com ConBr possui efeito citostático sobre as tumoresferas da linhagem U-87 MG diminuindo a capacidade de migração/adesão celular no poço da placa. As tumoresferas foram expostas a ConBr nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ou veículo (Tampão HEPES-salina, controle) por 24, 48 e 120 h. A) Representativo da morfologia das tumoresferas antes do tratamento. B) Representativo da resposta das tumoresferas ao tratamento. As imagens foram capturadas através do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. Barra de escala representa 200 μm .



7.2.3 A lectina ConBr modula as vias de sinalização dependentes de MAPKs e Akt nas células C6 de glioma

Considerando que a queda da viabilidade celular das células C6 frente ao tratamento com ConBr foi observada a partir de 12 h de tratamento, escolhemos este período para avaliar se o tratamento interferiria na modulação da sinalização de MAPKs e Akt. A figura 17A

representa a resposta na sinalização nas células C6 frente ao tratamento por 12 h com ConBr e veículo. Estes resultados demonstram um incremento na fosforilação de JNKs e p38^{MAPK}, acompanhado de uma diminuição na fosforilação de ERKs e Akt.

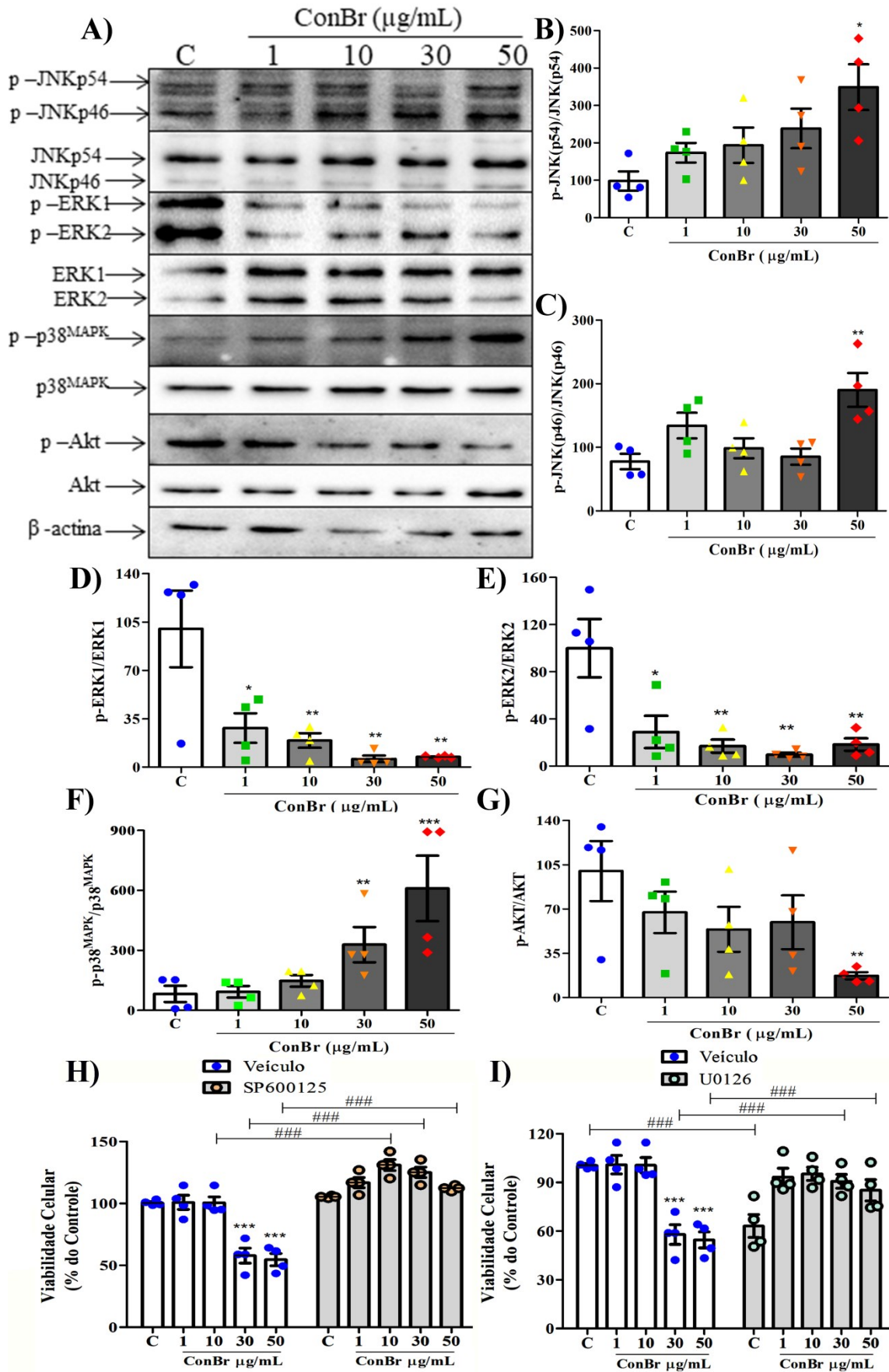
Nas figuras 17B-C observa-se que ocorreu um aumento na fosforilação de JNK(p54) e JNK(p46) em resposta à exposição de 50 µg/mL de ConBr em comparação ao controle [$F_{(4,4)}=3,966$; $p < 0,01$] e [$F_{(4,4)}=6,436$; $p < 0,001$], respectivamente. Entretanto, como mostrado na figura 17F houve um incremento de 7 vezes na fosforilação de p38^{MAPK} em resposta à exposição de 30 e 50 µg/mL comparado ao controle [$F_{(4,4)}=7,396$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$].

Por outro lado, como exibido nas figuras 17D-E, ConBr diminuiu significativamente a fosforilação das ERKs em todas as concentrações testadas (ERK1 [$F_{(4,4)}=10,47$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$] e ERK2 [$F_{(4,4)}=7,798$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$]). Porém, como evidenciado na figura 17G somente a concentração de 50 µg/mL de ConBr conseguiu suprimir significativamente a fosforilação de Akt comparado ao controle [$F_{(4,4)}=6,129$; $p < 0,01$].

Tomados em conjunto, estes resultados sugerem um padrão de efeitos da ConBr sobre a fosforilação das MAPKs e Akt que pode resultar na indução de morte ou diferenciação celular. Com esse intuito, fomos avaliar o que aconteceria com o efeito citotóxico da lectina ConBr frente aos inibidores de JNKs e ERKs.

Como exposto nas figuras 17H-I, quando as células C6 foram pré-tratadas com SP600125 (inibidor das JNKs) ou U0126 (inibidor das ERKs), a lectina não apresentava efeito citotóxico nas células [$F_{(9,12)}=1,870$; $p < 0,001$] e [$F_{(9,12)}=2,464$; $p < 0,001$], respectivamente. Sugerindo que a lectina ConBr pode modular, de forma complexa, diversas vias de sinalização e que seu efeito citotóxico é aparentemente dependente da sinalização de JNKs e ERKs.

Figura 17. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da ConBr nas células C6 de glioma é dependente das vias de sinalização JNK e ERK. A) Western blot representativo das células C6 expostas ao veículo ou ConBr por 12 h. A quantificação das proteínas é apresentada em B) JNKp54, C) JNKp46 D) ERK1, E) ERK2, F) p38^{MAPK} e G) Akt. Efeito dos inibidores de JNK e ERK na viabilidade celular medido pelo método de MTT. As células da linhagem C6 foram pré-tratadas com H) 10 µM de SP600125 (inibidor de JNK) por 7 h ou I) 10 µM de U0126 (inibidor de MEK/ERK) por 30 min, após este período as células foram cotratadas com a lectina por 24 h, sendo realizada uma comparação da viabilidade das células tratadas somente com a lectina. Os dados são expressos em relação ao controle (100%) e os valores são representados como média ± E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com só lectina na mesma concentração.

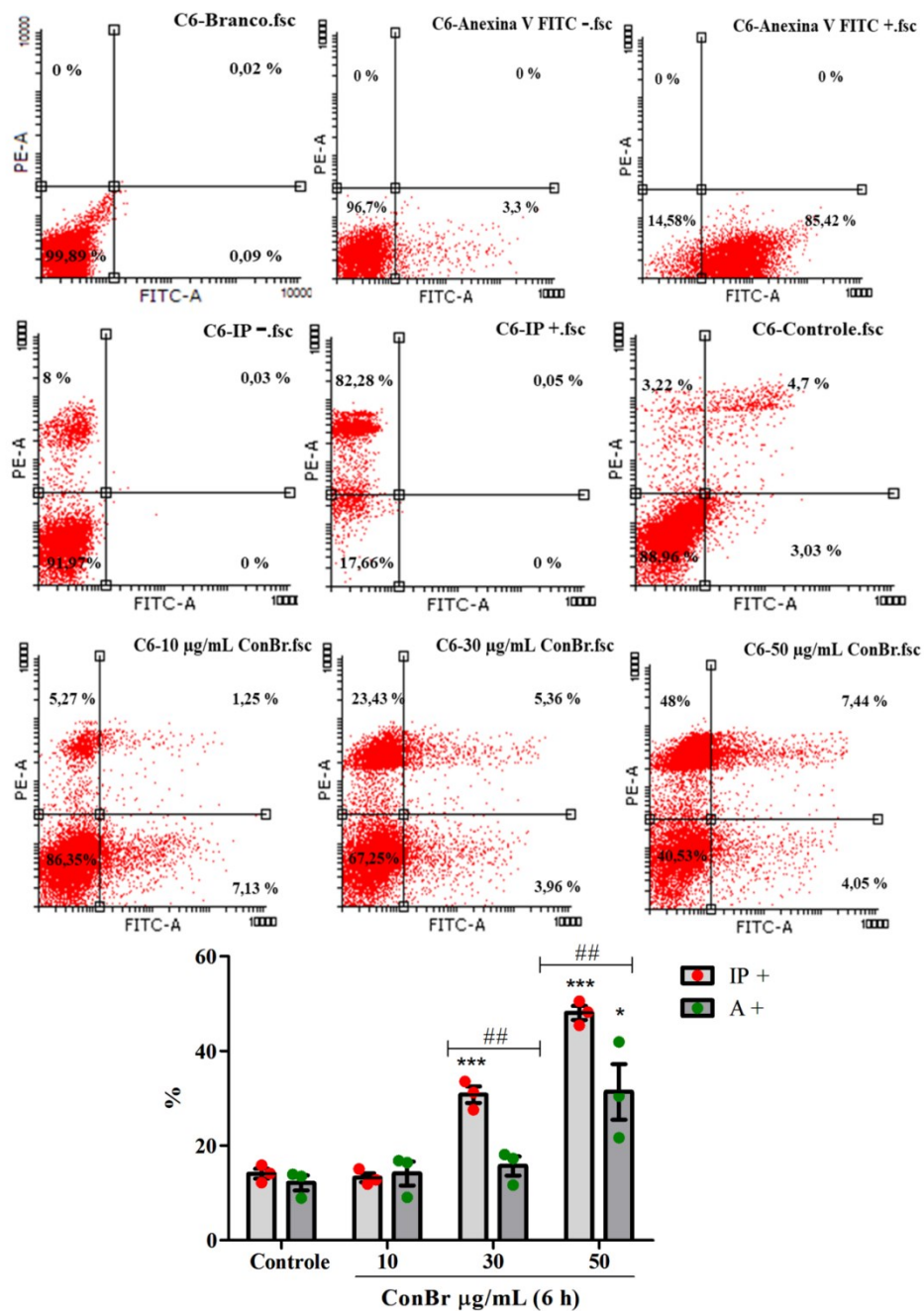


6.2.4 A ativação do processo de autofagia e de caspase-8 promovem a morte das células C6 tratadas com ConBr

Um próximo ponto avaliado foi a caracterização da possível via de morte celular desencadeada pela lectina ConBr.

A figura 18 mostra a classificação e contagem celular avaliada por citometria de fluxo das células C6 expostas por 6 h ao tratamento com ConBr ou veículo na presença dos biomarcadores Anexina-V-FITC (indicativo de morte celular por apoptose) e IP (indicativo de perda da integridade da membrana plasmática). Pode-se observar nos gráficos de “*dot plot*” que somente 50 µg/mL de ConBr causou um incremento de 4,05% na marcação para anexina-V-FITC⁺/IP⁻ e 7,44% na marcação para Anexina-V-FITC⁺/IP⁺, apresentado no gráfico de barra como A⁺ [$F_{(3,3)}=5,873$; $p < 0,05$]. Diferentemente, o incremento da marcação para IP⁺ foi de 23,43% e 48% para 30 e 50 µg/mL de ConBr, respectivamente [$F_{(3,3)}=5,873$; $p < 0,001$]; enquanto a marcação para IP⁺ foi de apenas 3,22% nas células tratadas com o veículo. Estes dados de marcação de IP concordam com os dados obtidos na microscopia de fluorescência apresentado na figura 14.

Figura 18. O incremento da incorporação de IP nas células C6 de glioma produto do tratamento com ConBr não foi equivalente à marcação de Anexina-V-FITC. Células da linhagem C6 foram expostas à ConBr nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 6 h. Após o período de tratamento as células foram coradas com Iodeto de Propídeo (IP) e Anexina-V-FITC (A). Como controle do experimento (dupla marcação negativa para IP e A) as células foram tratadas com o veículo, como controle IP+ as células foram submetidas por 20 min em nitrogênio líquido e para A+ foram tratadas por 3 h com Staurosporina (1 μM). O ensaio foi realizado no aparelho FACS Canto (Becton Dickinson®), através da contagem de 10.000 eventos por amostras. Análise dos dados obtidos foi feita através do software livre Flowing 2.5.1®. Os dados foram analisados através de gráficos de pontos “dot plots” segundo os parâmetros PE-A (eixo y) e FITC-A (eixo x). O gráfico de histograma foi realizado em função das porcentagens obtidas de três experimentos realizados em triplicata, os dados são expressos em relação ao controle (100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação às diferenças entre tratamento.

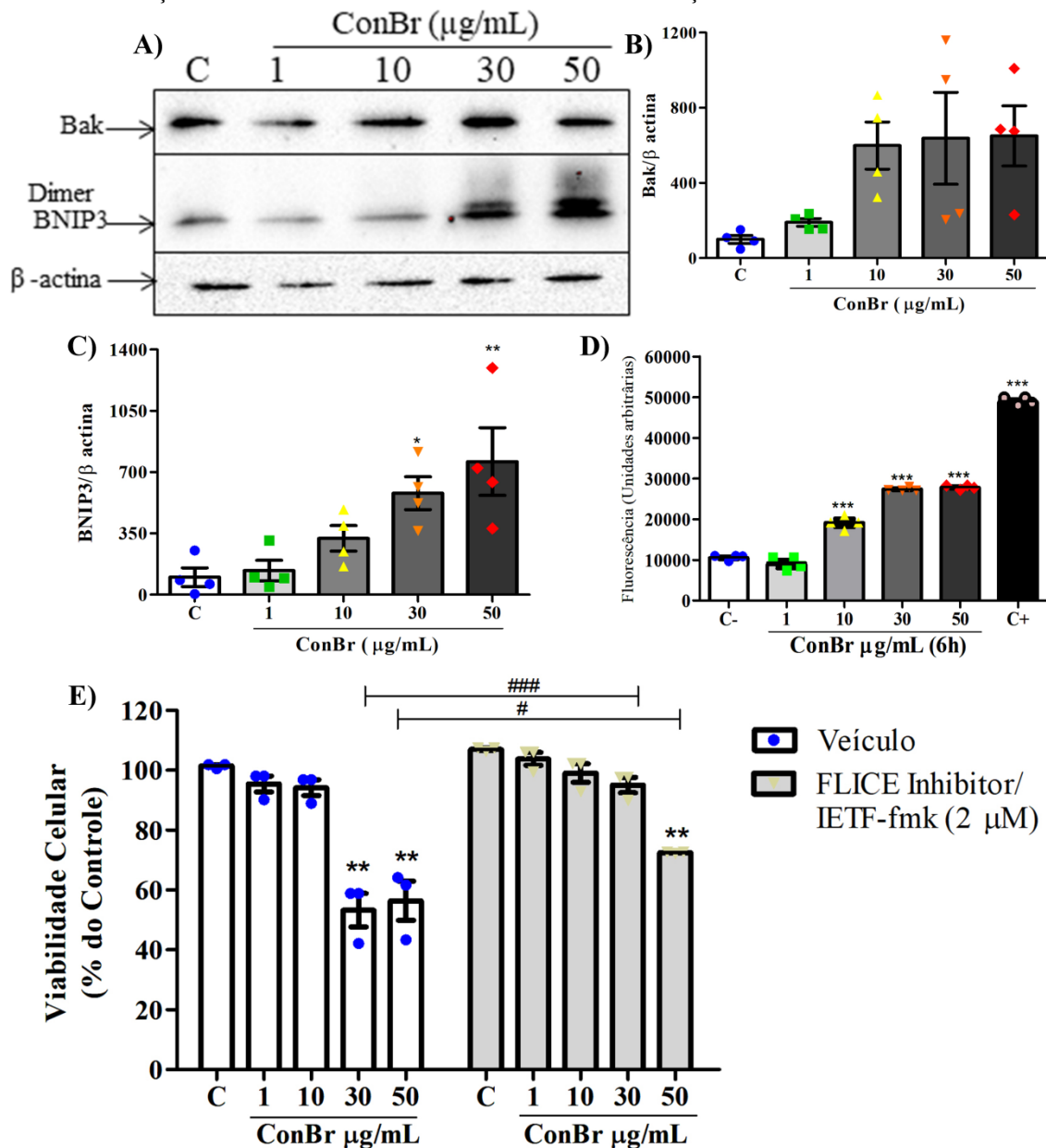


A figura 19 mostra uma análise da modulação de proteínas da via apoptótica nas células C6 frente ao tratamento com ConBr. Na figura 19A se apresenta um resrepresentativo da resposta na sinalização celular para Bak e BNIP3 nas células C6 frente ao tratamento por 12 h com ConBr e veículo. Como se observa na figura 19B não foram demonstradas alterações significativas na expressão de Bak comparado ao controle. Porém, na figura 19C nota-se um incremento de 7 vezes na expressão de BNIP3 em resposta a 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr comparado ao controle [$F_{(4,4)}=8,340$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente].

Notavelmente, também foi observado uma ativação de caspase-3 (Fig. 19D) com um incremento de 2 vezes em resposta a 10 $\mu\text{g/mL}$ e de 3 vezes para 30-50 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr [$F_{(5,4)}= 2,787$; $p < 0,001$], quando avaliados com o Kit comercial “EnzChek[®] Caspase-3 Assay Kit”.

Com a finalidade de explicar o porquê tínhamos um incremento na ativação de caspase-3 quando a marcação para anexina-V-FITC somente tinha sido significativa na maior concentração, mas não sendo um incremento marcante; resolvemos avaliar se este resultado estaria relacionado com a ligação da lectina aos resíduos glicosídicos dos receptores de morte. Para isso, fomos avaliar o que aconteceria com o efeito citotóxico da lectina ConBr quando utilizado o inibidor de Caspase-8 (IETF-fmk). Na figura 19E é mostrado que o efeito citotóxico da lectina ConBr foi bloqueado nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ [$F_{(9,12)}= 6,653$; $p < 0,001$ e $p < 0,05$], respectivamente.

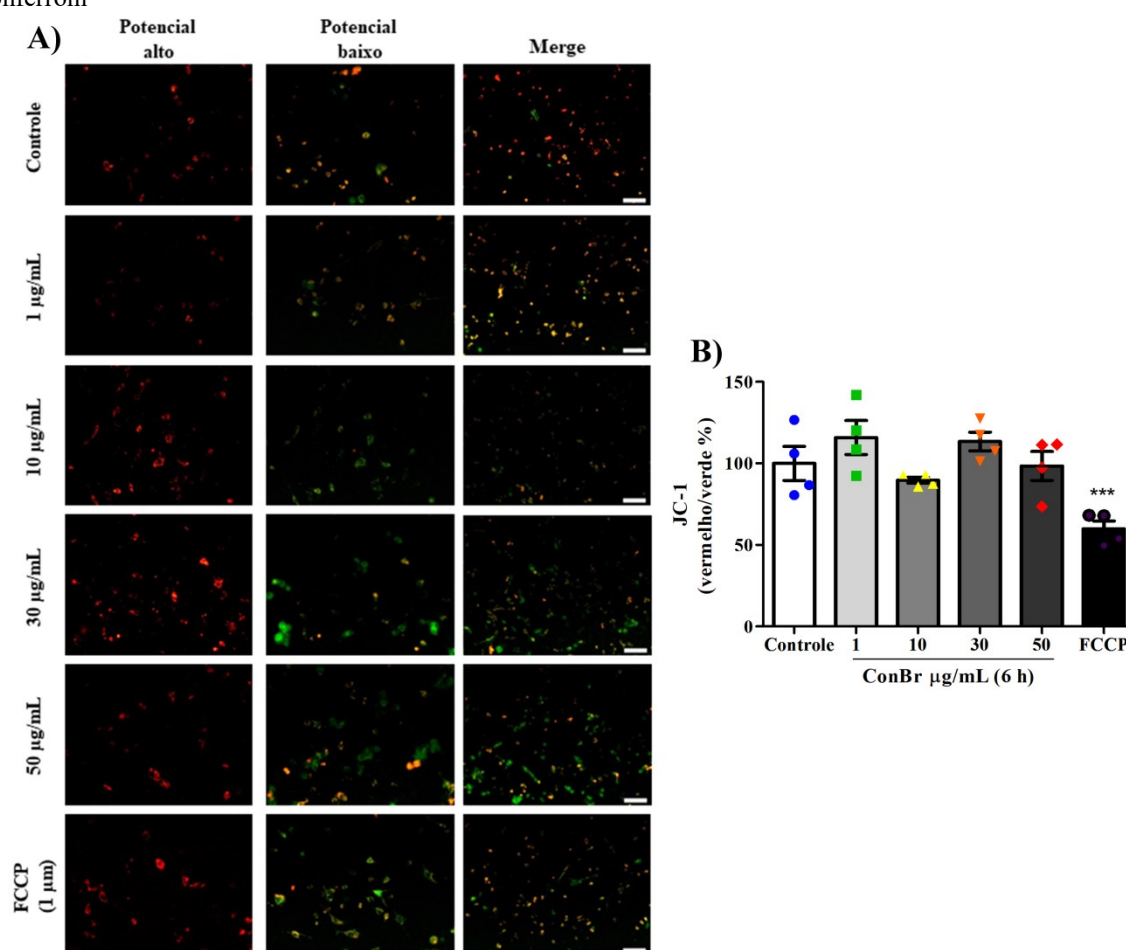
Figura 19. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da ConBr nas células C6 de glioma é dependente da ativação de Caspase-8. A) Western blot representativo das células C6 expostas ao veículo ou ConBr por 12 h. A quantificação das proteínas é apresentada em B) Bak e C) BNIP3. D) Ensaio da atividade de Caspase-3 das células C6 expostas por 6 h ao tratamento. Foi considerado C- às células expostas ao veículo e C+ às células expostas por 3 h a staurosporina (1 μ M). E) Efeito do inibidor de Caspase-8 (IETF-fmk) na viabilidade celular medido pelo método de MTT. As células da linhagem C6 foram pré-tratadas com 2 μ M do inibidor de caspase-8 por 6 h, após este período às células foram tratadas com a lectina por 24 h, sendo realizada uma comparação da viabilidade das células tratadas só com a lectina. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com só lectina na mesma concentração.



A figura 20 revela a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, pela sonda JC-1, das células C6 expostas por 6 h a ConBr. Onde pode-se apreciar como não houve alterações significativas no potencial de membrana mitocondrial em resposta ao tratamento.

Estes resultados concordam com os obtidos na figura 19E, descartando-se a possibilidade de que a lectina ativaria processos de apoptose pela via intrínseca.

Figura 20. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da ConBr nas células C6 de glioma não interfere no potencial de membrana mitocondrial. Células da linhagem C6 foram expostas ao veículo (Tampão Hepes-salina, controle), 1 μ M de FCCP (controle positivo) ou ConBr por 6 h. Após o período de tratamento, as células foram coradas com a sonda JC-1. A) Visualização das células através de microscopia de fluorescência, com o auxílio de microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. B) Quantificação da leitura de fluorescência realizada no multileitor SpectraMax Molecular Device em 490 nm de emissão e 520 nm de excitação (verde) e 525 nm de emissão e 590 nm de excitação (vermelho). Os dados são expressos em relação ao veículo considerado 100% e os valores representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni

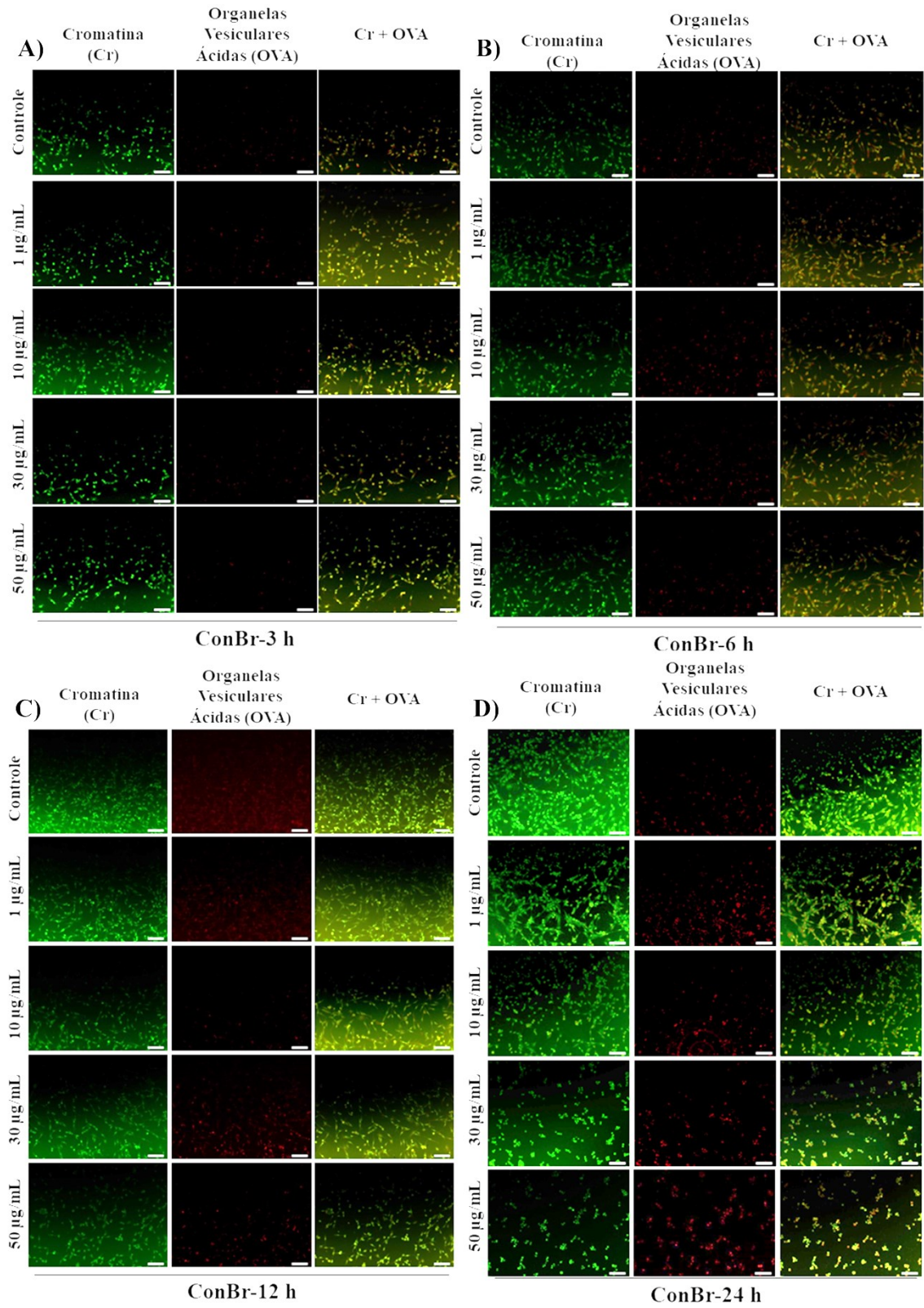


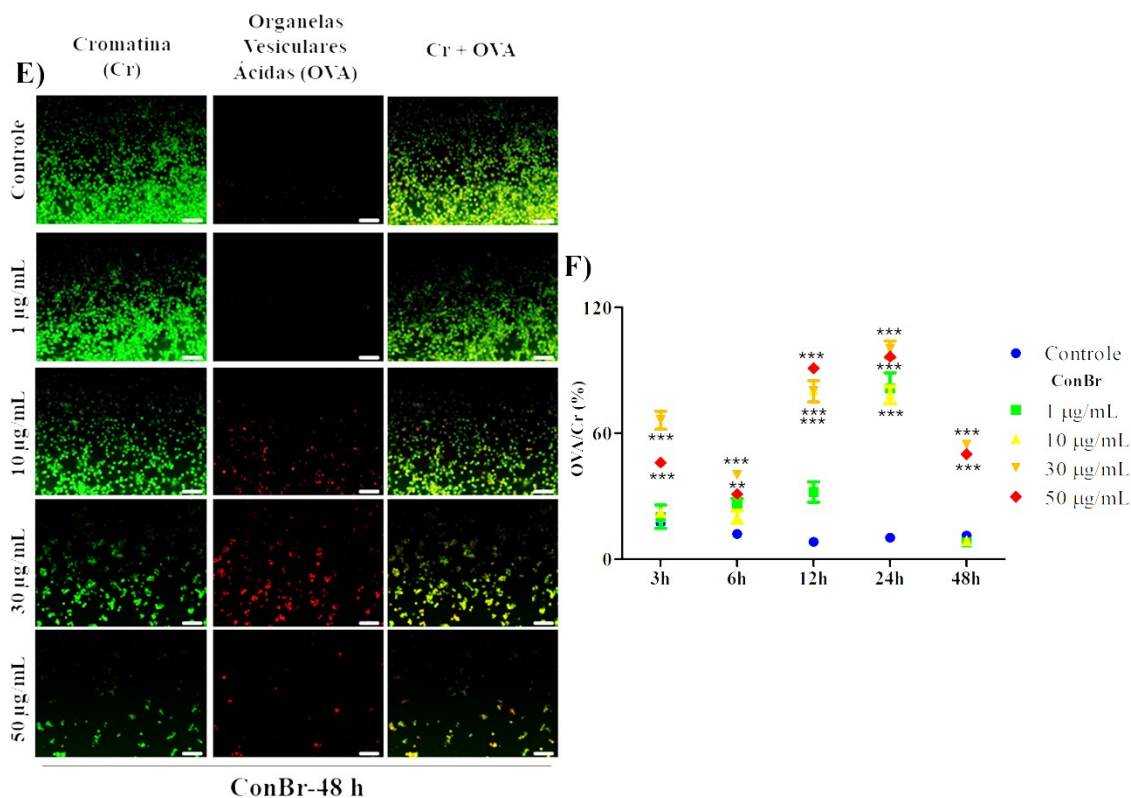
Uma vez descartado que a lectina fosse capaz de ativar a apoptose pela via intrínseca, juntamente com o indicativo de que seu mecanismo de ação poderia envolver a ativação da caspase-8, resolvemos investigar se o processo de autofagia estaria também implicado no efeito citotóxico induzido por ConBr.

A marcação por Laranja de Acridina (LA) é uma técnica relativamente fácil e permite detectar a presença de organelas vesiculares ácidas (OVA) presente nas células durante o processo de autofagia. O painel da figura 21A-E traz uma representação da

coloração com LA das células C6 expostas aos diferentes tempos de tratamento. Como apresentado na figura 21F, o tratamento com ConBr nas células C6 causou um significativo incremento na marcação de OVA a partir de 12 h de tratamento com as concentrações de 10 até 50 $\mu\text{g/mL}$ [$F_{(4,3)}=1,718$; $p < 0,001$]. Não obstante, a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em 12 h de tratamento não apresentou efeito citotóxico (Fig. 13B). Após 24 h de exposição, houve um incremento significativo em todas as concentrações testadas, porém este incremento só se manteve nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ no tratamento por 48 h [$F_{(4,3)}=1,718$; $p < 0,001$].

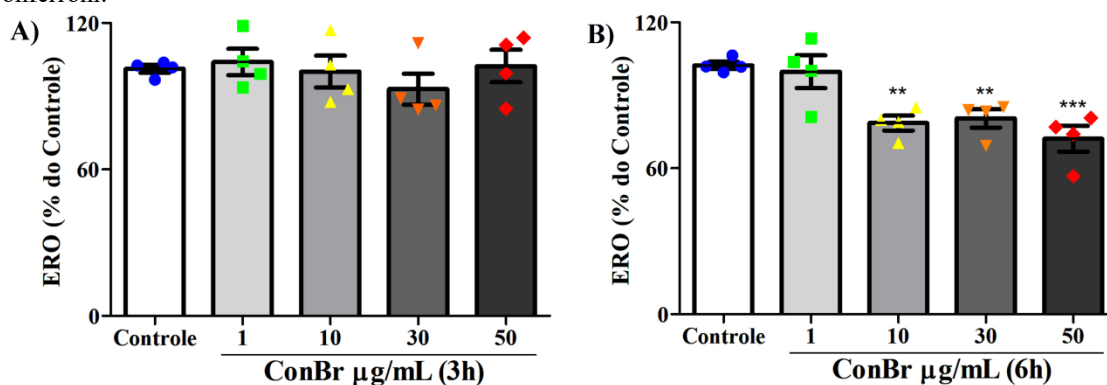
Figura 21. Aumento da marcação de organelas vesiculares ácidas (OVA) nas células C6 de glioma pelo tratamento com ConBr. Células da linhagem C6 foram expostas a ConBr nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e veículo (Tampão Hepes-salina; controle) por 3, 6, 12, 24 e 48 h. Após o tratamento as células foram coradas com Laranja de Acridina e visualizadas através de microscopia de fluorescência utilizando um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. A-E) Representativo da coloração das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm . F) Quantificação da fluorescência nas células expostas aos diferentes tratamentos. Os experimentos (N=4) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem dos valores absolutos obtidos em cada tratamento. *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.





Outro ponto muito interessadamente analisado e mostrado na figura 22, mediante a sonda DCF-DA, foi uma diminuição nos níveis de produção de ERO a partir de 6 h de exposição a 10-50 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr [$F_{(4,12)}=4,769$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$].

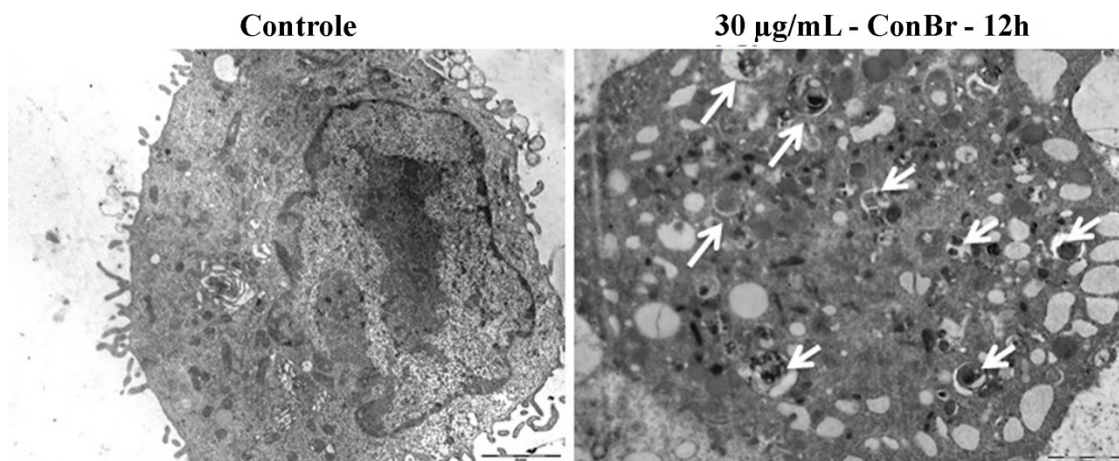
Figura 22. O mecanismo de ação da ConBr envolve diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio nas células C6. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) mediante a sonda DCF-DA das células tratadas com ConBr por A) 3 h e B) 6 h. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



Notavelmente, os resultados da marcação de OVA foram confirmados na análise das características morfológicas das células no nível subcelular pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). A figura 23 indica a presença de numerosos vacúolos autofágicos,

vacúolos vazios e lisossomos secundários nas células C6, após o tratamento por 12 h com 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConBr. A maioria dos autofagolisossomos continham estruturas lamelares ou materiais digeridos residuais. Os vacúolos maiores, com material degradado não circundado por uma dupla membrana, representam vacúolos autofágicos maduros. A formação persistente de autofagossomos está correlacionada com uma redução progressiva das organelas intracelulares em resposta ao tratamento. Assim como os vacúolos autofágicos membranosos eletrodensos, corpos multivesiculares e o englobamento de organelas inteiras.

Figura 23. Aumento da formação de organelas vesiculares ácidas (OVA) nas células C6 de glioma tratadas com 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConBr. Células da linhagem C6 foram expostas a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConBr ou veículo (Tampão Hepes-salina, controle) por 12 h. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico Ziess Leo 906-E equipamento com a câmera digital Megaview III (Oberkochen, Alemanha). As setas em branco indicam as organelas vesiculares ácidas ou vesículas autofágicas com membrana típica de camada dupla contendo remanescentes de organelas.



Dando sequência ao estudo da indução de autofagia pela lectina, foi avaliado o conteúdo de proteínas envolvidas no processo autofágico. Na figura 24A é apresentado um representativo da modulação de proteínas associadas a processos autofágicos nas células C6 frente ao tratamento por 12 h com ConBr.

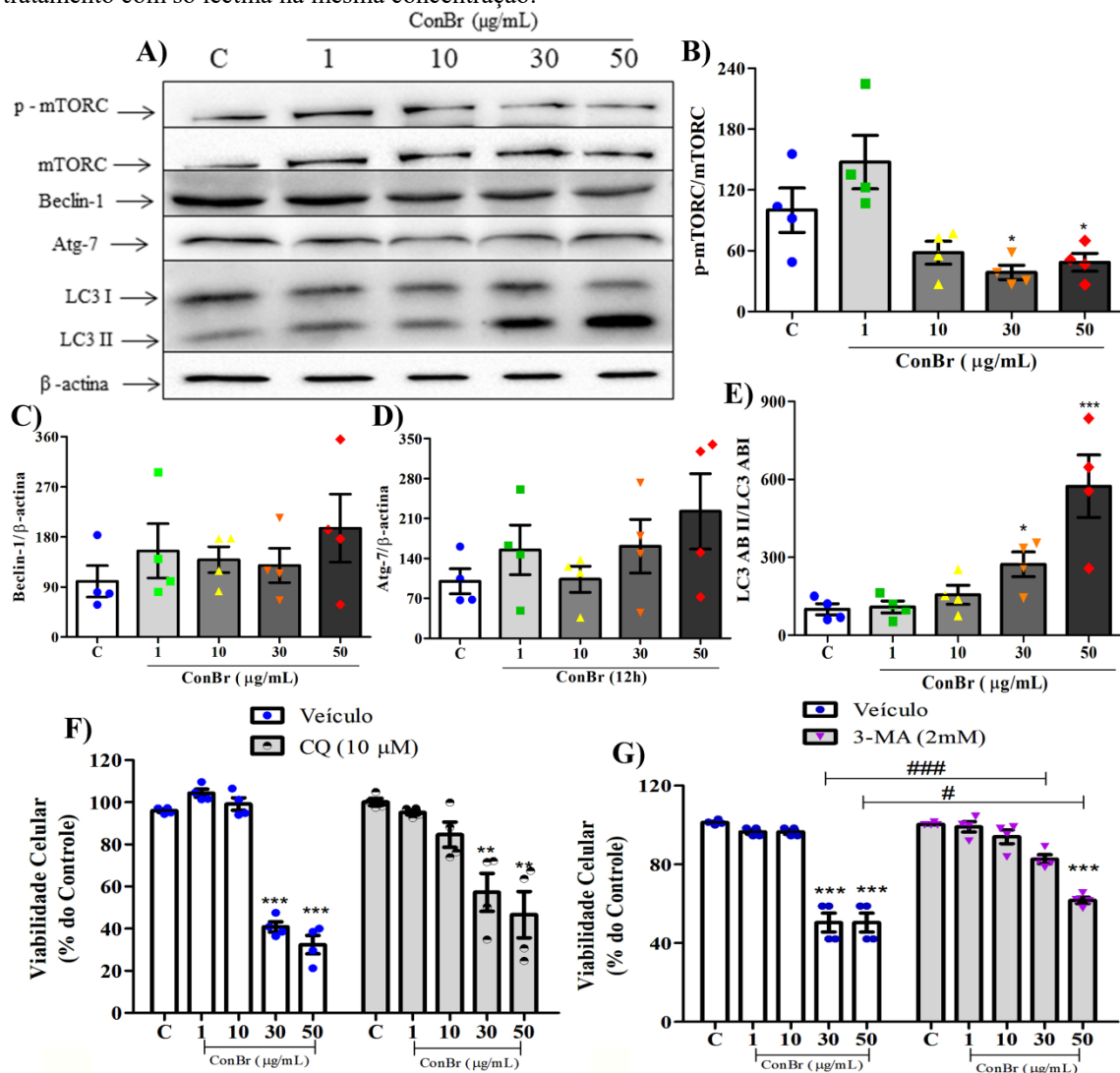
Notavelmente, a indução da formação de OVA, como apreciado anteriormente (Fig. 21), foi acompanhado por uma diminuição na fosforilação de mTORC1 (Fig. 24B) [$F_{(4,4)}=5,843$; $p < 0,05$] e um incremento de 3 até 6 vezes na clivagem de LC3I para LC3II (Fig. 24E) nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConBr [$F_{(4,4)}=14,50$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$], respectivamente. Entretanto, os níveis de Beclin-1 e Atg-7 não apresentaram diferenças estatísticas (Fig. 24C-D).

Finalmente, para identificar o papel do processo autofágico na indução de morte celular induzida pela lectina, as células C6 foram pré-tratadas com inibidores da autofagia, 3-MA ou CQ.

A figura 24G indica que o efeito citotóxico induzido por 30 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr foi bloqueado pela inibição dos primeiros passos da autofagia com 3-MA [$F_{(9,12)} = 1,661$; $p < 0,001$], enquanto o efeito de 50 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr foi parcialmente bloqueado [$F_{(9,12)} = 1,661$; $p < 0,05$].

A figura 24F mostra que o bloqueio da formação do autofagolisossomo com CQ não ocasiona uma proteção significativa frente ao efeito citotóxico da lectina.

Figura 24. O tratamento das células C6 com ConBr produz um mecanismo de crosstalk entre a ativação de caspase-8 e degradação autofágica. A) Western blot representativo das células C6 expostas ao veículo ou ConBr por 12 h. A quantificação das proteínas é apresentada em B) mTORC, C) Beclin-1 D) Atg-7 e E) LC3. O efeito dos inibidores de autofagia sobre a viabilidade celular foi medido pelo método de MTT. As células da linhagem C6 foram pré-tratadas com F) 10 μM de CQ por 24 h ou G) 2 mM de 3-MA por 1 h, após esse período às células foram cotratadas com a lectina por 24 h, sendo realizada uma comparação da viabilidade das células tratadas somente com a lectina. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com só lectina na mesma concentração.



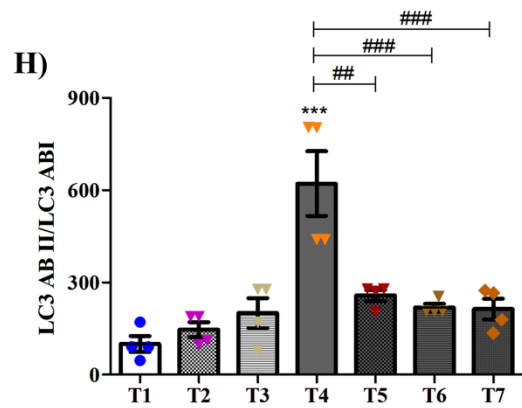
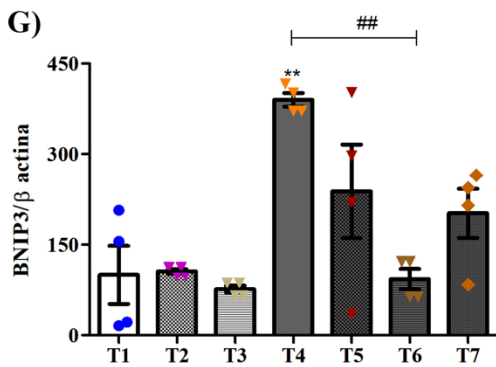
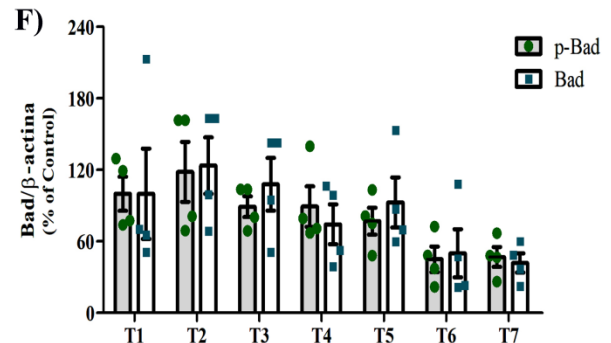
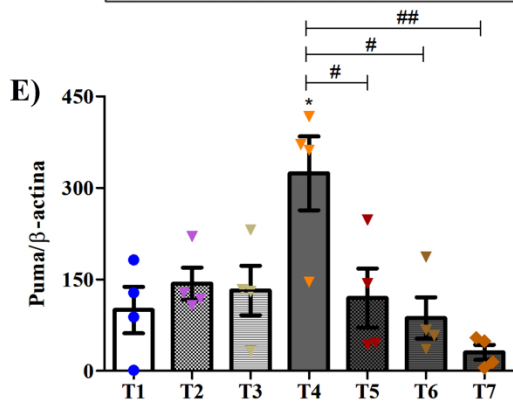
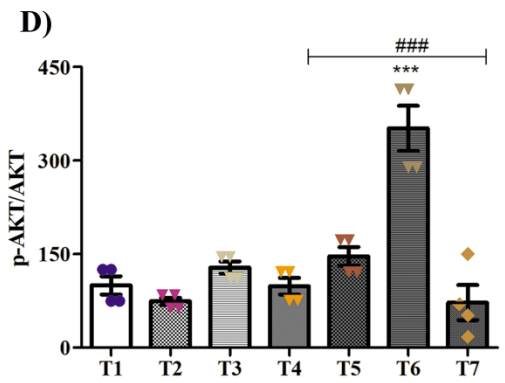
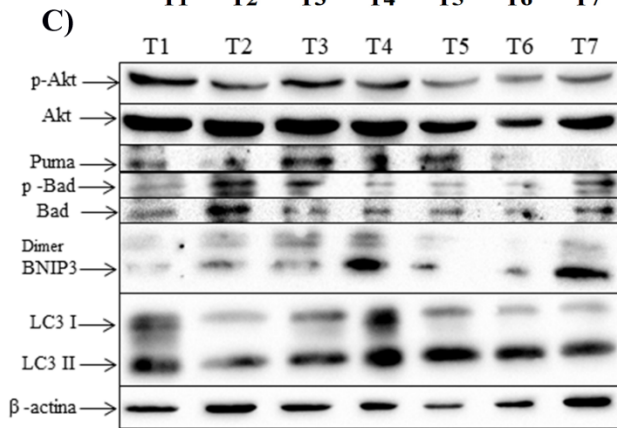
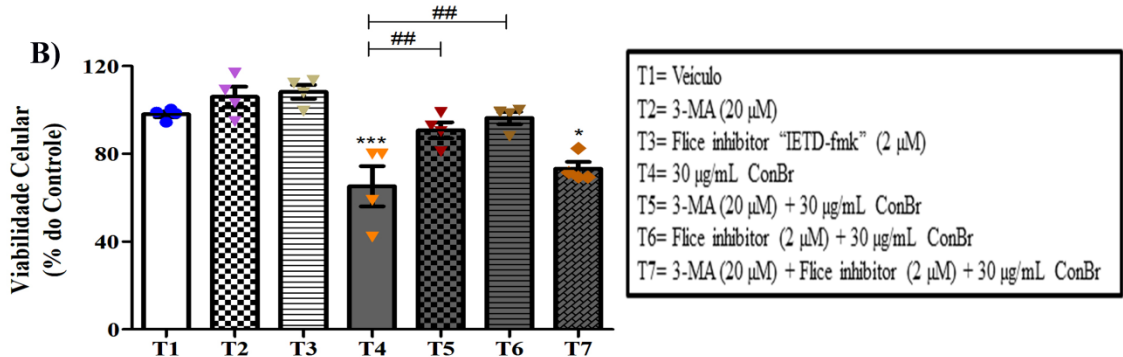
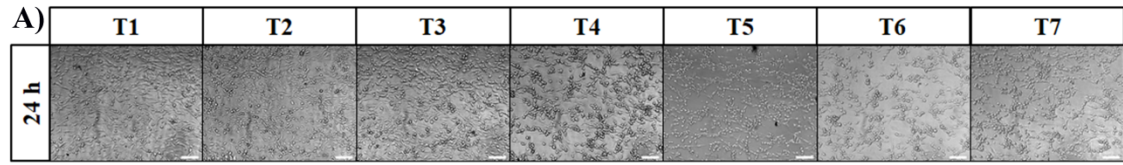
Com o interesse em corroborar que realmente estaria existindo um mecanismo de comunicação entre a ativação da caspase-8 e a degradação autofágica, resolvemos analisar a resposta das células C6 pré-tratadas com os inibidores 3-MA e/ou IETF-fmk e subsequente co-tratadas com 30 µg/mL de ConBr.

Na figura 25A-B nota-se, pela análise morfológica e teste de viabilidade (MTT), que o efeito citotóxico da lectina ConBr em 24 h foi prevenido pelo pré-tratamento com 3-MA e IETF-fmk [$F_{(6,12)}=14,89$; $p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente], porém o co-tratamento com os dois inibidores ao mesmo tempo e 30 µg/mL de ConBr não foi capaz de inibir efeito citotóxico da lectina [$F_{(6,12)}= 14,89$; $p < 0,05$].

Em relação à expressão de proteínas apoptóticas e autofágicas foi observado que depois de 12 h de tratamento ConBr incrementou a expressão de Puma (Fig. 25E [$F_{(6,4)}= 5,148$; $p < 0,05$]), BNIP3 (Fig. 25G [$F_{(6,4)}= 7,727$; $p < 0,01$]) e a clivagem de LC3I (Fig. 25H [$F_{(6,4)}= 11,04$; $p < 0,001$]), mas não alterou a expressão de Bad (Fig. 25F). Notavelmente, os pré-tratamentos com 3-MA ou IETF-fmk foram capazes de bloquear o efeito citotóxico da ConBr. Além disso, o pré-tratamento com IETF-fmk em especial, foi capaz de aumentar cerca de 3 vezes o nível de fosforilação de Akt (Fig. 25D [$F_{(6,4)}= 66,6$; $p < 0,001$]).

Tomando esta linha de evidências sugerimos que ConBr promove autofagia e que este processo é responsável pelo mecanismo de ação citotóxica da lectina sobre as células C6. Além disso, pode ser aventado um mecanismo de comunicação entre a ativação da caspase-8 e o processo autofágico induzido pela lectina.

Figura 25. O tratamento das células C6 com ConBr produz um mecanismo de *crosstalk* entre a ativação de caspase-8 e degradação autofágica. As células C6 foram pré-tratadas por 6 h com 2 µM de IETF-fmk ou 1 h com 3-MA, ou ainda com ambos os inibidores; após esse período foram co-incubadas com 30 µg/mL de ConBr por 12 ou 24 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito do tratamento sobre a morfologia das células expostas a 24 h de tratamentos com auxílio do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. Barra de escala representa 100 µm. B) Viabilidade celular frente ao tratamento medido pelo método da redução do MTT. C) Western blot representativo das células C6 expostas ao tratamento por 12 h, quantificação das proteínas D) Akt, E) Puma, F) Bad, G) BNIP3 e H) LC3. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média ± E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao veículo. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com só lectina na mesma concentração.



7.3 Mecanismos de ação biológica da lectina ConBr nas células GBM1 de glioblastoma humano

7.3.1 Os efeitos citotóxicos da ConBr sobre as células GBM1 estão associadas à formação de organelas vesiculares ácidas

Com o propósito de verificar se o efeito da ConBr observado sobre as células C6 de ratos poderia ser reproduzido em um modelo de células humanas, foi testada a capacidade da ConBr em reduzir a viabilidade celular na linhagem U-87 MG e sobre uma cultura primária de glioblastoma multiforme, GBM1. Os resultados apresentados na figura 12, mostraram a capacidade de ConBr em reduzir a viabilidade das células GBM1, mas não mostrou alteração da viabilidade sobre as células U-87 MG. Dessa forma, os efeitos de ConBr sobre GBM1 foram avaliados com mais detalhes.

A figura 26 mostra a resposta das células GBM1 expostas a ConBr (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h. Como claramente pode ser observado na figura 26A houve retração dos prolongamentos citoplasmáticos na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. A partir de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ houve perda de adesão celular envolvendo mudança das células de uma morfologia planar, aderente para uma morfologia esférica e em suspensão. Além disso, as células pareceram proliferar menos na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

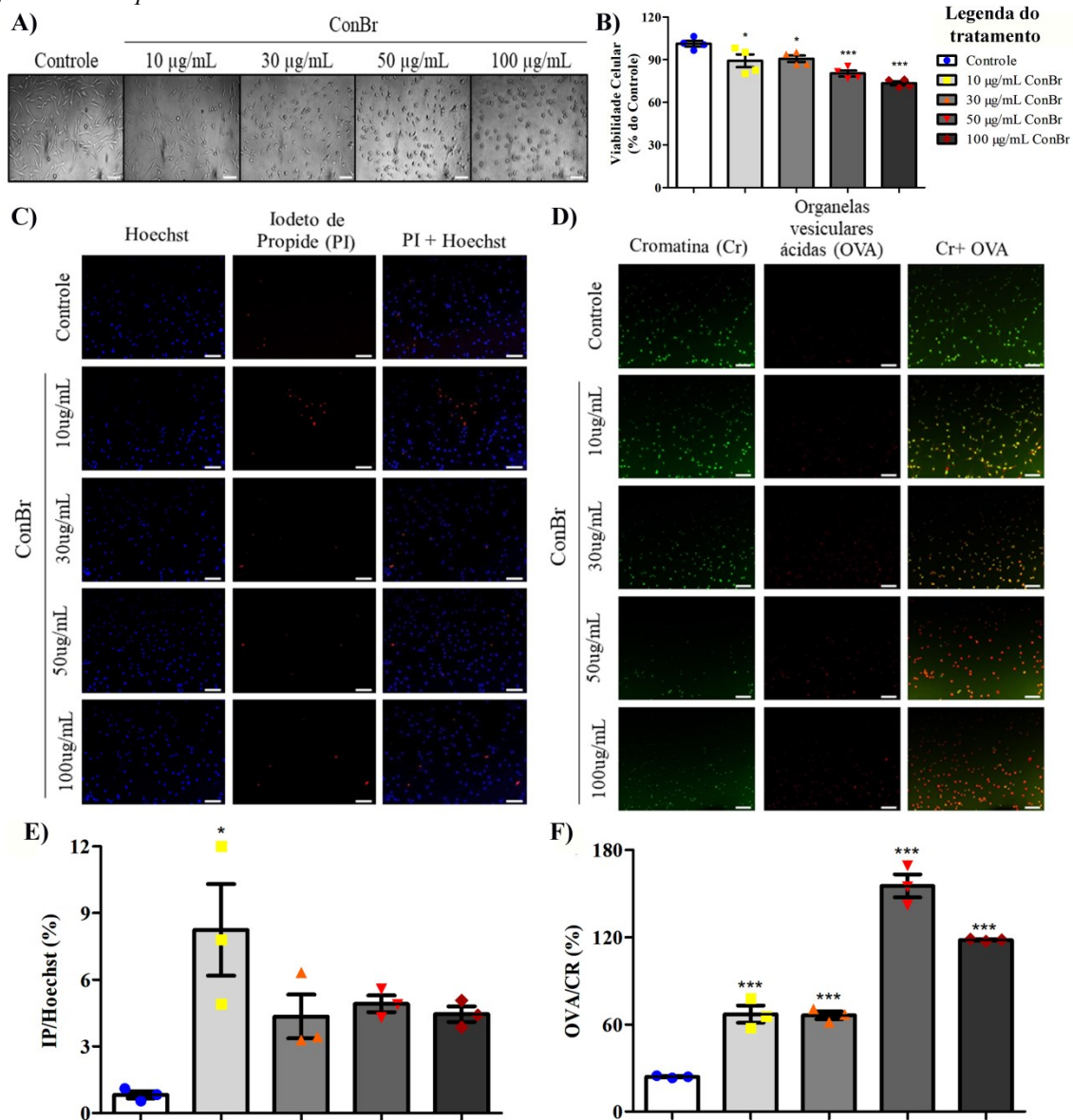
As alterações morfológicas foram acompanhadas por uma redução na viabilidade, avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Como mostra a figura 26B as concentrações de 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ induziram uma redução de 20% [$F_{(4,12)} = 28,48$; $p < 0,05$], entanto que as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziram mais de 30% a viabilidade celular [$F_{(4,12)} = 28,48$; $p < 0,001$].

Para verificar se as alterações morfológicas poderiam estar associadas com prejuízos na membrana celular, realizou-se a coloração com IP. Mas, como pode ser notado nas figuras 26C e 26E, não houve uma marcação pronunciada e significativa em resposta ao tratamento com a lectina ConBr.

Por fim, resolvemos investigar se o processo de autofagia estaria sendo ativado também nas células de GBM1, considerando que foi o mecanismo citotóxico que identificamos nas células C6. Para isso, as células GBM1 foram coradas com LA para detectar a presença de OVA em resposta à ConBr. Como constatado nas figuras 26D e 26F ocorreu um aumento na marcação de OVA como resposta ao tratamento sendo esta intensificada mais de 4 vezes nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ [$F_{(4,3)} = 3,679$; $p < 0,001$].

Figura 26. O tratamento com ConBr alterou a viabilidade celular das células GBM1.

Células de GBM1 foram expostas à ConBr nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ou veículo (Tampão HEPES-salina, controle) por 24 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da ConBr sobre a morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. B) Viabilidade celular frente ao tratamento com ConBr medido pelo método da redução do MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). C) Representativo fotográfico e E) quantificação das células coradas com Iodeto de Propídeo (IP) e Hoechst; D) Representativo fotográfico e F) quantificação das células coradas com Laranja de Acridina (LA). As visualizações foram realizadas através de microscopia de fluorescência com auxílio do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. Barra de escala representa 100 μm . Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados em porcentagem do valor absoluto de cada tratamento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



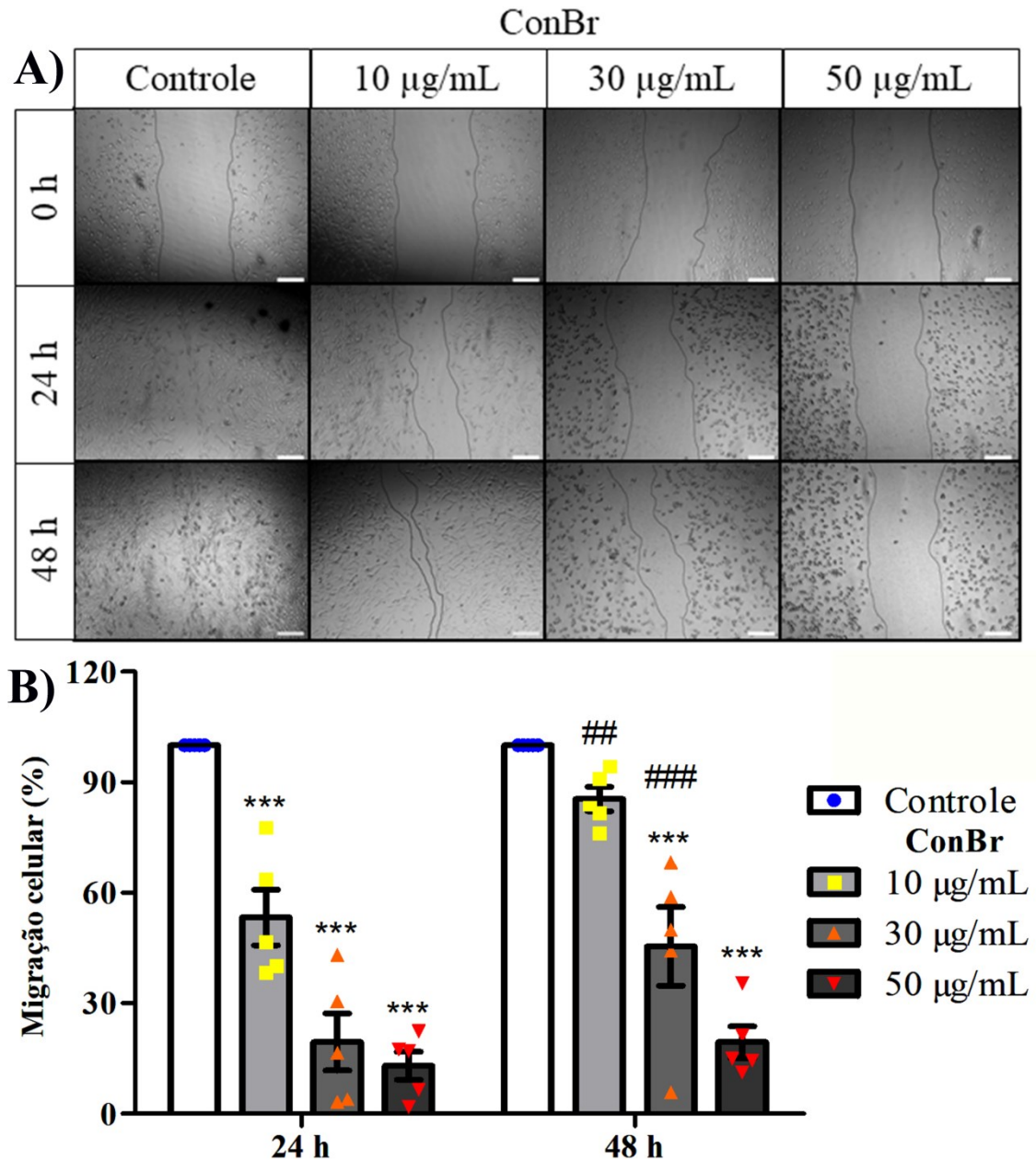
Considerando este conjunto de resultados, pode-se sugerir que o mecanismo de ação de ConBr sobre as células GBM1 humanas pode também envolver a ativação do processo autofágico, como observado previamente na linhagem C6 de ratos.

7.3.2 A ConBr diminui a capacidade de migração celular nas células GBM1

Com a intenção de analisar a capacidade da lectina ConBr exercer, além do efeito citotóxico, um efeito citostático sobre as células GBM1, foi realizado o ensaio de migração utilizando a metodologia do “*scratch*”.

A figura 27 mostra o efeito citostático da ConBr sobre as células de GBM1. Como pode ser apreciado nas fotos representativas de cada tratamento (Fig. 27A), nas células tratadas com veículo (controle) há um aumento da densidade celular chegando ao fechamento total da fissura ou risco em apenas 24 h após o tratamento. A quantificação dos resultados (Fig. 27B) revelou que as células de GBM1 tratadas por 24h com ConBr apresentaram uma diminuição significativa da migração celular, apresentando uma redução na migração/proliferação de 40% na concentração de 10 µg/mL [$F_{(3,5)} = 3,602$; $p < 0,001$], 70% na concentração de 30 µg/mL [$F_{(3,5)} = 3,602$; $p < 0,001$] e aproximadamente 80% na concentração de 50 µg/mL [$F_{(3,5)} = 3,602$; $p < 0,001$], comparadas ao controle. Quando avaliado o período de 48 h de tratamento observa-se que as concentrações de 10 e 30 µg/mL apresentaram diminuição na eficiência de inibição da migração [$F_{(3,5)} = 3,602$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente]. Entretanto, cabe observar que todas as concentrações de ConBr testadas continuam exercendo inibição no período de 48 h.

Figura 27. O tratamento com ConBr possui efeito citostático sobre as células GBM1, diminuindo a capacidade de migração celular. Células GBM1 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou ConBr nas concentrações 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo a migração analisada nos tempos 0, 24 e 48 h. A) Representativo do acompanhamento do fechamento do risco mediante o auxílio do microscópio invertido NOKON eclipse T2000-U. A barra de escala representa 200 μm . B) Quantificação do fechamento do risco avaliada com auxílio do software Image J. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem dos dados absolutos obtidos em cada tratamento. *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao veículo. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com lectina na mesma concentração.



7.4 Avaliação da citotoxicidade da lectina ConBr sobre culturas celulares não tumorais.

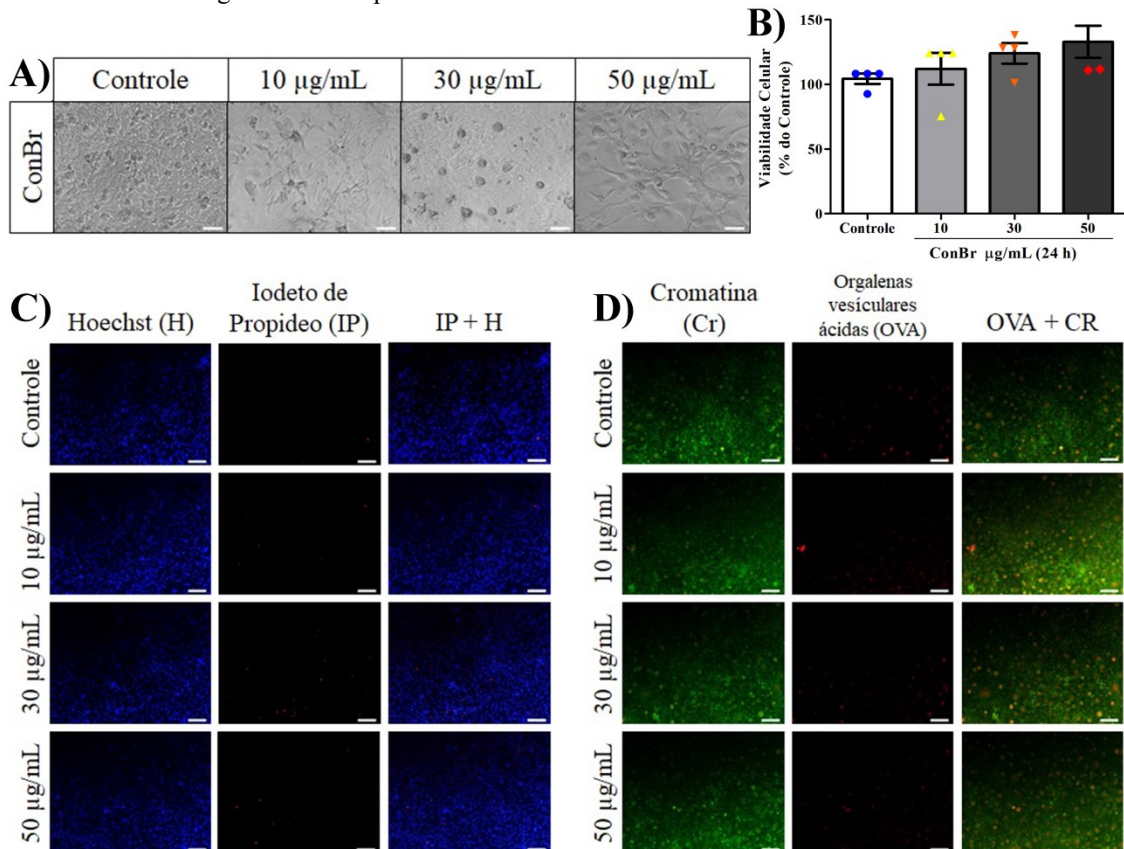
Finalmente, para avaliar um possível efeito citotóxico da ConBr sobre células saudáveis da glia, foram realizadas culturas primárias de astrócitos corticais de ratos e submetidos a tratamento por 24 h com veículo ou 10, 30 e 50 µg/mL de ConBr.

A figura 28 mostra a resposta dos astrócitos mantidos em cultura primária frente ao tratamento por 24 h com a lectina ConBr.

Como pode ser observado na figura 28A não houve alterações na morfologia das células. Assim como apresentado na figura 28B o tratamento não afetou a viabilidade celular.

Em concordância com os resultados mencionados acima, também não foi detectado aumento na marcação de IP (Fig. 28C), assim como não foram detectadas formações de OVA (Fig 28D). Estes dados sugerem que a lectina ConBr possui um efeito citotóxico seletivo sobre as células de glioma, poupando, aparentemente, os astrócitos normais de danos significativos.

Figura 28. O tratamento com ConBr não alterou a viabilidade de astrócitos em cultura primária. Células de cultura primária de astrócitos saudáveis foram expostas a ConBr nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou veículo (Tampão HEPES-salina, controle) por 24 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da ConBr na morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. B) Viabilidade celular frente ao tratamento com ConBr medido pelo método da redução do MTT. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). Após o período de tratamento as células foram coradas com C) Iodeto de Propídeo e Hoechst ou D) Laranja de Acridina para posteriormente serem visualizadas através de microscopia de fluorescência com auxílio do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. Barra de escala representa 100 μm . Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados em porcentagem do valor absoluto de cada tratamento. ANOVA de uma via seguido do teste post hoc de Bonferroni.

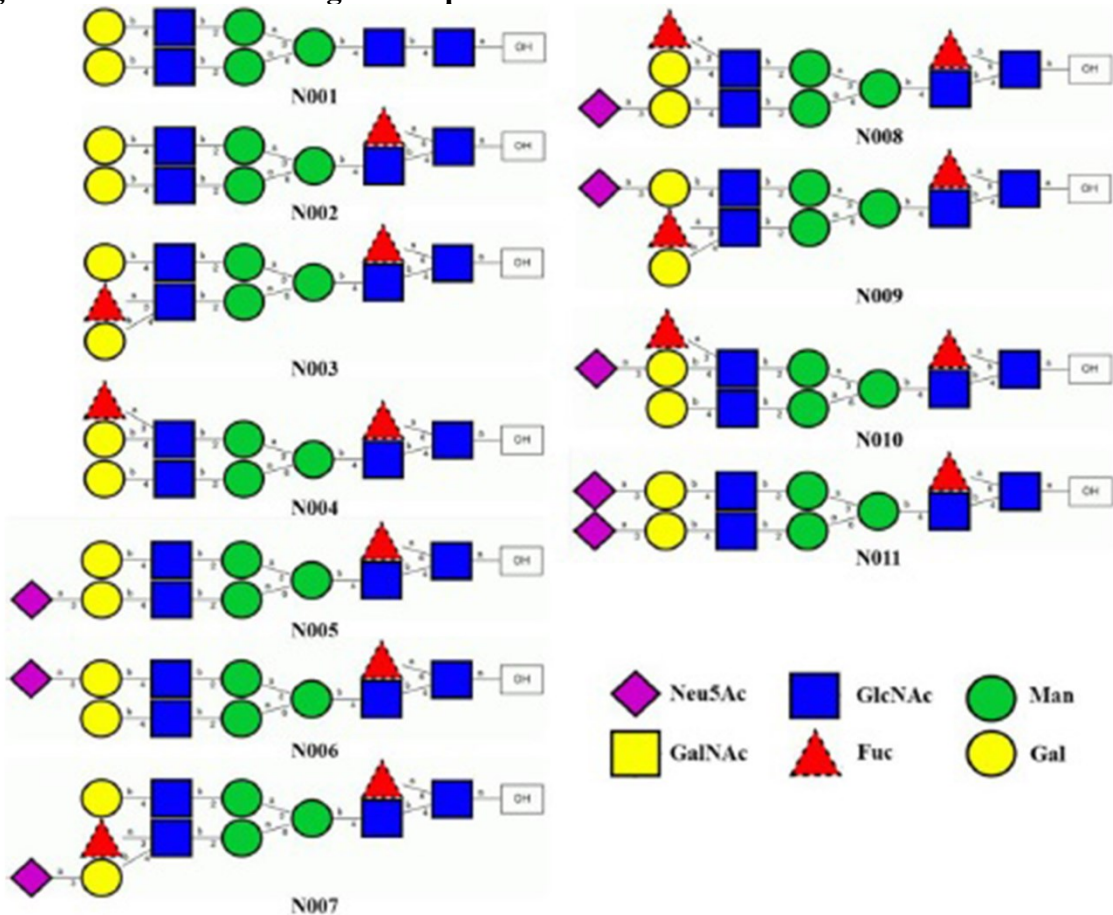


7.5 ConBr pode interagir com MMP-1

Com o intuito de analisar se o efeito citostático da ConBr estaria relacionado com a capacidade da lectina de interagir com as MMPs, fomos buscar na literatura estruturas de N-glicanos presentes nestas enzimas para fazer uma análise de *Docking* e dinâmica molecular.

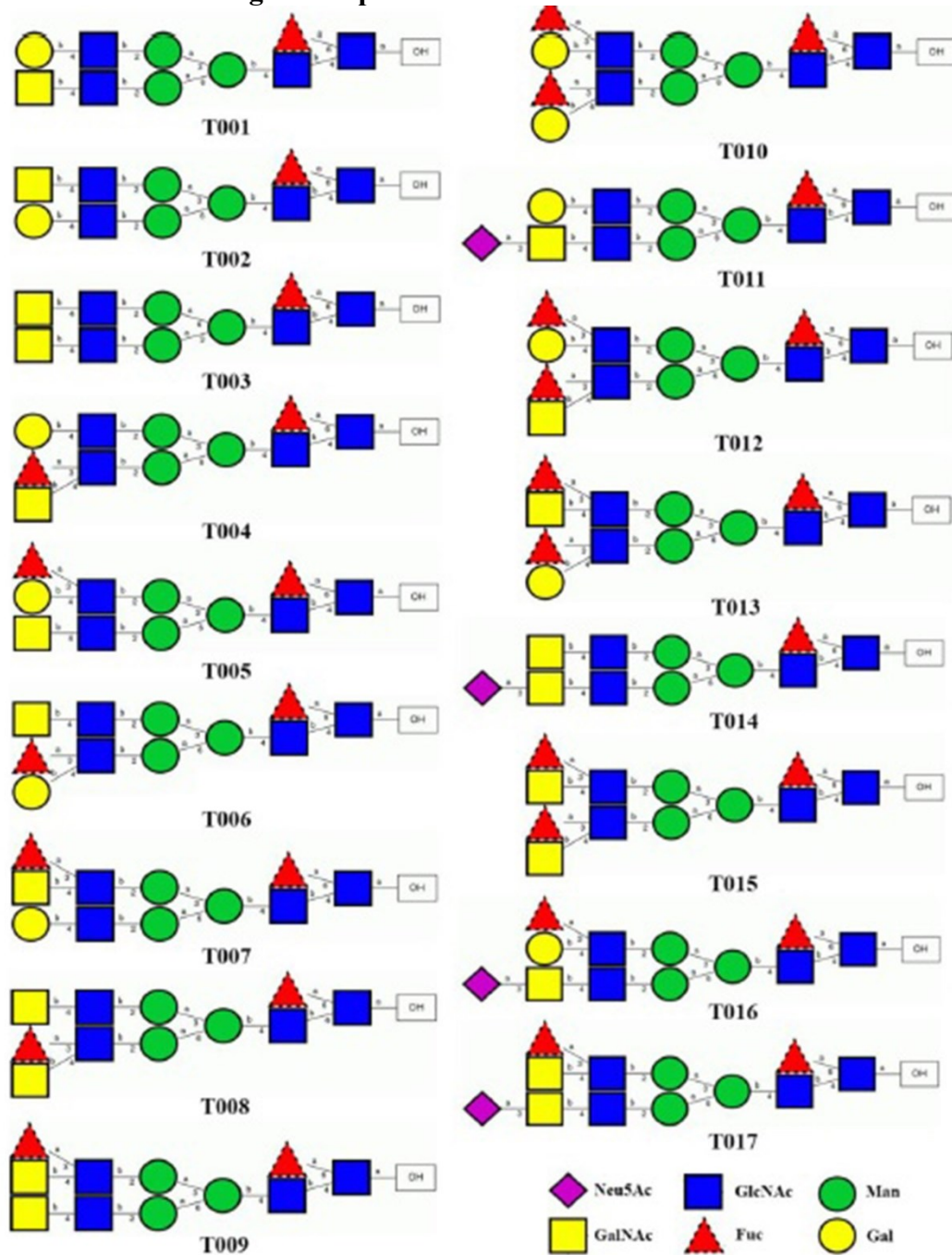
O trabalho de Saarinen e colaboradores (SAARINEN *et al.*, 1999) apresenta as estruturas de *N-glicanos* da MMP-1. Eles indicam que existe um padrão de glicosilação específico para células normais (Fig. 29), outro padrão de glicosilação se encontraria somente em células tumorais (Fig. 30), podendo ainda existir alterações simplesmente na frequência de apresentação de glicanos quando comparadas com células normais sendo essas alterações características em células tumorais.

Figura 29. Estrutura de N-glicanos presentes em MMP-1 de células normais.



Fonte: (SAARINEN *et al.*, 1999).

Figura 30. Estrutura de *N*-glicanos presentes em MMP-1 de células tumorais.



Fonte: (SAARINEN *et al.*, 1999).

Pode-se observar na Tabela 6 as pontuações de ligação da lectina ConBr com os glicanos presentes na MMP-1. Reparando-se que ConBr foi capaz de interagir apenas com 1 glicano exclusivo das células normais (apresentado em verde), 3 glicanos que se apresentam com frequência alterada nas células cancerígenas (apresentado em azul) comparado com as células normais e com todos os glicanos exclusivos das células tumorais (apresentado em vermelho). Em todos os casos, a lectina interage com um resíduo de manose presente em uma região interna dos glicanos, em um dos resíduos da primeira ramificação. Não ocorrem

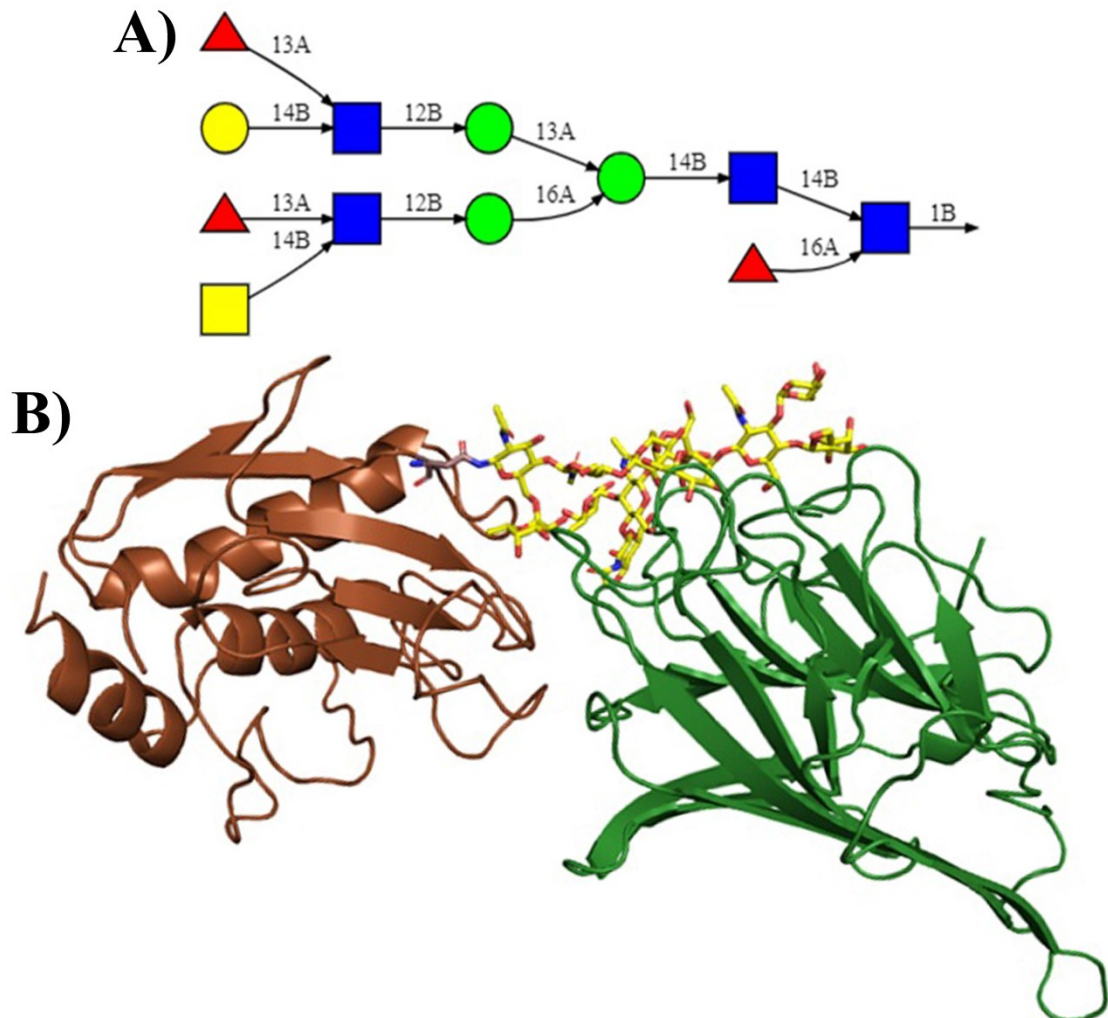
interações com as extremidades dos glicanos.

Tabela 6. Pontuações das energias de ligação/interação obtidas no Docking molecular entre as lectinas ConA, ConBr e os glicanos (ligante) encontrados em MMP-1.

Ligante	ConA	ConBr
1663.7	-46.78	-48.25
1809.7	-46.88	-48.07
1851.1-1	-60.78	-63.85
1851.1-2	-45.50	-67.14
1892.2	-42.42	-67.41
1955.6-1	-46.90	-58.88
1955.6-2	-52.26	-67.52
1996.9-1	-42.35	-43.24
1996.9-2	-61.83	-42.38
1996.9-3	-51.24	-48.02
1996.9-4	-	-
2037.8-1	-44.58	-60.78
2037.8-2	-50.42	-64.09
2100.7-1	-	-
2100.7-2	-	-
2101.8	-53.93	-61.07
2141.8	-44.40	-55.41
2142.9-1	-53.51	-50.54
2142.9-2	-49.52	-49.99
2182.9	-52.21	-59.65
2183.9	-48.11	-62.11
2246.9-1	-	-
2246.9-2	-	-
2246.9-3	-	-
2246.9-4	-	-
2287.8	-48.13	-61.94
2328.8	-46.61	-53.26
2391.8	-	-

Em função de toda esta informação, foi escolhido o glicano T012 da MMP-1 (Fig. 30), presente exclusivamente em células tumorais, para fazer uma análise de *Docking* com o CRD da ConBr. A figura 31 mostra a interação da ConBr (verde) com o glicano T012 (amarelo) que emerge da superfície de MMP-1 (marrom).

Figura 31. A lectina ConBr interage com MMP-1 via glicanos de superfície. Considerando que a MMP-1 é uma metaloproteínase de matriz glicosilada foi realizado um ensaio de *docking* a fim de avaliar a interação com a ConBr. A) Glicano (T012) de MMP-1 presente em células tumorais. B) Interação entre ConBr (verde) e MMP-1 (marrom), via glicano T012 (amarelo) da MMP-1.

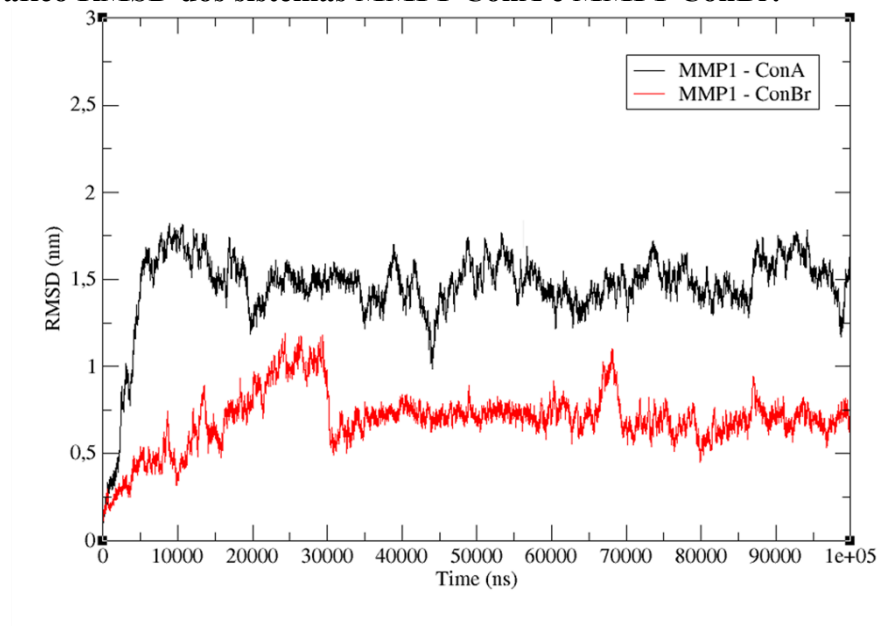


As simulações de dinâmica molecular também foram realizadas com o glicano T012 (Fig. 31A). A lectina ConA (*Canavalia ensiformes*) foi utilizada como controle positivo do experimento por existir trabalhos na literatura mostrando interações com as MMP realizando-se comparações do comportamento entre, e a lectina ConA e ConBr. Utilizou-se as coordenadas do *Docking* entre o glicanos e a ConBr como coordenadas iniciais. Foram realizadas simulações de 10000 ns dos seguintes sistemas:

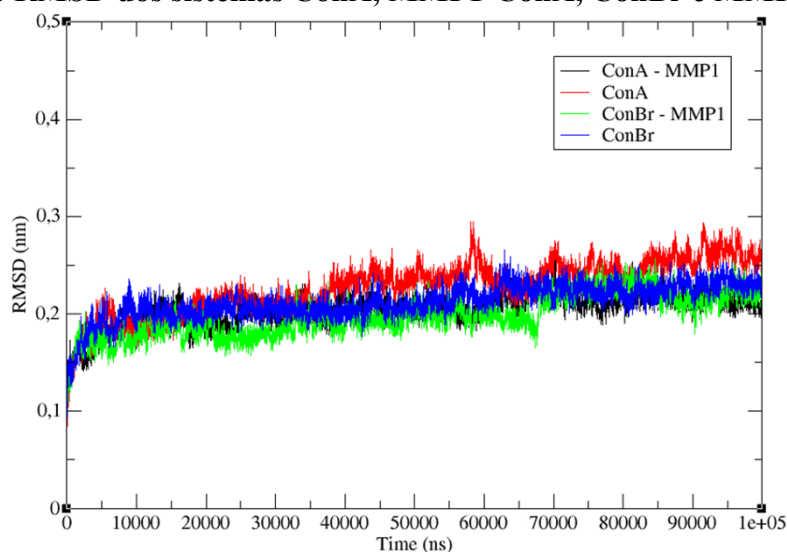
- ConBr
- ConA
- MMP-1
- ConBr ligada ao MMP-1 (ConBr-MMP1)
- ConA ligada ao MMP-1 (ConA-MMP1)

Na figura 32 há uma comparação direta do comportamento dos sistemas ConA-MMP1 com ConBr-MMP1. Neste gráfico estão sendo considerados os átomos das lectinas, do glicano que intermedia a interação entre as lectinas e de MMP-1. O sistema ConB-MMP1 entra em equilíbrio a partir de 10000 ns e ConA-MMP1 a partir de 30000 ns, com poucas variações bruscas a partir desses valores. Podemos notar que de modo geral o sistema de ConA-MMP1 teve um desvio maior que o sistema ConBr-MMP1, o que demonstra um comportamento diferenciado dependendo da lectina que se ligue ao MMP-1.

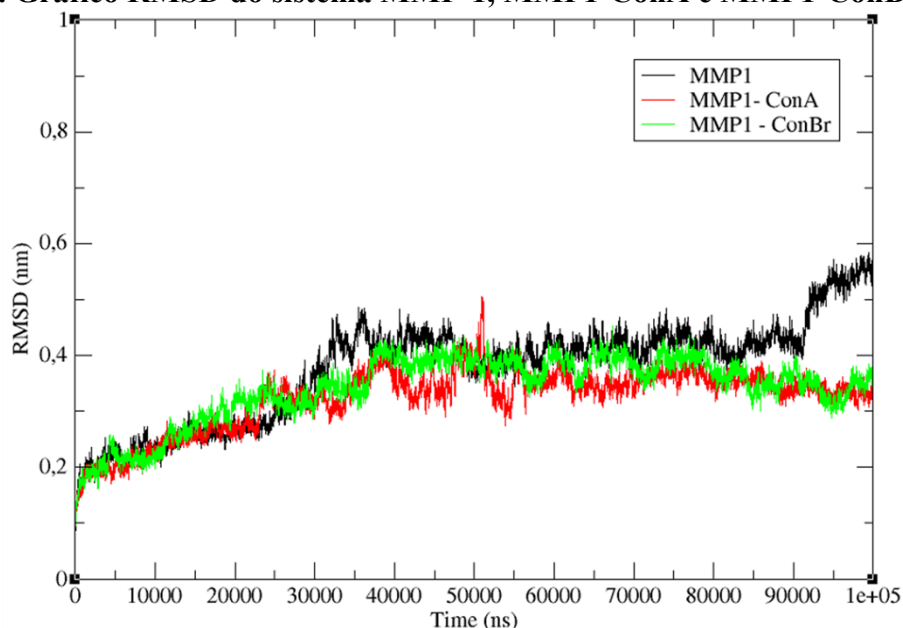
Figura 32. Gráfico RMSD dos sistemas MMP1-ConA e MMP1-ConBr.



Na figura 33 foi comparado o comportamento apenas dos átomos das lectinas em todas as simulações realizadas. Podemos notar que em todos os sistemas, as lectinas entraram em equilíbrio a partir de 5000 ns, sem variações bruscas a partir disso. O comportamento molecular de ConA e ConBr não se alterou muito ao comparar as simulações das lectinas livres com as ligadas ao MMP-1.

Figura 33. Gráfico RMSD dos sistemas ConA, MMP1-ConA, ConBr e MMP1-ConBr.

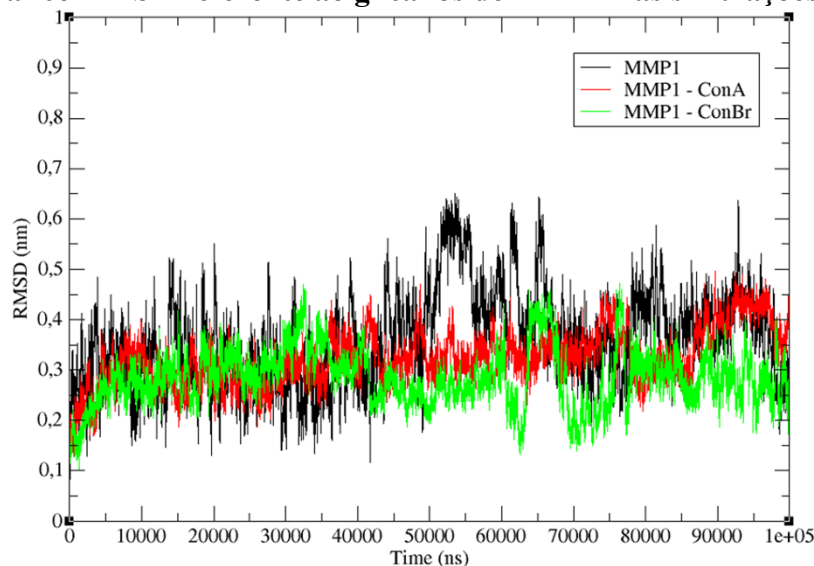
Na figura 34 foi comparando o comportamento apenas dos átomos de MMP-1 em todas as simulações realizadas. O comportamento de MMP-1 foi semelhante em todos os sistemas até cerca de 8000 ns. Entretanto, MMP-1 livre a partir de 90000 ns apresenta um aumento brusco do desvio, demonstrando uma maior liberdade da dinâmica dos resíduos de MMP-1 livre, comparado com ela interagindo com as lectinas. O comportamento molecular de MMP-1 interagindo com as lectinas foi bem semelhante.

Figura 34. Gráfico RMSD do sistema MMP-1, MMP1-ConA e MMP1-ConBr.

A figura 34 mostra a comparação do comportamento apenas dos átomos de glicano de MMP-1 em todas as simulações realizadas. Aqui é possível notar que de modo geral, o

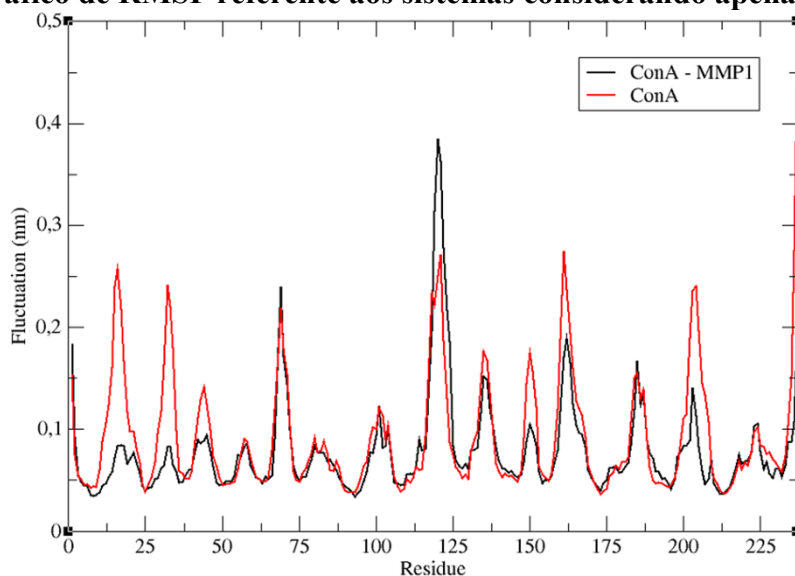
glicano T012 em MMP-1 livre tem maiores desvios de posicionamento do que quando interage com as lectinas.

Figura 35. Gráfico RMSD referente ao glicanos de MMP1 nas simulações.



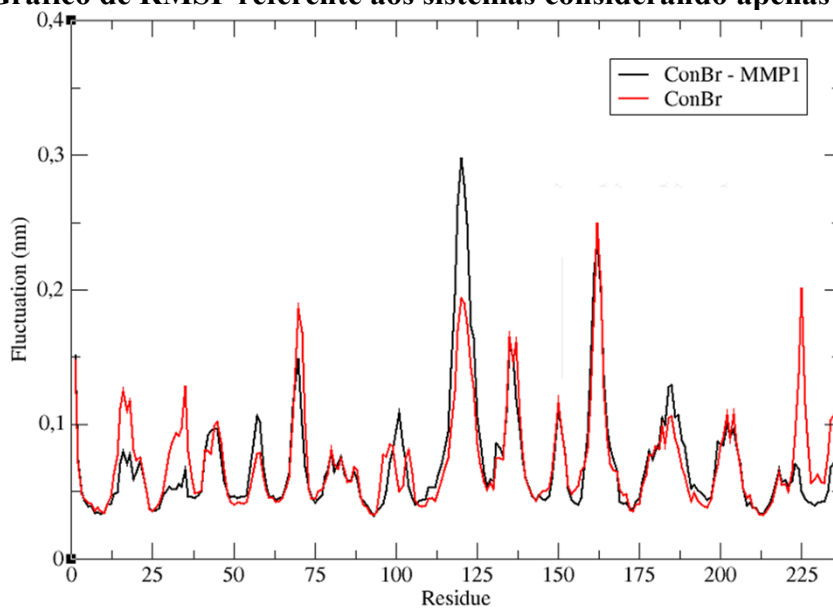
Na figura 36 podemos observar o gráfico de flutuação dos resíduos de ConA em duas simulações, ConA-MMP1 e ConA livre. Nas regiões 1-25, 25-50, 150-175 e 200-210 podemos notar resíduos mais instáveis em ConA livre, quando comparamos com as flutuações desses resíduos no sistema que ConA interage com MMP-1. Na região 110-125 observamos uma instabilidade maior quando ConA interage com MMP-1. Naturalmente, com exceção das regiões 1-25 e 200-210, as demais regiões afetadas pela interação com MMP-1 não possuem resíduos que compõem diretamente o domínio de reconhecimento a carboidrato da lectina.

Figura 36. Gráfico de RMSF referente aos sistemas considerando apenas ConA.



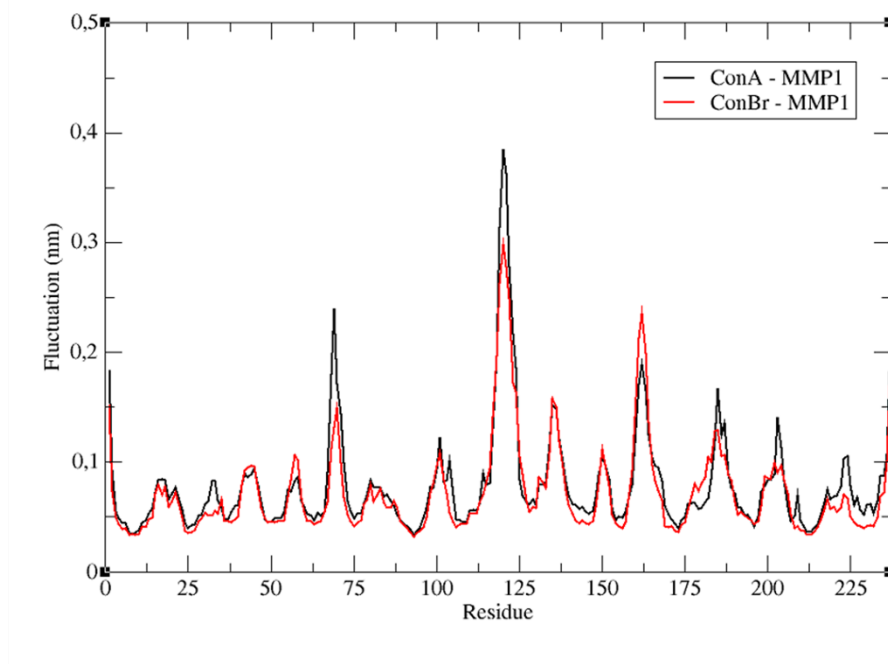
Na figura 37 podemos observar o gráfico de flutuação dos resíduos de ConBr em duas simulações, ConBr-MMP1 e ConBr livre. As regiões 1-25 e 25-50 são levemente estabilizadas com a interação com MMP-1, enquanto a região 110-125 é desestabilizada com a interação. A região próxima do resíduo 225 foi bem estabilizada com a interação. Lembrando que as regiões 1-25 e a próxima ao 225 de ConBr possuem os resíduos de aminoácidos que compõem diretamente o CRD.

Figura 37. Gráfico de RMSF referente aos sistemas considerando apenas ConBr.

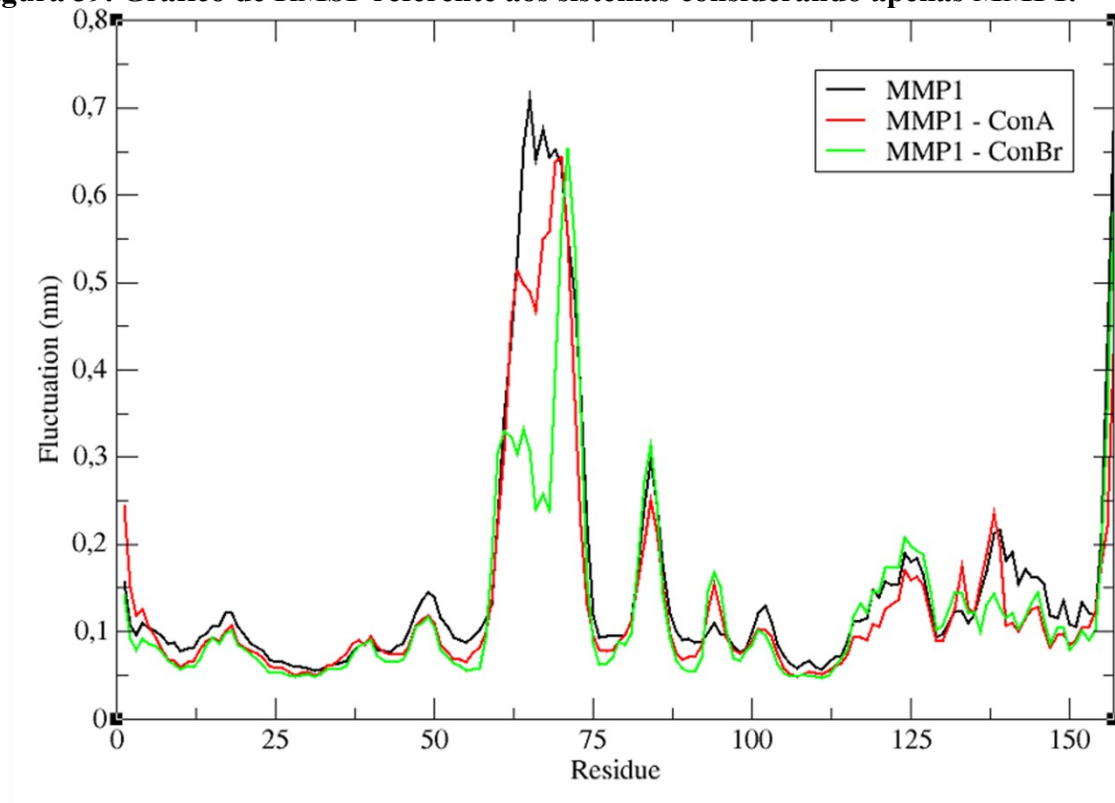


Na figura 38 podemos observar o gráfico comparando a flutuação dos resíduos de ConBr e ConA quando interagem com MMP-1. Apesar de notarmos diferenças sutis quando comparamos as lectinas livres e interagindo com MMP-1 (Fig. 35 e 36), ao comparar ambas em estado de interação não é possível encontrar diferenças de flutuação consideráveis. Podemos deduzir que as lectinas apesar de obterem conformações um pouco diferentes quando estão na forma livre, adotam uma conformação semelhante ao interagir com MMP-1.

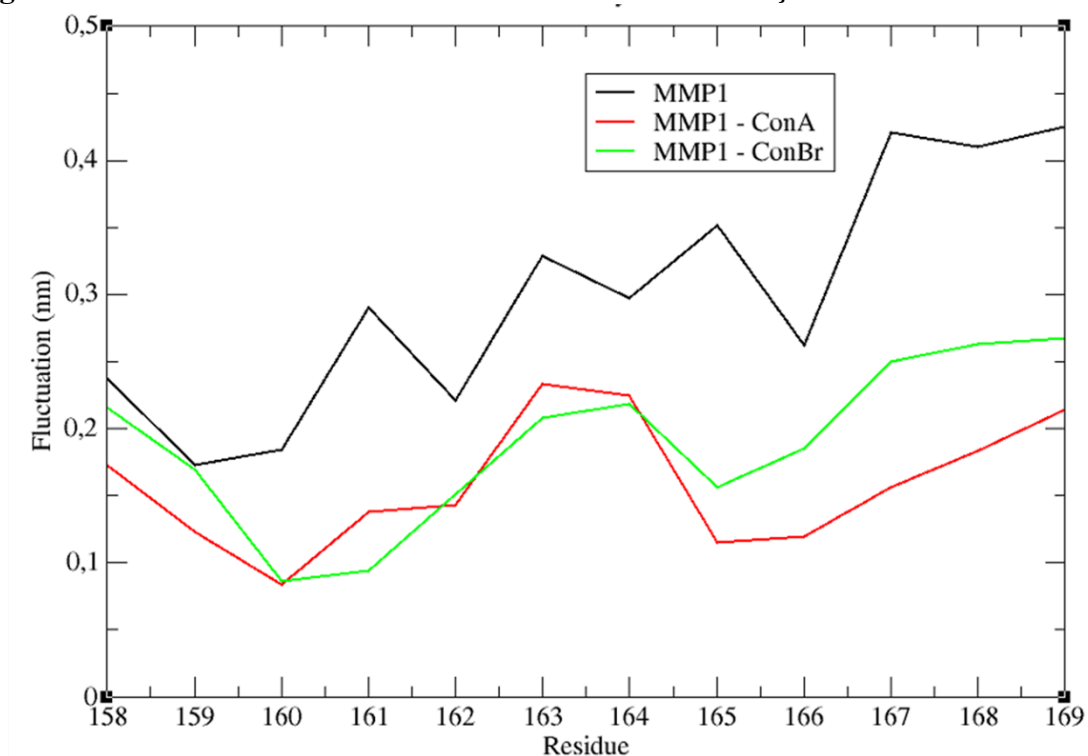
Figura 38. Gráfico de RMSF referente aos sistemas envolvendo ConA e ConBr interagindo com MMP-1.



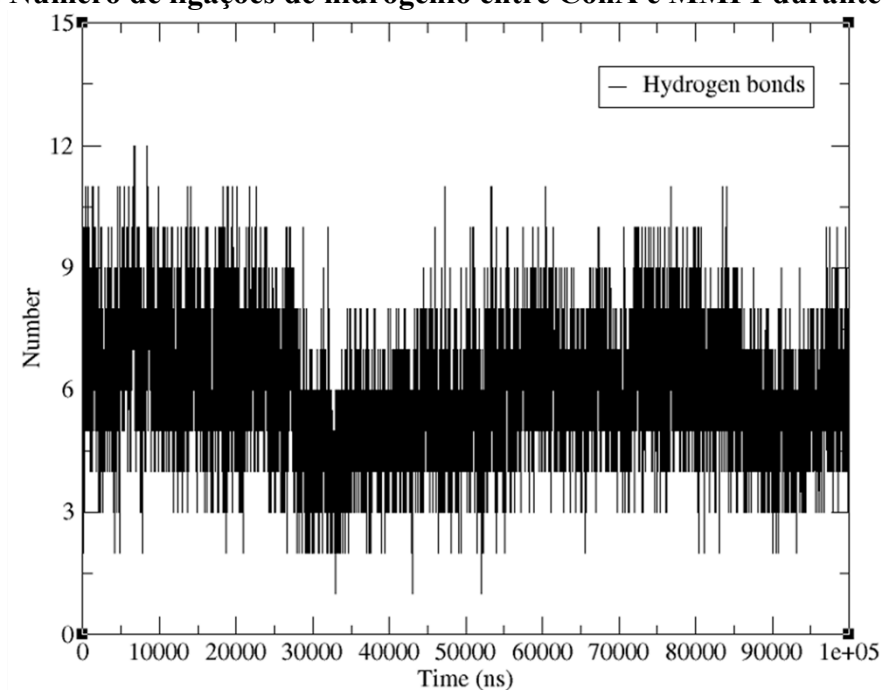
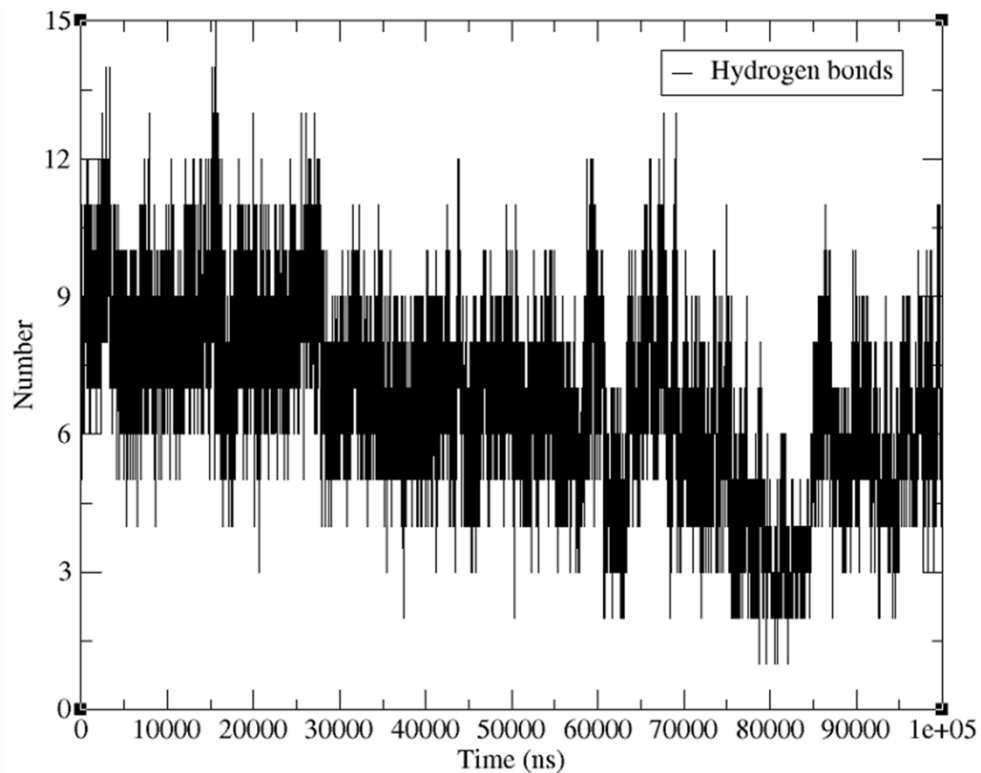
Na figura 39 podemos observar o gráfico de flutuação dos resíduos de MMP-1 em todas as simulações. Na região 50-75 a diferença em relação a estabilização desses resíduos quando as lectinas interagem com o glicano de MMP-1 que está ancorado nesta região. ConBr estabiliza mais essa região do que ConA.

Figura 39. Gráfico de RMSF referente aos sistemas considerando apenas MMP1.

Na figura 40 podemos observar o gráfico de flutuação do glicanos de MMP-1 em todas as simulações. ConA e ConBr estabilizam o glicanos de forma semelhante.

Figura 40. RMSF do Glicano de MMP1 em todas as simulações.

Ao observar os gráficos de ligações de hidrogênio entre ConA (Fig. 41)/ConBr (Fig. 42) e MMP-1, podemos notar que as lectinas permaneceram ligadas ao MMP-1 durante toda a simulação. Apesar de ter uma variação brusca em 80000 ns, ConBr manteve um número mais alto de ligações de hidrogênio por mais tempo que ConA, conseguindo chegar a um máximo de 15 ligações simultâneas enquanto ConA o máximo foi 12 em poucos frames.

Figura 41. Número de ligações de hidrogênio entre ConA e MMP1 durante a simulação.**Figura 42. Número de ligações de hidrogênio entre ConBr e MMP1 durante a simulação.**

De um modo geral podemos concluir que a lectina ConBr interagiu mais favoravelmente com os glicanos da MMP-1 que a lectina ConA. Dessa forma, pode ser

sugerido que a interação lectina/MMP-1 poderia estar relacionado com o efeito citostático observado nas células de glioma tratadas com ConBr. Entretanto, essa possibilidade necessita futura investigação.

8 Discussão e conclusão dos resultados obtido no Capítulo I: “Mecanismo de ação biológica da lectina ConBr sobre linhagens de gliomas”

Apesar dos avanços na oncogenômica e na terapia direcionada para uma variedade de cânceres, o tratamento contra GBM continua sendo um grande desafio na clínica. Mesmo os estudos pré-clínicos de compostos promissores, como os inibidores dos receptores EGFR e da via PI3K/Akt, fracassaram em aumentar a sobrevida média dos pacientes (FAN *et al.*, 2007; HWANG; PARK; KWON, 2019). Sendo necessarias pesquisas de novos compostos que exibam seletividade tumoral e eficácia na eliminação destas células. Para atingir esse objetivo é essencial, num primeiro passo, realizar uma busca de novos alvos terapêuticos, melhorar a compreensão dos mecanismos de sinalização celular subjacentes à inibição da migração e proliferação celular, bem como ter meios seletivos e eficientes para indução de morte das células tumorais de glioma. Nas últimas décadas, lectinas têm sido utilizadas como ferramentas de diferenciação entre tumores malignos e benignos, pela sua capacidade de reconhecer padrões de glicosilação específicos, alguns dos quais estão associados a processos metastáticos (JIANG, Q.-L. *et al.*, 2015; MAO *et al.*, 2012; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020; YAU *et al.*, 2015). Além disso, foi amplamente reportado que lectinas de plantas teriam a capacidade de exercer efeitos antitumorais em diferentes modelos cancerígenos (BHUTIA *et al.*, 2019; JIANG, Q.-L. *et al.*, 2015; MAO *et al.*, 2012; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020). Nos últimos anos, nosso grupo de trabalho vêm demonstrando efeitos citotóxicos de diferentes lectinas isoladas de sementes de leguminosas da subtribo *Diocleinae*, entre elas as purificadas das leguminosas *Canavalia virosa* (ConV), *Canavalia bonariensis* (CaBo), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Dioclea lasiophylla* (DlyL), *Dioclea lasiocarpa* (DLL) e *Dioclea violacea* (DvL) nas linhagens celulares C6 e U-87 MG de glioma (CAVADA, BENILDO SOUSA *et al.*, 2018; NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2018, 2019; OSTERNE *et al.*, 2017). Neste capítulo I ampliamos estes estudos prévios mostrando a citotóxicidade da lectina ConBr em três linhagens de glioma. Utilizando as células da linhagem C6, descobrimos que aparentemente o mecanismo citotóxico do tratamento com ConBr é mediante a potencialização das vias de sinalização implicadas na ativação do processo de autofagia provocando a morte celular. Os três tipos celulares de glioma avaliados (C6, U-87 MG e GBM1) responderam frente ao tratamento com ConBr, alterando as suas morfologias celulares de plana para esférica, com forma arredondada, sendo este um efeito acompanhado por uma diminuição na viabilidade celular das células C6 e GBM1, mas não na linhagem U-87 MG. Assim, as células C6 mostraram-se bastante sensíveis ao tratamento, uma

vez que a lectina diminuiu a viabilidade das células em 60% a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 12 h de tratamento. Em relação a este conjunto de resultados, é importante afirmar que nossos estudos anteriores demonstraram que a ConA promoveu a diminuição da viabilidade celular na linhagem C6 somente depois de 24 h de tratamento (NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2018). Além disso, ConA apresentou-se citotóxica contra as células U-87 MG somente após período de tratamento prolongado como 48 e 96 h (NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2019).

As lectinas ConBr e ConA exibem alta similaridade tanto na sequência de aminoácidos como na estrutura cristalográfica. No entanto, tem sido documentadas diferenças nas atividades biológicas delas em diversos modelos de estudo (CAVADA, BENILDO *et al.*, 2018; CAVADA, BENILDO SOUSA; OSTERNE; PINTO-JUNIOR; *et al.*, 2019). Outras lectinas do gênero *Canavalia* como por exemplo CaBo e ConV, apresentaram efeitos semelhantes após 24 h de tratamento, mas em concentrações elevadas de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CAVADA, BENILDO SOUSA *et al.*, 2018; OSTERNE *et al.*, 2017). Esses dados demonstram que aparentemente ConBr é mais citotóxica para as células C6 do que a lectinas ConA, ConV ou Cabo, apesar de apresentarem homologia estrutural e similaridade na afinidade por glicose/manose. Essas observações reforçam a importância das relações entre pequenas variações estruturais da proteína e a atividade biológica de lectinas (BORTUL *et al.*, 2003).

A diminuição da viabilidade celular medida pelo método de MTT pode ser o produto da morte celular ou da diminuição da proliferação celular. A coloração dupla com Hoeschst/IP indicou o rompimento da membrana celular das C6 devido ao aumento da incorporação de IP (Fig. 14F) mas não nas células de GBM1 (Fig. 26E) onde a incorporação de IP nas células tratadas com a lectina ConBr foi similar ao veículo (controle). Notavelmente, as concentrações mais baixas de ConBr não foram citotóxicas, porém foi observada uma diminuição na capacidade de migração/proliferação pelo método de “*scratch*” nas células de GBM1 (Fig 27B); sendo que estes resultados já tinham sido observados na linhagem celular C6 e apresentados na minha dissertação de mestrado (WOLIN, INGRID ALESSANDRA VICTORIA, 2017). Além disso, nesse capítulo mediante o ensaio de migração no “*transwell*”, confirmamos que os resultados obtidos no ensaio de migração por “*scratch*” nas células C6, estavam relacionados à capacidade da lectina de reduzir a migração celular e não simplesmente um efeito sobre a proliferação celular (Fig 15B). Adicionalmente, no modelo de tumoresferas, ou modelo 3D, que se assemelha à arquitetura e biologia de um tumor sólido (HOARAU-VÉCHOT *et al.*, 2018; KRAMER *et al.*, 2013; SANT; JOHNSTON,

2017; VINCI *et al.*, 2012), verifica-se que o tratamento com ConBr tem a capacidade de retardar a adesão das células ao substrato; levando a um menor deslocamento das células, além de promover alterações na morfologia das células que conseguem se diferenciar e migrar (Fig 16B).

As metaloproteases de matriz (MMPs, do inglês *Matrix metalloproteinases*) representam uma família de 23 enzimas, sendo endoproteases dependentes de zinco, que atuam sobre a matriz extracelular e sobre proteínas de superfície celular, promovendo a remodelação da matriz, regulação da atividade enzimática, liberação de fatores de crescimento mitogênicos e outras moléculas bioactivas. Por isso, as MMPs representam proteínas reguladoras chave no controle da proliferação, migração e diferenciação celular (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; CUI; HU; KHALIL, 2017; LEVIN *et al.*, 2017). Têm sido demonstrado a implicação de diversos membros da família das MMPs na progressão e invasão tumoral. Como por exemplo, as MMP-1, MMP-2, MMP-9 e a MMP de membrana tipo 1 (MT1-MMP ou também conhecida como MMP-14), as quais têm sido relatado o envolvimento nas propriedades de migração e invasão das células cancerígenas, bem como no maior grau de malignidade de gliomas e pior resultados na clínica (HAGEMANN, 2012; STOJIC *et al.*, 2008). Foi demonstrado que a MMP-1, enzima regulada pela sinalização EGF/ERK1/2, é amplamente glicosilada (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; SAARINEN *et al.*, 1999) e possui um papel importante na migração, invasão e malignidade dos tumores (STOJIC *et al.*, 2008; TUNG *et al.*, 2016). Por conseguinte, pode-se postular que a capacidade da ConBr em inibir a migração das células de glioma poderia ser um reflexo da ligação da lectina aos glicanos expressos nas MMP-1 (Fig 31B). Estudos prévios demonstraram que a ConA possui a capacidade de modular a MT1-MMP (AKLA; PRATT; ANNABI, 2012). Assim, o tratamento das células U-87 MG com ConA promoveu o incremento da expressão de COX-2, desfosforilação de Akt e modulação da via de sinalização IKK-NFκB (LI, WEN WEN *et al.*, 2011), além de promover a ativação da via JAK/STAT e a transcrição dos genes de autofagia sendo estes processos aparentemente dependentes da modulação de MT1-MMP (PRATT; ANNABI, 2014). Entretanto, até o momento não tinha sido reportado a interação ou modulação da MMP-1 por ConA. Assim, o ensaio de *molecular docking* realizado no nosso estudo demonstra pela primeira vez que as lectinas ConA e ConBr interagem favoravelmente com os glicanos de MMP-1, como se observa na Tabela 6, porém a ConBr obteve melhores resultados. Embora no presente trabalho seja sugerido a ligação preferencial da ConBr com glicanos da MMP-1, expresso nas células tumorais, será importante a realização de futuros estudos para demonstrar a participação de MMP-1 no mecanismo de morte celular, ou

inibição da migração celular, em resposta ao tratamento com ConBr. Particularmente, as maiorias das atividades biológicas suscitadas pelas lectinas estão relacionadas com a sua capacidade de ligar a glicanos para desencadear um efeito biológico (MARQUES *et al.*, 2017). Por tanto, a expressão pronunciada de MMP-1 nas células de glioma de alto grau (STOJIC *et al.*, 2008; ZHANG, YAN *et al.*, 2011) juntamente com a ligação preferencial da ConBr aos glicanos expressos sobre MMP-1 das células tumorais, poderia explicar a atividade seletiva da ConBr contra células de glioma e não sobre astrócitos ou neurônios saudáveis como se mostra na figura 28.

O tratamento com ConBr por 12 h causou nas células C6 um remarcado incremento na fosforilação de p38^{MAPK} e JNKs, conjuntamente com uma inibição da fosforilação de ERKs e Akt (Fig. 17). Estas vias de sinalização são documentadas como associadas a processos de migração celular, morte e sobrevivência celular (ERSAHIN; TUNCBAG; CETIN-ATALAY, 2015; LI, ZHIYUAN; ZHANG, 2017; SHEN, SHUYING *et al.*, 2014; ZARUBIN; HAN, 2005). Na verdade estas proteínas cinases podem estar envolvidas na modulação e ativação de vias apoptótica e autofágicas (LI, ZHIYUAN; ZHANG, 2017; LIU, Z. *et al.*, 2013; SONG, FANGLONG *et al.*, 2016). Por exemplo, foi reportado que o incremento da fosforilação de JNK ativa Beclin-1 e inibe Bcl2 (WEI, YONGJIE *et al.*, 2008). Dessa forma, serão necessários estudos futuros abordando a participação de JNKs e p38^{MAPK} no mecanismo de morte celular induzido pela lectina. Em conjunto, nossos dados mostram que a lectina ConBr desencadeia uma série de efeitos antitumorais e modula positivamente as proteínas cinases associadas ao estresse e à morte celular e modula negativamente as proteínas cinases associadas à sobrevivência e proliferação celular.

Como mostrado na figura 18, após 6 h de tratamento somente a concentração de 50 µg/mL de ConBr causou um pequeno incremento na marcação de Anexina-V-FITC nas células C6, diferente da incorporação de IP que já foi detectada a partir de 30 µg/mL de ConBr, sendo estes achados acompanhados pela ativação de caspase-3 (Fig. 19D). Na literatura encontra-se bem documentado que a marcação por IP está associada à morte celular por necrose. Contudo, esta coloração também poderia estar relacionada com um processo final de apoptose. Assim, células apoptóticas que não são fagocitadas, fato comum em culturas celulares devido à falta de células fagocíticas que cumprem esta função no microambiente *in vivo*, podem acabar sofrendo degradação semelhante à necrose, esse processo recebe o nome de necrose secundária (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). No nosso protocolo não foi observado alterações significativas no potencial da membrana mitocondrial (Fig. 20B), nem na expressão de Bak, proteínas pró-apoptótica efetora (Fig. 19B). Inclusive a

produção de ERO foi diminuída pelo tratamento com ConBr (Fig. 22), efeito diferente do previamente observado nas células C6 tratadas com ConA (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012; LI, WEN WEN *et al.*, 2011; NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2018, 2019).

A família de proteínas Bcl-2 (do inglês *B cell lymphoma 2*) estão envolvidas na modulação da sobrevivência celular e processo de apoptose, e inclui todas as proteínas que contenham pelo menos um dos quatro domínios de homologia a Bcl-2 (BH1-4). Dentro da família Bcl-2 se encontram as proteínas Bcl-2, Bcl-XL e MCL-1, também chamadas de pró-sobrevivência, com quatro domínios BH. As proteínas pró-apoptóticas podem ser divididas em dois grupos. O primeiro engloba Bak e Bax, capazes de promover a permeabilização mitocondrial e contém os domínios BH1-3; o segundo é representado pelas proteínas que contém apenas um domínio BH3 (*BH3-only proteins*) e envolve as proteínas Bim, Puma, Bid, Bad, NOXA, Bik, HRK e BMF. As proteínas pró-apoptóticas *BH3-only* como Bad e Puma podem atuar como sensores de estresse celular. De fato, elas podem se ligar e inativar proteínas específicas pró-sobrevivência, tais como Bcl-2 e Bcl-XL, ou ligar-se diretamente a Bax e Bak para desencadear apoptose. Além disso, é importante lembrar que Bcl-2 e Bcl-XL podem inibir o processo de autofagia, sequestrando a proteína autofágica Beclin-1 que também possui um domínio BH3. Assim, em muitos casos a ativação ou aumento da expressão de proteínas BH3, como por exemplo Puma e Bad, pode induzir autofagia por perturbações competitivas sobre Bcl-2 possibilitando a liberação Beclin-1 (BHAT *et al.*, 2018; CORY; ADAMS, 2002; RIKKA *et al.*, 2011; WESTPHAL *et al.*, 2011). Além disso, a proteína BNIP3 (siglas do inglês *Bcl-2/adenovirus E1B 19-KDa-interacting protein*) uma proteína pró-apoptótica atípica com um só domínio BH3, pode perturbar a função mitocondrial. A dimerização do BNIP3 na membrana mitocondrial externa em resposta ao estresse celular tem sido associada à morte celular e os heterodímeros BNIP3/Bax podem promover a modificação conformacional de Bak resultando na ativação da via intrínseca de apoptose (HENDGEN-COTTA *et al.*, 2017; RIKKA *et al.*, 2011). Adicionalmente, BNIP3 citosólico ou na membrana mitocondrial externa (HENDGEN-COTTA *et al.*, 2017) pode induzir a ativação do processo de autofagia mitocondrial por interação com a proteína LC3 (RIKKA *et al.*, 2011). No nosso estudo foi bem evidenciado que a ConBr pode induzir a clivagem da LC3 nas concentrações de 30 e 50 µg/mL (Fig. 24E), aumentar a formação de OVA (Fig. 21 e 23), inibir a fosforilação de mTORC1 (Fig 24B) e aumentar a expressão e dimerização da BNIP3 (Fig. 19C), todos estes eventos estão associados à ativação do processo autofágico. Quando utilizamos o 3-MA (2 mM), um inibidor da iniciação da autofagia, foi verificado que a citotoxicidade da ConBr nas células C6 foi bloqueada,

conforme avaliado pelo método de MTT (Fig. 24G). Esta descoberta sugere que ConBr pode desencadear autofagia nas células de glioma como um mecanismo de morte celular (KANZAWA *et al.*, 2004; YANG, ZHINENG J. *et al.*, 2011). Pesquisas utilizando um modelo de células hepáticas mostraram que a lectina ConA, após a ligação a resíduos glicose/manose presentes nas glicoproteínas expressas na membrana extracelular, ela foi internalizada por endocitose mediada por clatrina e por fim associada à glicanos presentes na superfície mitocondrial. Este evento foi acompanhado por uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial que inicia o processo de autofagia mediado pelas proteínas BNIP3, Beclin-1 e LC3II (LI, WEN WEN *et al.*, 2011; PRATT; ROY; ANNABI, 2012). Mediante a microscopia eletrônica de transmissão foi observada a presença de vesículas de membrana dupla (Fig. 23), menores que os autofagossomos, contendo material no seu interior que não foi observado nas células tratadas com o veículo. Apesar de não terem sido caracterizadas, estas vesículas poderiam ser produto de endocitose da ConBr. No entanto, esta possibilidade merece ser investigada em estudo futuro.

Um ponto interessante no nosso estudo foi mostrar que o pré-tratamento com o IETF-fmk (inibidor de Flice) aboliu a citotoxicidade da ConBr (Fig. 19E). Este resultado sugere a possibilidade da ConBr modular receptores de morte celular. Notavelmente, os receptores TRAIL-R1 (DR4) e -R2 (DR5) são glicoproteínas que modulam a sinalização celular para ativar caspase-8/caspase-3 e promover a morte celular (GRIFFITH *et al.*, 2009; MICHEAU, 2018). Interessantemente a lectina Moringa-G, com especificidade para Gal, isolada da amora preta (*Morus nigra*) induz a clivagem das caspases-8, 9 e 3 levando a morte de células da linhagem Jurkat, sendo que este efeito foi dificultado nas células deficientes em caspases-8 -10, caspase-9 ou FADD (LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013). Apesar dos dados indicarem uma possível modulação do receptor TRAIL pela ConBr, não foi possível demonstrar através de ensaios *in silico* de *docking molecular* uma interação substancial da lectina com os glicanos expressos nos receptores TRAIL-DR4 ou DR5 (dados não apresentados).

Em conjunto nossos resultados documentam um possível *crosstalk* entre ativação da via apoptótica e autofágica. Existem estudos na literatura que mostram que caspase-8 clivada medeia a ativação de Atg5 e Beclin-1 liberada da superfície mitocondrial, a partir da ativação de proteínas apoptóticas, pode modular positivamente a autofagia. Além disso, a clivagem de Atg4D resulta num produto truncado com aumento da atividade autofágica e ativação da LC3 (HOU *et al.*, 2010; PYO *et al.*, 2005). Para avaliar este mecanismo, as células C6 foram pré-tratadas com 3-MA e IETF-fmk (Fig.25). Os resultados indicam que ambos os inibidores

neutralizaram a citotoxicidade induzida pela ConBr, avaliado pelo método de MTT, da mesma forma que anularam a indução do incremento do imunocontéudo de Puma, BNIP3 e LC3II produto do tratamento por 12 h com ConBr. Existem relatos na literatura documentando que o IETF-fmk também pode ligar diretamente a Atg3 e impedir a ativação do processo autofágico, por impedir que Atg3 ligue-se a LC3 – proteína associada a microtubos 1A/1B-cadeia leve 3 (LEE *et al.*, 2009; SMYTH *et al.*, 2020). No conjunto nossos resultados sugerem que: i) ConBr promove autofagia, ii) este processo parece mediar o efeito citotóxico da ConBr nas células C6, iii) ConBr promove o aumento de algumas proteínas pró-apoptóticas, iv) estes eventos são parcialmente dependentes da via autofágica e da ativação de caspase-8.

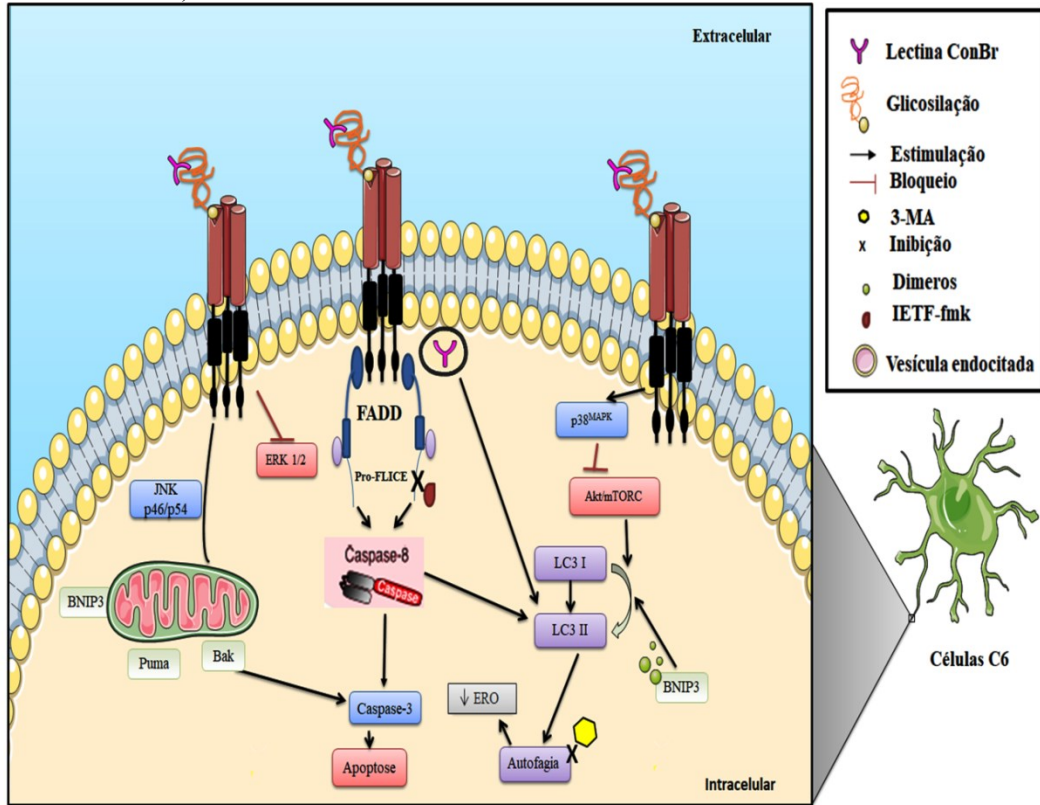
Finalmente, pode ser sugerido que a ConBr exibe seletividade citotóxica sobre as células cancerígenas, uma vez que astrócitos saudáveis não mostraram qualquer alteração na resposta frente ao tratamento com ConBr (Fig 28). Tal seletividade pode ser atribuída à expressão de alvos glicosilados nas células tumorais, mas não nas células normais (LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013). Por conseguinte, é razoável hipotetizar que a seletividade da ConBr nas células de glioma resulta da sua capacidade de reconhecer o padrão de glicosilação alterado na superfície da célula tumoral.

Como conclusão podemos dizer que os resultados do Capítulo I indicam que o efeito citotóxico da ConBr contra as células de glioma parece ser dependente da caspase-8 e a ativação da sinalização para autofagia.

Os efeitos citostáticos/antimigratórios também ocorrem em baixas concentrações. Nas células da linhagem C6, que foi o nosso modelo de estudo da sinalização celular (Fig. 43), podemos observar que a ConBr mediante a interação com os resíduos glicosilados presentes nos alvos de superfície celular desencadeia a fosforilação de p38^{MAPK} e JNK (p46/54), conjuntamente com a desfosforilação de ERK1/2, Akt e mTORC1. A diminuição da sinalização Akt/mTORC1 pela lectina pode estar envolvida na indução da autofagia, levando à morte celular.

Figura 43. Representação esquemática dos efeitos da ConBr nas células de glioma C6.

A lectina ConBr liga-se aos resíduos glicosídicos (glicose/manose) presentes na superfície das células C6 o que induz uma diminuição da viabilidade celular conjuntamente com um incremento na fosforilação de $p38^{MAPK}$ e JNK (p46/54). Este efeito é acompanhado pela desfosforilação de ERK1/2 e Akt, bem como pela inibição da migração e sobrevivência celular. Sendo importante ressaltar que a inibição da via Akt/mTORC poderia estar associada a uma intensa ativação do processo autofágico, estimulando a clivagem da LC3 para levar a morte celular. Esta complexa atividade anti-glioma da ConBr, pode envolver mecanismos de comunicação entre a clivagem da caspase-8 e a ativação da via autofágica. Esta figura foi produzida utilizando *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com>).



Grande parte dos resultados deste capítulo deu origem ao primeiro artigo desta tese, intitulado: “ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation”.

Referência: Ingrid A.V. Wolin, Isabella A. Heinrich, Ana Paula M. Nascimento, Priscilla G. Welter, Liliana del V. Sosa, Ana Lucia De Paul, Alfeu Zanotto-Filho, Claudia Beatriz Nedel, Lara Dias Lima, Vinicius Jose Silva Osterne, Vanir Reis Pinto-Junior, Kyria S. Nascimento, Benildo S. Cavada, Rodrigo B. Leal (2021). *Biochimie*. 180: 186-204. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.003>.

Capítulo 2

- 9 **Mecanismos de ação biológica da lectina DrfL I sobre linhagens de glioma.**

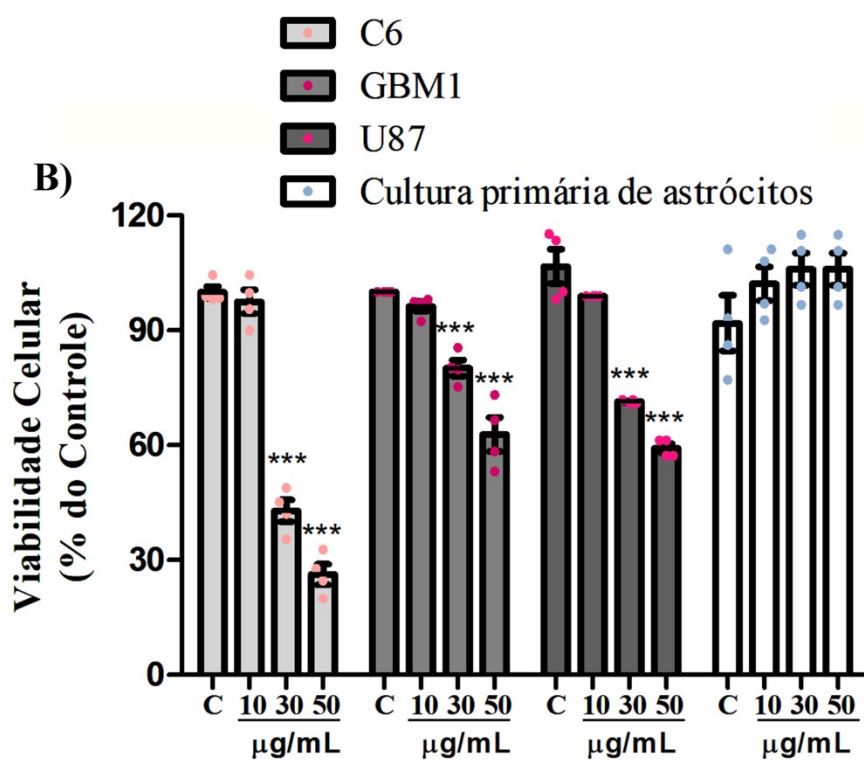
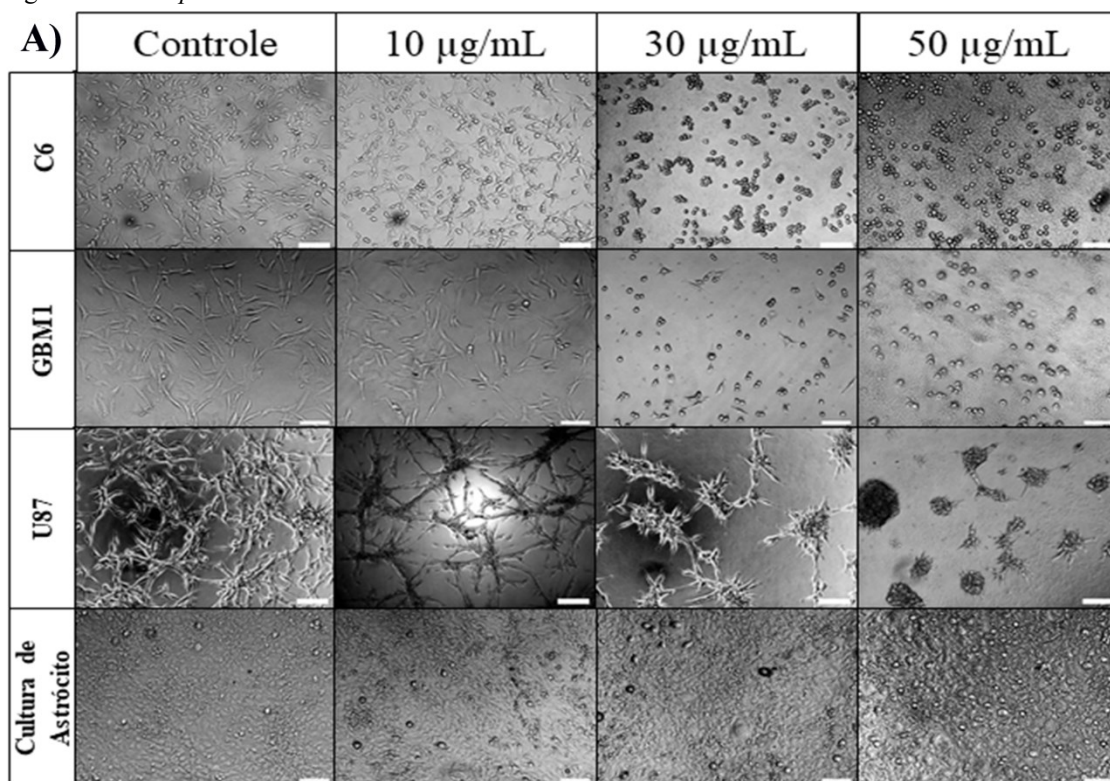
9.1 DrfL I induz alterações morfológicas nas células de glioma.

Com o propósito de analisar o mecanismo de ação da lectina DrfL I nas células de glioma, foram utilizados os mesmos modelos celulares apresentados no Capítulo 1.

A figura 44 mostra o efeito da lectina DrfL I (10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a morfologia e viabilidade das células de glioma e astrócitos saudáveis de cultura primária após 24 h de tratamento.

A figura 44A mostra a retração dos prolongamentos citoplasmáticos e perda de adesão das células de glioma. No entanto, astrócitos primários corticais não apresentaram alterações morfológicas aparentes frente ao tratamento com DrfL I. Na linhagem C6 foi verificada retração dos prolongamentos citoplasmáticos a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto a perda de adesão celular só foi observada a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A linhagem U-87 MG e a cultura primária de GBM1 apresentaram retração dos prolongamentos citoplasmáticos e perda de adesão celular a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas alterações na morfologia foram acompanhadas por diminuição da viabilidade celular. A figura 44B mostra que a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as células da linhagem C6 apresentaram redução de mais que 50% da viabilidade celular [$F_{(3,12)} = 3,207$; $p < 0,001$], enquanto que a cultura primária de GBM1 mostra uma redução acima de 20% [$F_{(3,12)} = 3,207$; $p < 0,001$] e a linhagem U-87 MG uma redução de mais de 30% [$F_{(3,12)} = 3,207$; $p < 0,001$] nessa mesma concentração. Esses resultados constataam a sensibilidade das células de glioma avaliadas frente à lectina DrfL I. Além disso, indica uma maior sensibilidade da linhagem C6 frente ao tratamento com DrfL I, considerando que a partir da concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estas células já apresentavam retração dos prolongamentos citoplasmáticos, embora a viabilidade celular ainda não fosse reduzida.

Figura 44. Perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular nas células de glioma produto do tratamento com DrfL I. Células de cultura primária de um tumor de GBM, linhagens C6 e U-87 MG de glioma e cultura primária de astrócitos sadios foram expostas a DrfL I nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ou veículo (Tampão HEPES-salina, controle) por 24 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da DrfL I na morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 200 μm . B) Viabilidade celular frente ao tratamento com DrfL I medido pelo método da redução do MTT. Os experimentos (N=4) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



9.2 Mecanismo de ação biológica da lectina DrfL I nas células da linhagem C6

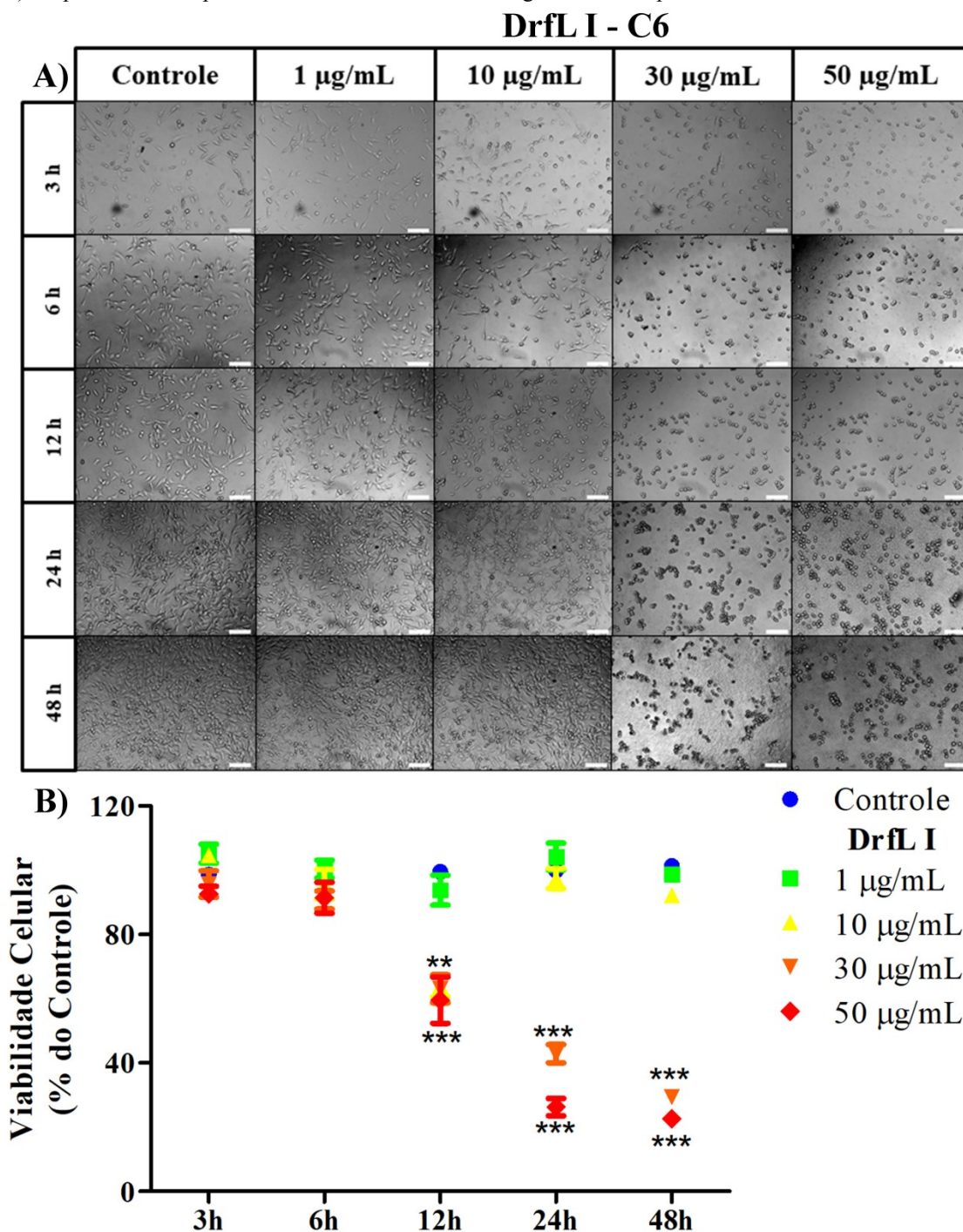
9.2.1 A perda de adesão celular e redução da viabilidade celular das células C6 são dependentes da concentração e tempo de tratamento com DrfL I

Seguindo a mesma metodologia utilizada para analisar o efeito da ConBr no Capítulo I, as células da linhagem celular C6 foram incubadas por 3, 6, 12, 24 e 48 h com veículo ou DrfL I (1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Apresentando-se na figura 45 a resposta das células C6 ao tratamento.

Como pode ser evidenciado na figura 45A, existe uma dependência de concentração e tempo nas respostas morfológicas das células frente ao tratamento com DrfL I. Assim, as células C6 apresentam retração dos prolongamentos citoplasmáticos a partir de 3 h de exposição a 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo que na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as células parecem proliferar menos em comparação ao controle. Após 6 h de exposição nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se observa células perdendo adesão celular e com mudanças morfológicas para um formato esférico; sendo este evento muito mais marcado depois de 12 h de tratamento.

A perda de adesão celular após 12 h de tratamento foi acompanhada por uma queda na viabilidade celular destas células. Como mostra a figura 45B as concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduziram mais de 50% a viabilidade celular [$F_{(4,12)} = 5,969$; $p < 0,001$]. Entretanto, em 24 h de tratamento a viabilidade celular caiu mais de 60% frente a ambas concentrações [$F_{(4,12)} = 5,969$; $p < 0,001$]. Este efeito basicamente se mantém em 48 h de tratamento, apenas com um acréscimo de redução da viabilidade (para cerca de 80%) na concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [$F_{(4,12)} = 5,969$; $p < 0,001$].

Figura 45. A perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular nas células C6 de glioma pelo tratamento com DrfL I é dependente do tempo e concentração. Células da linhagem C6 foram expostas a DrfL I nas concentrações de 1, 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou veículo (Tampão Heps-salina, controle) por 3, 6, 12, 24 e 48 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da DrfL I na morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm . B) Viabilidade celular frente ao tratamento com DrfL I medido pelo método da redução do MTT. Os experimentos (N=4) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.

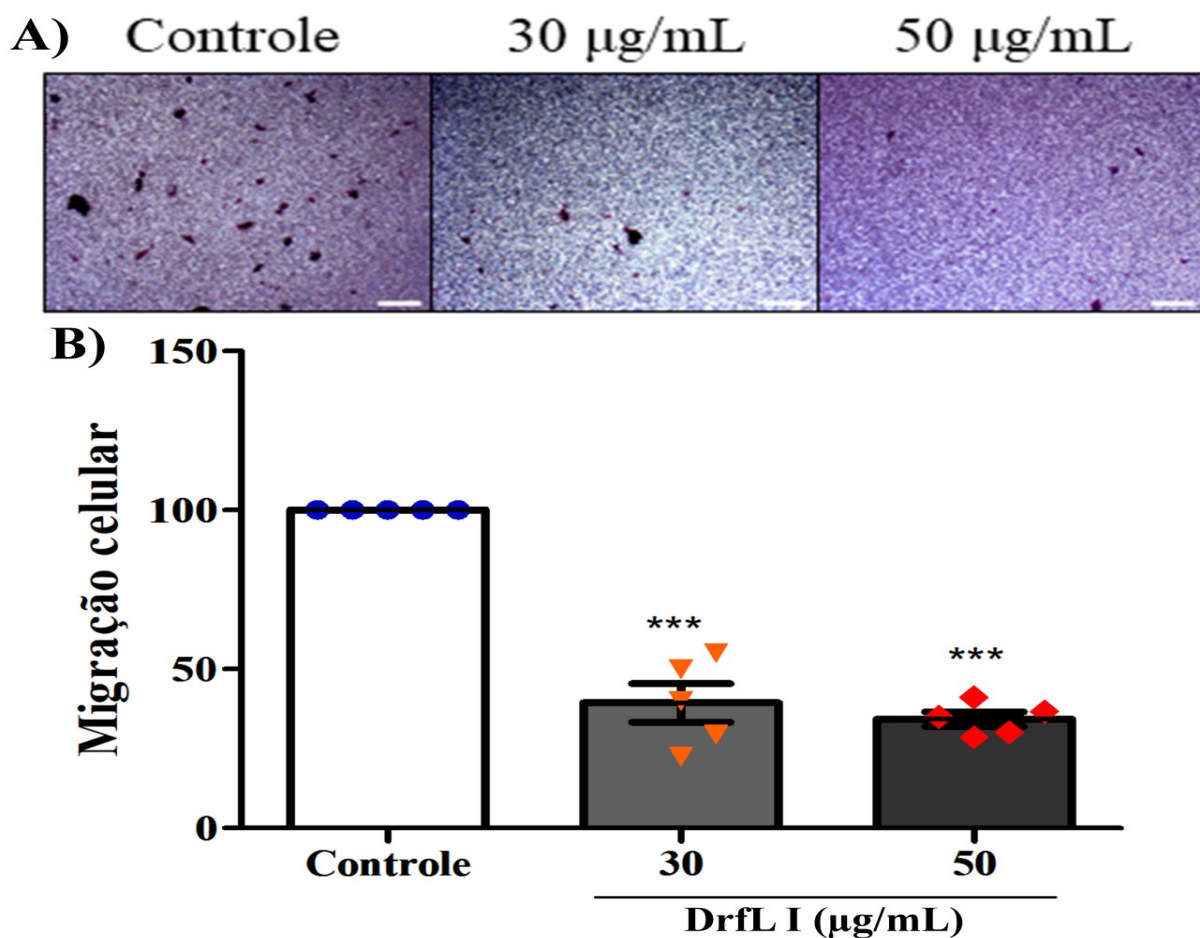


9.2.2 DrfL I diminui a capacidade de migração celular nas células C6

Com a finalidade de confirmar os resultados obtidos no ensaio de migração por “scratch” apresentados na dissertação de mestrado (WOLIN, INGRID ALESSANDRA VICTORIA, 2017) foi realizado um ensaio de migração no “transwell”.

Na figura 46 se apresenta a resposta das células C6 expostas por 24 h ao veículo ou 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I. Como é visível na figura 46A, as células expostas ao veículo migraram muito mais em direção ao meio quimioatraente (DMEM F12 + 10% SFB) que as células tratadas com a lectina. Na figura 46B é apresentada a quantificação do ensaio, mostrando uma inibição de 50 e 60%, na migração celular das células expostas a 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I, respetivamente [$F_{(2,5)}=1,628$; $p < 0,001$].

Figura 46. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático nas células C6 de glioma diminuindo a capacidade de migração celular no poço de transwell. Células da linhagem C6 foram expostas a DrfL I nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ ou (veículo: Hapes-buffer salina, controle) por 24 h. Após o período de tratamento as células foram fixadas com paraformaldeído (4 %) e coradas com Cristal violeta. As células foram visualizadas através do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. A) Representativo da coloração das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm . B) Quantificação das células a partir das imagens obtidas. Os experimentos (N=5) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



9.2.3 A lectina DrfL I modula as vias de sinalização dependentes de MAPKs e Akt nas células C6 de glioma

As análises de sinalização celular das MAPKs e Akt na linhagem C6 foram realizadas depois de 12 h, de forma similar ao estudo com a lectina ConBr apresentado anteriormente. A figura 47A representa a resposta na sinalização celular nas células C6 frente ao tratamento por 12 h com DrfL I e veículo. Os resultados indicam um aumento na fosforilação de JNKs e p38^{MAPK} juntamente com uma diminuição na fosforilação de ERKs e Akt.

Na figura 47B observa-se que 50 µg/mL de DrfL I promoveu um aumento significativo, de cerca de 3 vezes, na fosforilação de JNK(p54) [$F_{(4,4)} = 5,032$; $p < 0,01$], enquanto o tratamento com 30 µg/mL, embora tenha causado um aumento aparente (cerca de 2 vezes) na fosforilação de JNK(p54), não apresentou diferença estatística. A figura 47C mostra que JNK(p46) tem um incremento de fosforilação de cerca de 3 vezes em comparação ao controle, mas somente em resposta à exposição à 50 µg/mL [$F_{(4,4)} = 7,254$; $p < 0,05$]. Em relação a p38^{MAPK}, verifica-se que 30 e 50 µg/mL de DrfL I promove um incremento de aproximadamente 6 vezes na fosforilação de p38^{MAPK} comparado ao controle [$F_{(4,4)} = 13,41$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$].

Por outro lado, como exibido nas figuras 47D-E, DrfL I induziu uma diminuição aparente na fosforilação de ERK1 a partir de 30 µg/mL e de ERK2 a partir de 10 µg/mL. Entretanto, ambas somente apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle na concentração de 50 µg/mL (ERK1 [$F_{(4,4)} = 5,337$; $p < 0,05$] e ERK2 [$F_{(4,4)} = 5,964$; $p < 0,05$]). A fosforilação de Akt teve um perfil de resposta similar as ERKs (Fig. 47G) ocorrendo uma aparente diminuição na fosforilação de Akt a partir de 10 µg/mL de DrfL I. Entretanto, somente a concentração de 50 µg/mL apresentou diferença estatística comparado ao controle [$F_{(3,4)} = 13,94$; $p < 0,05$].

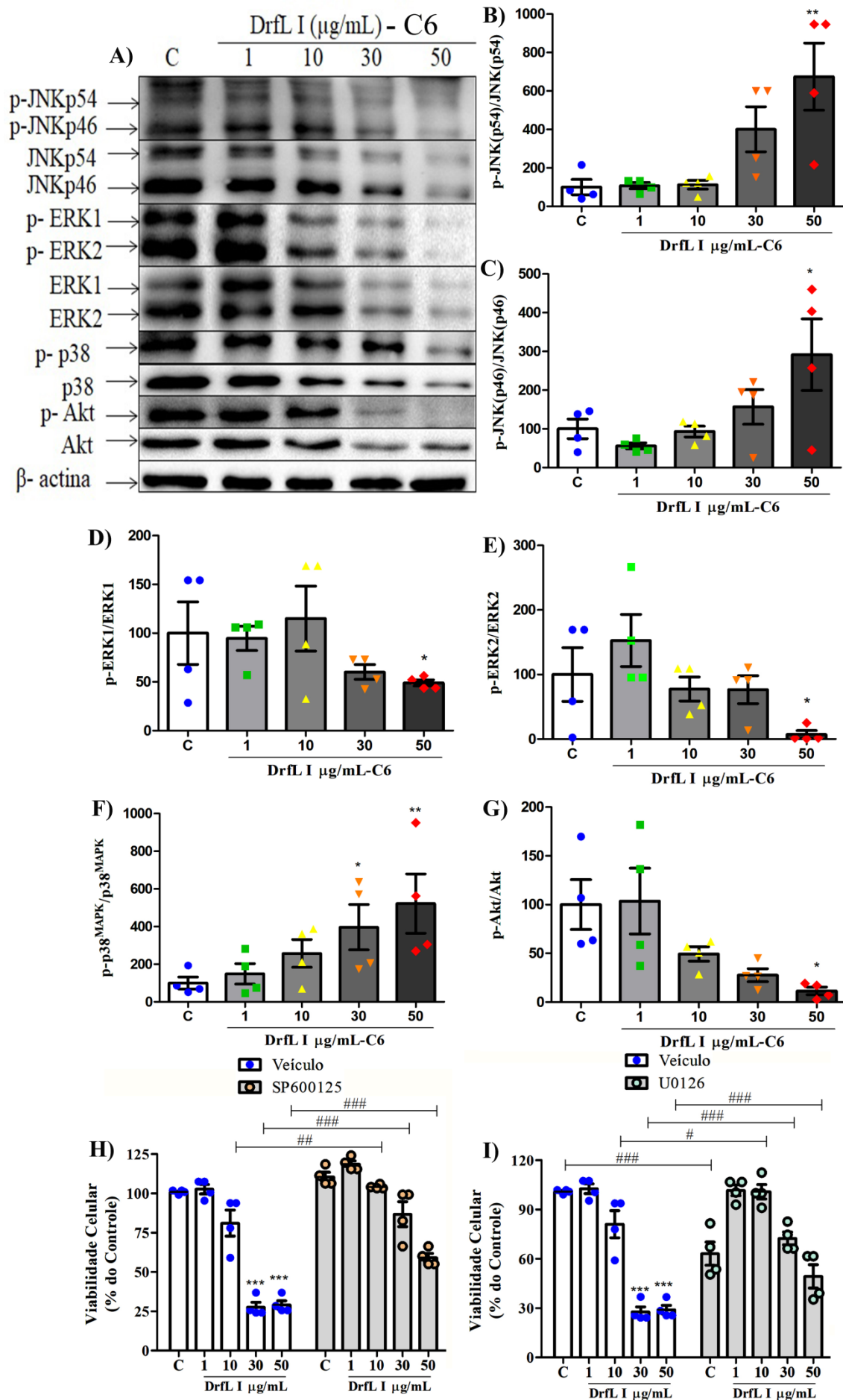
Tomados em conjunto, estes resultados sugerem um padrão de efeitos da DrfL I sobre a fosforilação das MAPKs e Akt que poderia resultar na indução de morte celular. Com esse intuito, fomos avaliar o que aconteceria com o efeito citotóxico da lectina se utilizamos inibidores das JNKs e de MEK1/2/ERKs.

Como apresentado na figura 47H, quando as células C6 foram pré-tratadas com SP600125 (inibidor das JNKs), este não teve efeito per se sobre a viabilidade, entretanto preveniu o efeito citotóxico da lectina sobre as células [$F_{(9,12)} = 2,335$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$]. O efeito do pré-tratamento com U0126, inibidor das MEK1/2/ERKs, é apresentado na figura 47I. Pode ser verificado que U0126 per se causou uma diminuição significativa da viabilidade

quando comparado ao controle. Adicionalmente, o pré-tratamento com o inibidor seguido do co-tratamento com a lectina DrfL I acabou prejudicando o efeito de redução de viabilidade causado pela lectina isoladamente [$F_{(9,12)}=1,279$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$].

Estes resultados sugerem que DrfL I pode modular diversas vias de sinalização intracelular e seu efeito citotóxico pode ser dependente, pelo menos parcialmente, da sinalização de JNKs e ERKs.

Figura 47. DrfL I pode modular diversas vias de sinalização intracelular em células C6 de glioma e a diminuição da viabilidade celular promovida pela lectina pode depender da sinalização de JNK e ERK. A) Western blot representativo das células C6 expostas ao veículo ou DrfL I por 12 h. A quantificação das proteínas é apresentada em B) JNKp54, C) JNKp46 D) ERK1, E) ERK2, F) p38^{MAPK} e G) Akt. Efeito dos inibidores de JNK e MEK/ERK sobre a viabilidade celular medido pelo método de MTT. As células da linhagem C6 foram pré-tratadas com H) 10 μ M de SP600125 (inibidor de JNK) por 7 h ou I) 10 μ M de U0126 (inibidor de MEK/ERK) por 30 min, após o período as células foram tratadas com a lectina por 24 h, sendo realizada uma comparação da viabilidade das células tratadas só com a lectina. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com lectina isoladamente e na mesma concentração.

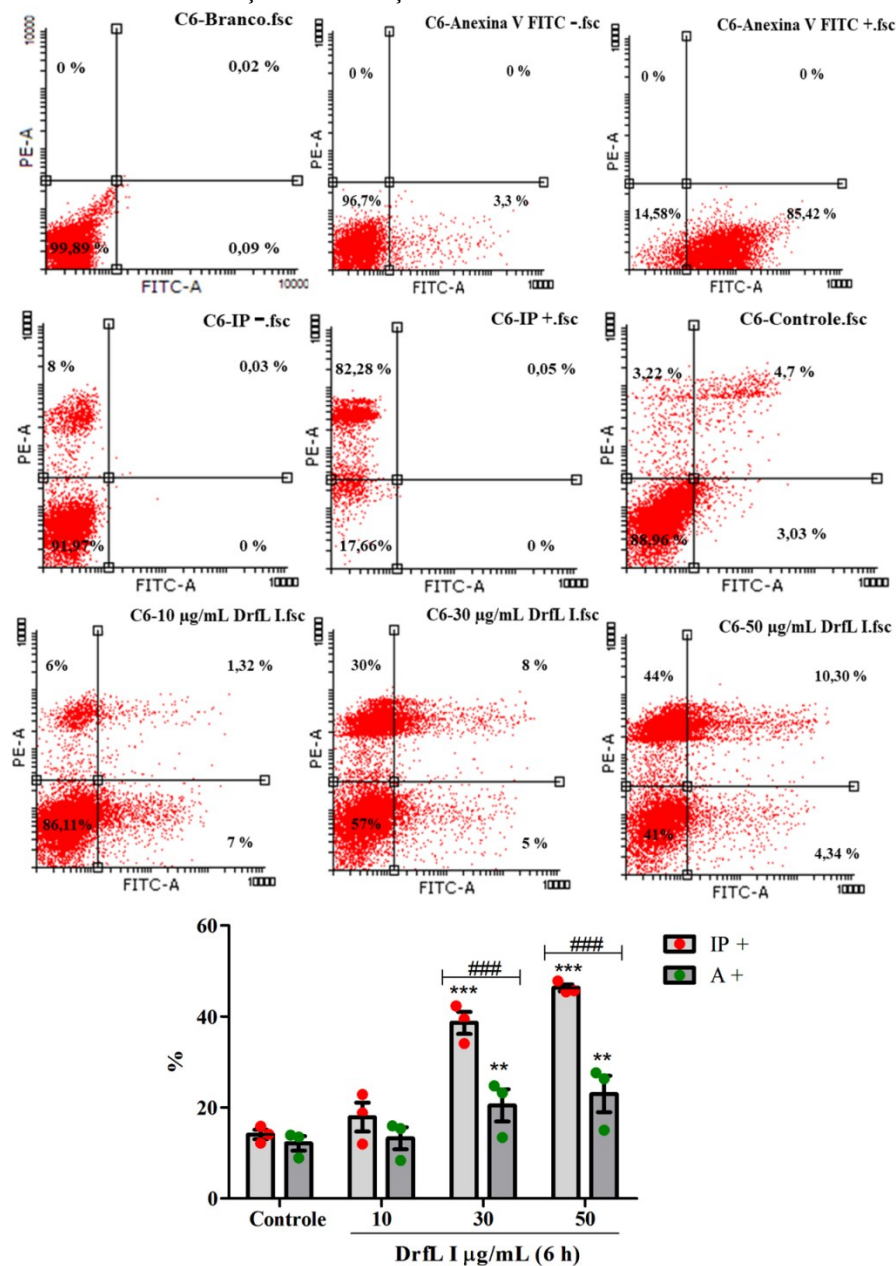


9.2.4 A ativação de caspase-8 e processos de autofagia promovem a morte das células C6 tratadas com DrfL I

Com o intuito de desvendar o possível mecanismo de ação da lectina DrfL I para diminuir a viabilidade celular das células C6, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo com os corantes Anexina-V-FITC (indicador de morte por apoptose), e IP (indicador de morte por danos na membrana celular).

A figura 48 mostra a classificação e contagem celular por citometria de fluxo das células C6 expostas por 6 h ao tratamento com DrfL I ou veículo na presença dos biomarcadores Anexina-V-FITC e IP. Pode-se observar nos gráfico de “*dot plot*” que a concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ causou um incremento de 5% na marcação para Anexina-V-FITC⁺/IP⁻ e 8% na marcação para Anexina-V-FITC⁺/IP⁺, porém a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ causou um incremento de 4,34% na marcação para Anexina-V-FITC⁺/IP⁻ e 10,3% na marcação para Anexina-V-FITC⁺/IP⁺, ambos dados são apresentados no gráfico de barra como A⁺ [$F_{(3,3)}=7,820$; $p < 0,01$]. Não obstante, o incremento da marcação para IP⁺ foi de 30% e 44%, respectivamente para ambas concentrações [$F_{(3,3)}=7,820$; $p < 0,001$].

Figura 48. O incremento da incorporação de Iodeto de Propídeo nas células C6 de glioma produto do tratamento com DrfL I não foi equivalente à marcação de Anexina-V-FITC. Células da linhagem C6 foram expostas à DrfL I nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 6 h. Após o período de tratamento as células foram coradas com Iodeto de Propídeo (IP) e Anexina-V-FICT (A). Como controle do experimento (dupla marcação negativa para IP e A) as células foram tratadas com o veículo, como controle IP+ as células foram submetidas por 20 min em nitrogênio líquido e para A+ as células foram tratadas por 3 h com staurosporina (1 μM). O ensaio foi realizado utilizando o aparelho FACS Canto (Becton Dickson®), através da contagem de 10.000 eventos por amostras. Análise dos dados obtidos foi feita através do software livre Flowing 2.5.1®. Os dados foram analisados através de gráficos de pontos “dot plots” segundo os parâmetros PE-A (eixo y) e FICT-A (eixo x). O gráfico de histograma foi realizado em função das porcentagens obtidas de três experimentos realizados em triplicata. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação às diferenças entre tratamento.



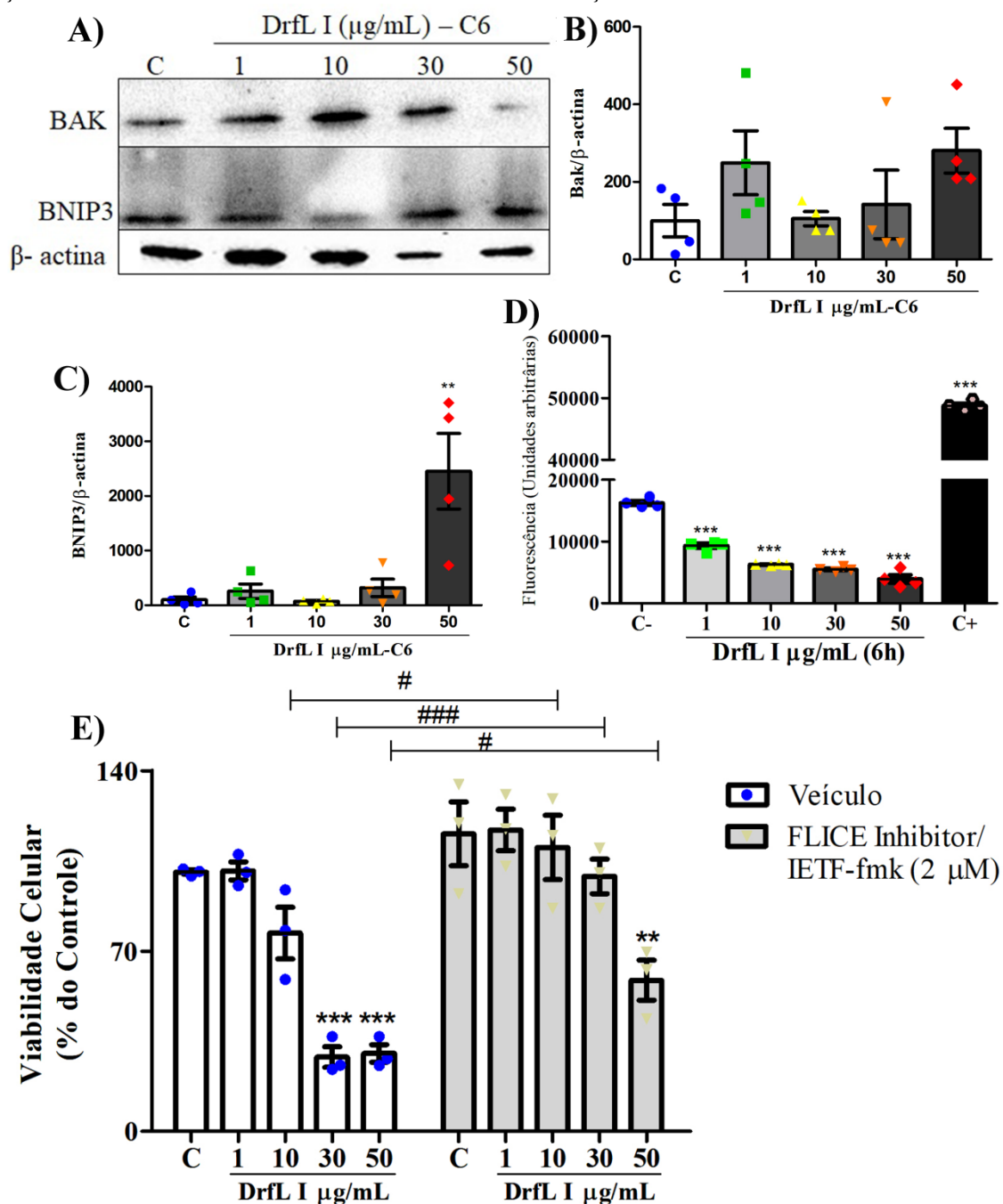
Com o propósito de entender a incorporação discreta de Anexina-V-FITC nas células C6 tratadas com DrfL I, analisamos a sinalização celular responsável pela ativação da via apoptótica; sendo esses dados apresentados na figura 49.

A figura 49A apresenta um representativo da resposta na sinalização celular para Bak e BNIP3 nas células C6 frente ao tratamento por 12 h com DrfL I e veículo. Como se observa na figura 49B não foram demonstradas alterações significativas na expressão de Bak comparadas ao controle. Entretanto, como nota-se na figura 49C houve um intenso incremento na expressão de BNIP3 em resposta a 50 µg/mL de DrfL I comparado ao controle [$F_{(4,4)}=25,57$; $p < 0,01$]. Simultaneamente, foi observada uma diminuição na ativação de caspase-3 frente ao tratamento por 6 h com DrfL I, pelo Kit comercial “EnzChek[®] Caspase-3 Assay Kit” (Fig. 49D) [$F_{(5,4)}= 3,025$; $p < 0,001$].

Considerando que estes achados não explicam a baixa marcação para anexina-V-FITC, apresentados na figura 48, resolvemos avaliar se este resultado estaria associado com uma possível ativação de caspase-8, e assim relacionado com a ativação direta ou indireta de receptores de morte celular pela lectina. Para isso, as células C6 foram pré-tratadas com o inibidor de Caspase-8 (IETF-fmk) e a seguir avaliado o efeito citotóxico da lectina.

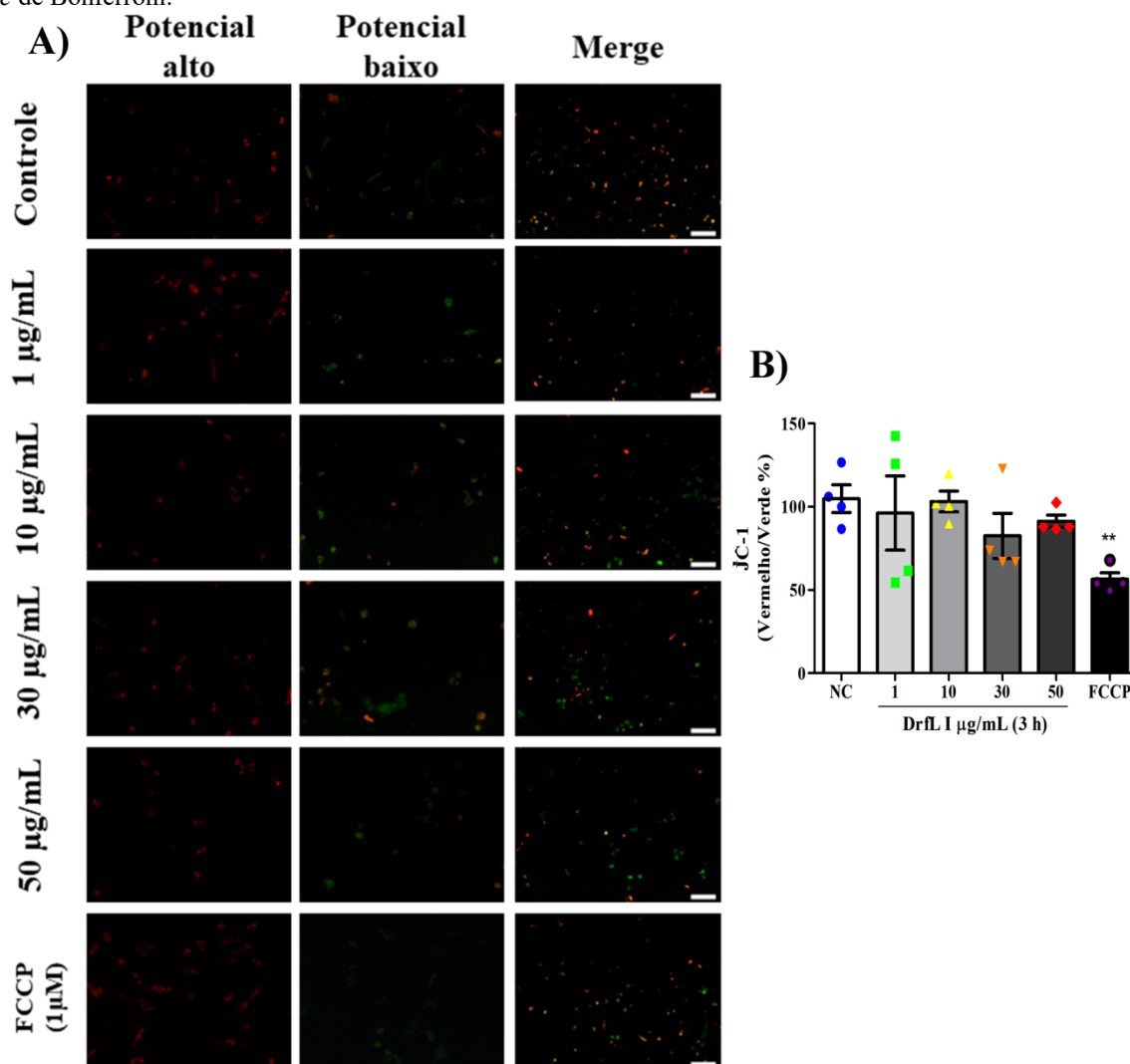
A figura 49E mostra que a diminuição da viabilidade celular induzida pelo tratamento com 30 e 50 µg/mL de DrfL I foi bloqueado [$F_{(9,12)}= 6,054$; $p < 0,001$ e $p < 0,05$], respectivamente, quando as células foram pré-tratadas com o inibidor de Caspase-8 (IETF-fmk).

Figura 49. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da DrfL I nas células C6 de glioma pode ser dependente da ativação de Caspase-8. A) Western blot representativo de proteínas apoptóticas em células C6 expostas ao veículo ou DrfL I por 12 h. A quantificação das proteínas foi realizada em B) Bak e C) BNIP3. D) Ensaio da atividade de Caspase-3 das células C6 expostas por 6 h ao tratamento. Foi considerado grupo controle negativo (C-) as células expostas ao veículo e como controle positivo (C+) células expostas por 3 h a staurosporina (1 μ M). E) Efeito do inibidor de Caspase-8 (IETF-fmk) sobre a viabilidade celular medido pelo método de MTT. As células da linhagem C6 foram pré-tratadas com 2 μ M do inibidor de caspase-8 por 6 h, após este período as células foram tratadas com a lectina por 24 h, sendo realizada uma comparação da viabilidade das células tratadas somente com a lectina. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com lectina somente e na mesma concentração.



A figura 50 revela que não houve alterações no potencial de membrana mitocondrial das células expostas por 6 h a DrfL I, quando avaliado pela sonda JC-1. Estes resultados corroboram com os obtidos na figura 49E, na medida que não indicam a participação da mitocôndria na resposta celular à lectina e assim excluem a possibilidade de que a lectina poderia ativar o processo de apoptose pela via intrínseca.

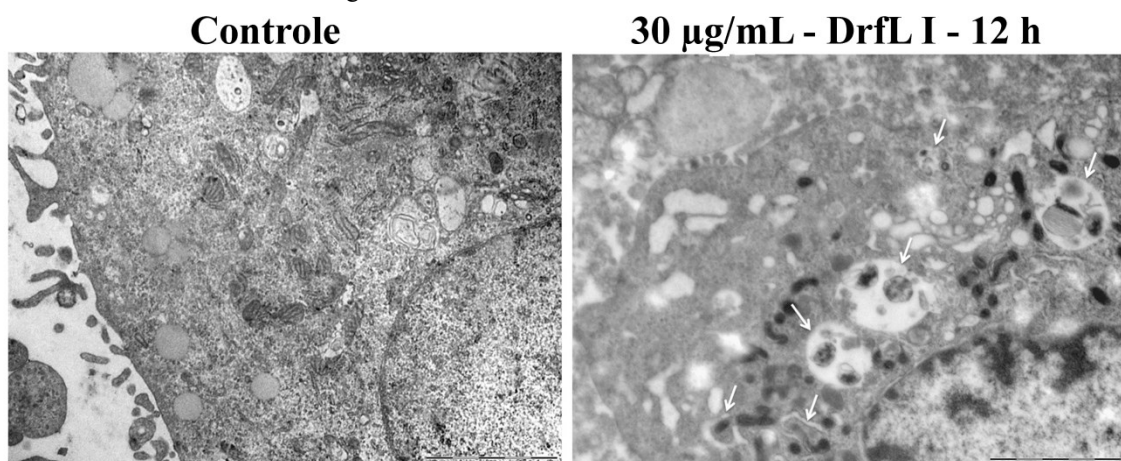
Figura 50. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da DrfL I nas células C6 de glioma não interfere no potencial de membrana mitocondrial. Células da linhagem C6 foram tratadas com veículo (controle) ou DrfL I por 3 h, sendo utilizado como controle positivo FCCP (1 μ M). Após o período de tratamento, as células foram coradas com a sonda JC-1. A) Visualização das células, através de microscopia de fluorescência, com o auxílio de microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. B) Quantificação da leitura de fluorescência realizada no multileitor SpectraMax Molecular Device, utilizando 490 nm de emissão e 520 nm de excitação (verde) e 525 nm de emissão e 590 nm de excitação (vermelho). Os dados foram expressos em relação ao controle (veículo) considerado 100%. Os valores representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



Baseado em estudos anteriores da ação de lectinas leguminosas sobre células de glioma, e dando continuidade na busca do mecanismo de ação de DrfL I sobre as células C6, foi investigado a modulação do processo de autofagia pela lectina.

A análise das características morfológicas das células C6 expostas a DrfL I revelou a presença de numerosos vacúolos autofágicos, vacúolos vazios e lisossomos secundários; sendo estes dados apresentados na figura 51 pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Notavelmente, como já observado anteriormente com o tratamento das células C6 com ConBr (Fig. 37), o tratamento com 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DrfL I por 12 h mostrou a presença de autofagolisossomos, contendo estruturas lamelares ou materiais digeridos residuais. Adicionalmente, foi verificada a presença de vacúolos maiores com material degradado circundado por uma dupla membrana, representando vacúolos autofágicos maduros. A formação persistente de autofagossomos, em resposta ao tratamento com lectina, está correlacionada com uma redução progressiva de organelas intracelulares, bem como a formação de vacúolos autofágicos membranosos eletrodensos, aparecimento de corpos multivesiculares e o englobamento de organelas inteiras.

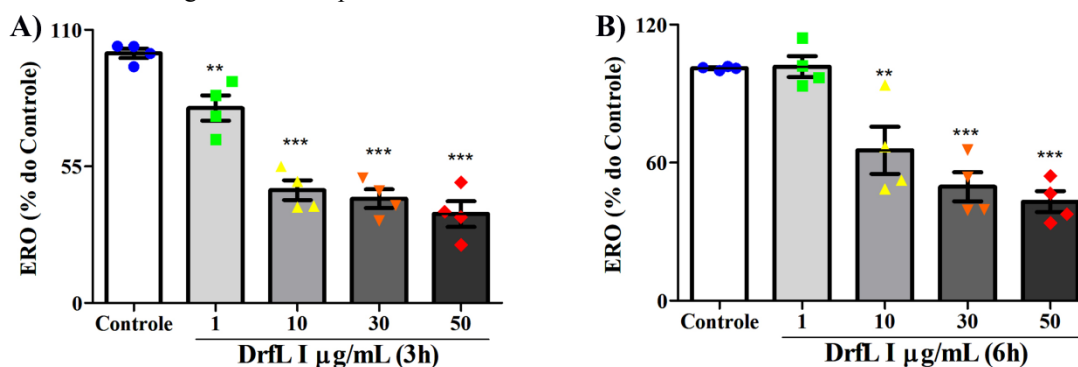
Figura 51. Aumento da formação de organelas vesiculares ácidas (OVA) nas células C6 de glioma tratadas com 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DrfL I. Células da linhagem C6 foram expostas a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DrfL I ou veículo (Tampão Hepes-salina, controle) por 12 h. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico Ziess Leo 906-E equipamento com a câmera digital Megaview III (Oberkochen, Alemanha). As setas em branco indicam as organelas vesiculares ácidas ou vesículas autofágicas com membrana típica de camada dupla contendo remanescentes de organelas.



Coincidentemente com a formação de OVA, foi observado uma redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir de 3 h de exposição à DrfL I como apresentado na figura 52. Na figura 52A pode-se reparar que após 3 h de tratamento com DrfL I houve uma queda na produção de ERO a partir de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [$F_{(4,12)} = 3,232$; $p < 0,01$ e $p <$

0,001]. Após 6 h de tratamento, a concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ perdeu a capacidade de inibir a produção de ERO, enquanto as concentrações de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$ mantiveram a inibição (Fig. 52B) [$F_{(4,12)} = 5,120$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$].

Figura 52. O mecanismo de ação da DrfL I pode envolver a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio nas células C6. Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) mediante a sonda DCF-DA após tratamento das células com veículo ou DrfL I A) 3 h e B) 6 h. Os dados são expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado 100%). Os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



Com base nos dados já apresentados, resolvemos avaliar a modulação de proteínas associadas a sinalização do processo autofágico nas células C6 frente ao tratamento por 12 h com DrfL I.

Na figura 53A é apresentado um representativo de diversas proteínas de sinalização celular e associadas aos mecanismos de autofagia. Nos quadros seguintes (53B-E) é mostrada a quantificação das proteínas avaliadas. Assim, como se observa na figura 53B a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I induziu um incremento de cerca de 3 vezes na fosforilação de mTORC1 [$F_{(4,4)} = 3,709$; $p < 0,01$]. A expressão de Beclin-1 foi estimulada em cerca de 4 vezes nas concentrações de 1 e de 30 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I [$F_{(4,4)} = 5,672$; $p < 0,05$] (Fig. 53C). Além disso, ocorreu aumento na ordem de 6 vezes na expressão de Atg-7, mas apenas na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ [$F_{(4,4)} = 5,885$; $p < 0,05$]. Notavelmente, a clivagem de LC3I para LC3II, que representa um marcador clássico de autofagia, foi incrementada em cerca de 7 vezes (Fig. 53E) na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ [$F_{(4,4)} = 13,31$; $p < 0,01$].

Finalmente, para identificar o papel do processo autofágico na indução de morte celular induzida pela lectina, as células C6 foram co-tratadas com DrfL I e 3-MA ou CQ.

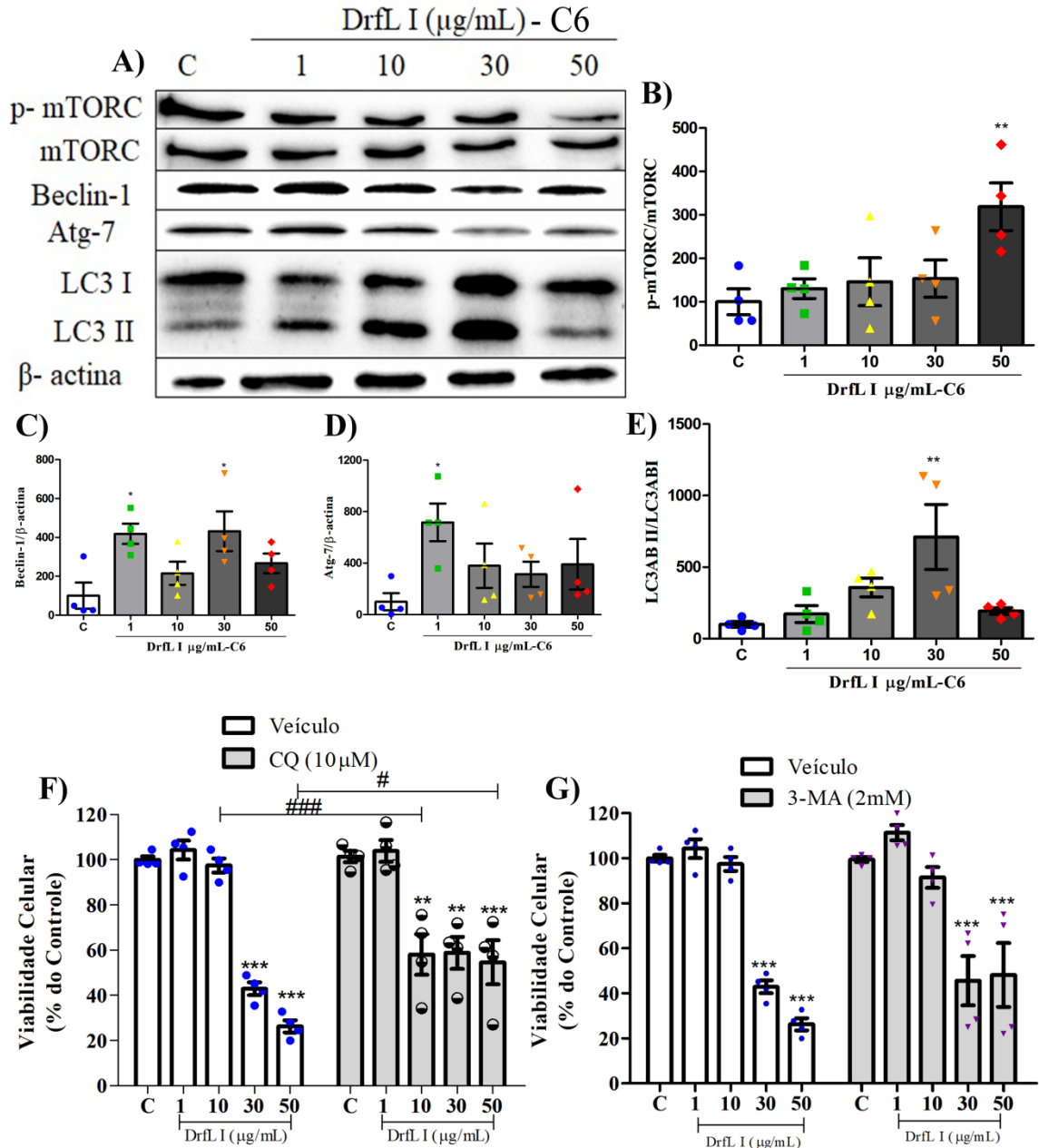
A figura 53F mostra que o bloqueio da formação do autofagolisossomo com CQ pode interferir no mecanismo de ação da lectina, observando-se que o efeito citotóxico induzido por 50 $\mu\text{g/mL}$ foi reduzido [$F_{(9,12)} = 11,23$; $p < 0,05$]. DrfL I na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ isoladamente não era capaz de alterar a viabilidade celular. Entretanto, foi observado

que na presença de CQ essa mesma concentração promoveu queda significativa da viabilidade celular. Em conjunto, esses resultados sugerem uma dualidade no papel da autofagia, que inclui: uma possível ação protetora frente a baixas concentrações de lectina e um papel associada a morte celular frente as concentrações mais elevadas de DrfL I.

A figura 53G indica que a inibição dos primeiros passos da autofagia com 3-MA não foi capaz de ocasionar alterações significativas no efeito citotóxico da lectina.

Figura 53. O mecanismo de ação da DrfL I para levar a morte nas células C6 de glioma pode ser dependente do fluxo de formação do autofagolisosomo.

A) Western blot representativo das células C6 expostas ao veículo ou DrfL I por 12 h e quantificação das proteínas B) mTORC, C) Beclin-1 D) Atg-7 e E) LC3. Efeito dos inibidores de autofagia na viabilidade celular medido pelo método de MTT. As células da linhagem C6 foram pré-tratadas com F) 10 μ M de CQ por 24 h ou G) 2 mM de 3-MA por 1 h. Após esse período as células foram tratadas soamente com lectina por 24 h. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado 100%). Os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com lectina isolada e na mesma concentração.



9.3 Mecanismo de ação biológica da lectina DrfL I sobre as células da linhagem U-87 MG

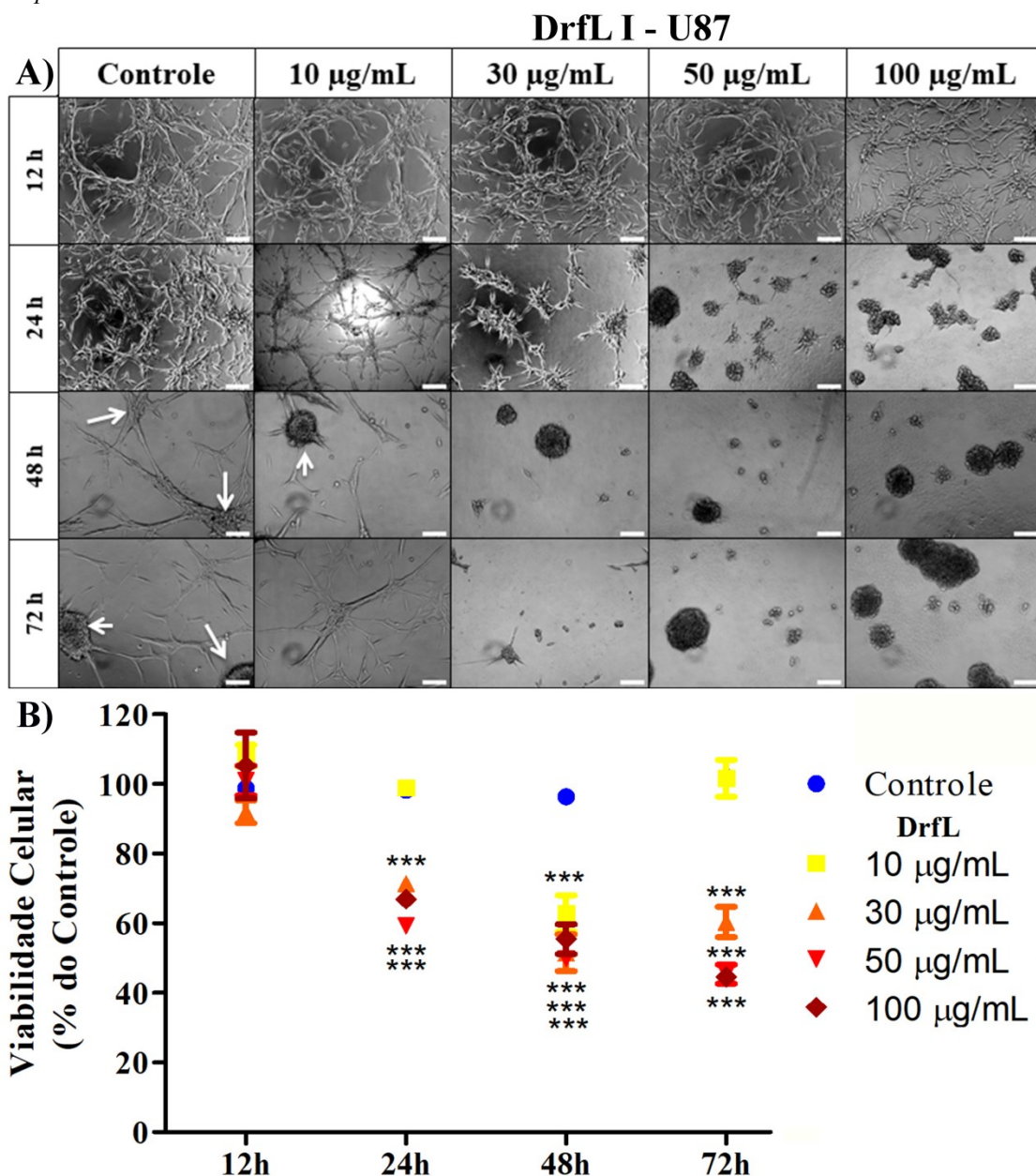
9.3.1 O efeito da DrfL I nas células U-87 MG é dependente de integridade da proteína além da concentração e tempo de tratamento.

Com o interesse em continuar avaliando o mecanismo de ação da lectina DrfL I nas células de glioma, fomos estudar o seu efeito nas células da linhagem comercial U-87 MG de glioblastoma multiforme humano.

A figura 54A mostra que existe uma dependência de concentração e tempo na resposta citotóxica das células frente ao tratamento com DrfL I, observando-se que a perda da adesão celular começa após 24 h de tratamento na concentração de 30 µg/mL. Na concentração de 10 µg/mL este processo ocorre após 48 h, porém em 72 h as células tratadas com 10 µg/mL recuperam a sua morfologia. Podendo-se explicar esta melhoria pela presença de tumoresferas, sinalizada com as setas brancas, microesferas formadas pelo aglomerado de células.

As alterações na morfologia foram acompanhadas pela perda de viabilidade celular, como mostra a figura 54B as concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL induziram uma redução na viabilidade de mais de 30% [$F_{(4,12)} = 4,48$; $p < 0,001$] frente ao tratamento por 24 h. Por outro lado, em 48 h de tratamento pode observar-se uma redução de mais de 40% [$F_{(4,12)} = 4,48$; $p < 0,001$] da viabilidade celular frente a todas as concentrações testadas. Entretanto, o efeito citotóxico da concentração de 10 µg/mL é perdido depois de 72 h de tratamento.

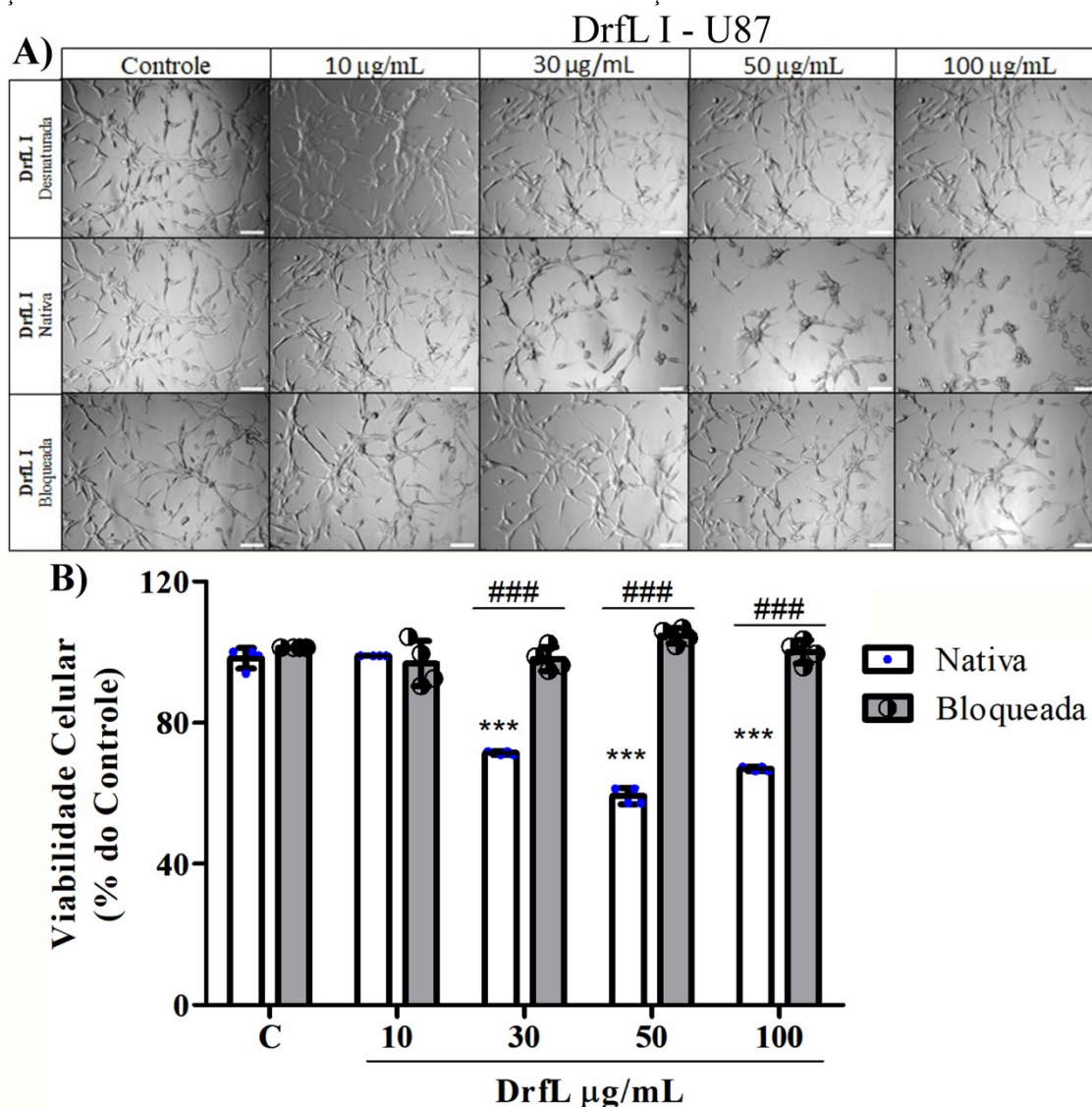
Figura 54. Perda de adesão celular e diminuição da viabilidade celular nas células U-87 MG de glioma produto do tratamento com DrfL I. Células da linhagem comercial U-87 MG foram expostas a DrfL I nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 12, 24, 48 e 72 h (veículo: HEPES-buffer salina, controle). A) Microscopia óptica mostrando o efeito da DrfL I na morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. As setas brancas mostram a presença de tumoresferas. Barra de escala representa 100 μm . B) Viabilidade celular frente ao tratamento com DrfL I medido pelo método da redução do MTT. Foram realizados quatro experimentos em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



A figura 55 mostra que o bloqueio do domínio de ligação a carboidratos (CRD) por α -metil-manosídeo, bem como a desnaturação térmica da lectina causaram inibição dos seus efeitos biológicos relativos à modificação morfológica das células e produção de citotoxicidade. Assim, as células U-87 MG expostas ao tratamento com DrfL I no seu estado

nativo apresentam perda de adesão dos prolongamento citoplasmáticos (Fig. 55A) e uma redução da viabilidade celular de mais de 30 % [$F_{(4,12)} = 2,55$; $p < 0,01$] a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 55B). Porém, o tratamento com DrfL I no seu estado desnaturado ou com o CRD bloqueado não apresentou efeitos citotóxicos nas células, relativo à perda de adesão e diminuição da viabilidade celular (Fig. 55A-B).

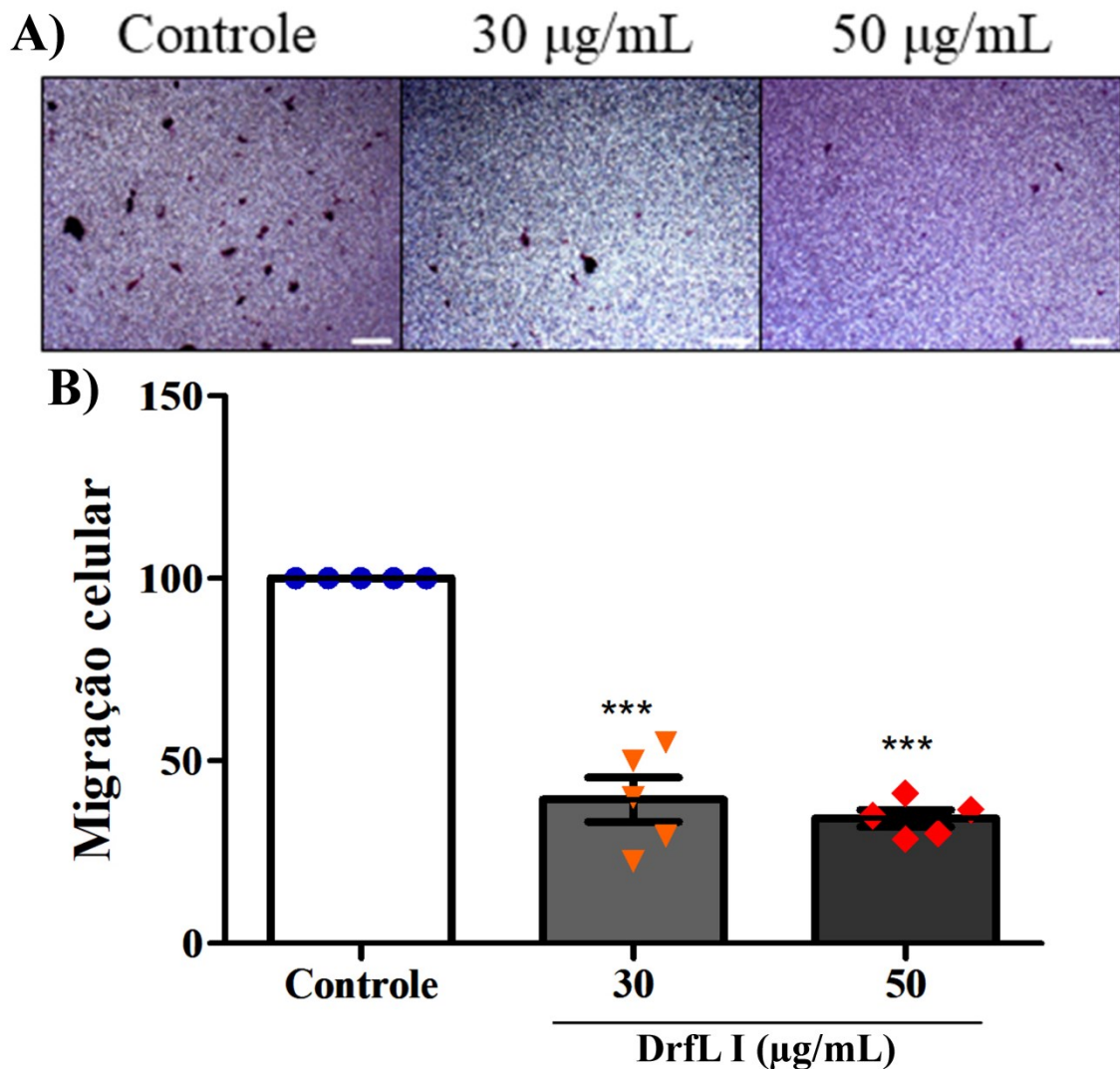
Figura 55. A ação citotóxica da lectina DrfL I nas células U-87 MG de glioma é dependente da integridade da proteína e do seu domínio de ligação a carboidratos (CRD). Células da linhagem U-87 MG foram expostas por 24 h ao veículo (Tampão Hepes-salina, controle) ou DrfL I nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ nos seus estados nativa, bloqueada e desnaturada. A) Microscopia óptica mostrando o efeito do tratamento sobre a morfologia das células. Barra de escala representa 100 μm . B) Viabilidade celular frente ao tratamento com DrfL I, medido pelo método da redução do MTT. Foram realizados quatro experimentos em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com lectina somente e na mesma concentração.



9.3.2 A DrfL I possui efeito citostático na capacidade de migração, adesão e eficácia clonogênica das células U-87 MG

A figura 56 mostra o efeito citostático da lectina DrfL I sobre as células U-87 MG. Assim, o tratamento por 24 h das células U-87 com DrfL I, nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I, causou inibição da migração de 30% e 60% [$F_{(2,5)} = 3,14$; $p < 0,0001$], respectivamente, avaliada no *transwell*. Estes achados corroboram com dados prévios, apresentados na dissertação de mestrado (WOLIN, INGRID ALESSANDRA VICTORIA, 2017), em que foi utilizado o ensaio de migração por “*scratch*”.

Figura 56. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático nas células U-87 MG de glioma diminuindo a capacidade de migração celular no poço de *transwell*. Células da linhagem U-87 MG foram expostas ao veículo (Tampão HEPES-salina, controle) ou DrfL I nas concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 h. Após esse período de tratamento as células foram fixadas com paraformaldeído (4 %) e coradas com Cristal violeta. As células foram visualizadas através do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. A) Representativo da coloração das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm . B) Quantificação das células apresentadas na imagem. Os experimentos (N=5) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



A migração celular é uma característica chave das células cancerígenas malignas, sendo importantes na progressão tumoral a partir de uma massa primária localizada, ou ainda para no próprio processo metastático ou infiltrativo no caso dos gliomas. Assim, torna-se crucial a avaliação deste processo e sua modulação frente a compostos com possível atividade antitumoral. Porém, os métodos até agora apresentados para determinar o efeito citostático da DrfL I nas células U-87 MG envolveram culturas homogêneas bidimensionais (2 D) que não têm em conta a heterogeneidade da massa tumoral e os contatos celulares de interação. Desse modo, resolvemos realizar uma cultura 3D mediante a formação de tumoresferas (Fig. 57A),

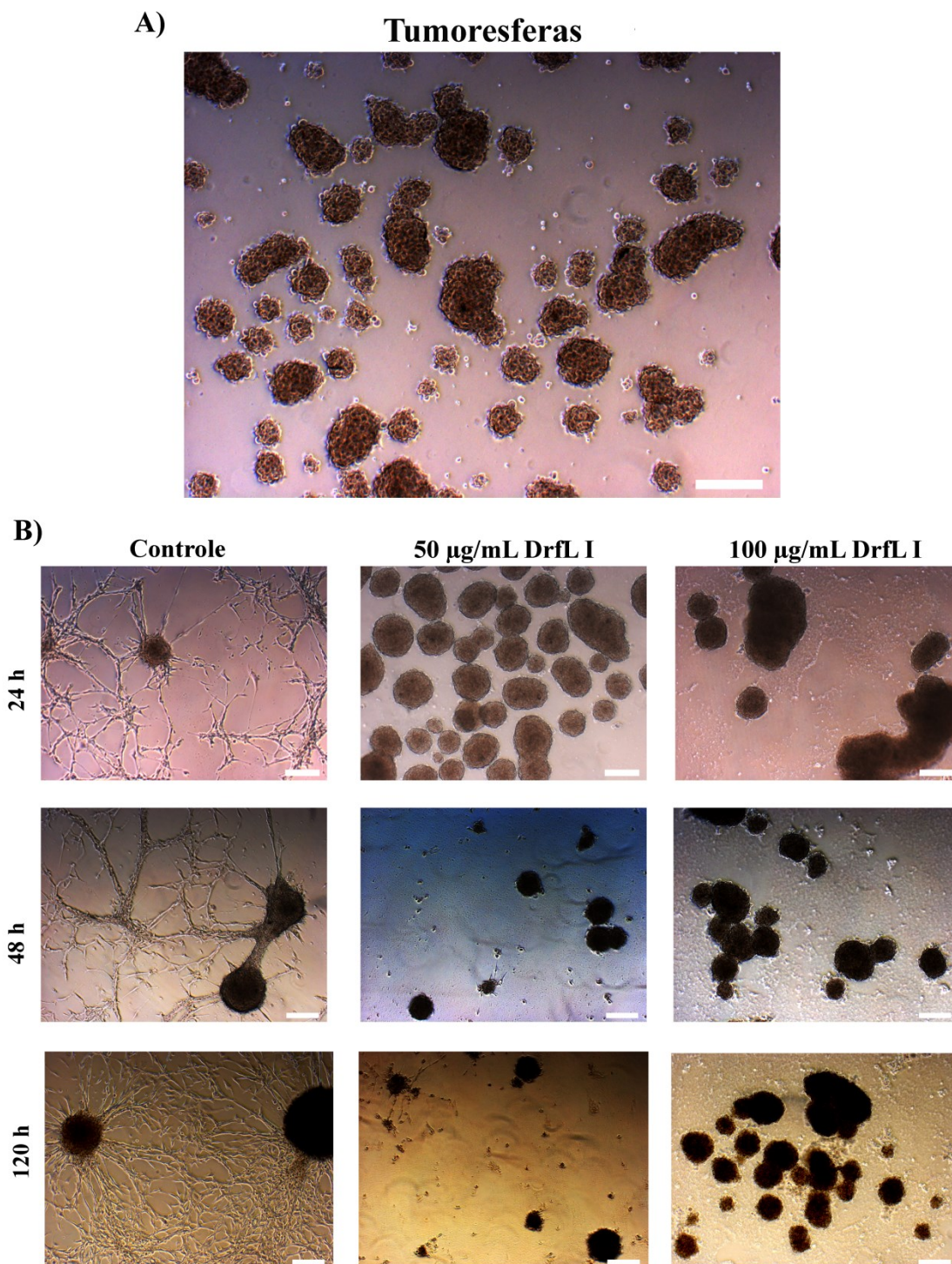
que possuem uma similaridade morfológica e fisiológica à biologia tumoral. Nesse sentido, as tumoresferas podem reagir com maior precisão às condições do microambiente tumoral e reproduzir, parcialmente, as interações célula-célula, célula-matriz extracelular e células hospedeiras que ocorrem *in situ*.

Como pode ser observado na figura 57B o tratamento com 50 e 100 µg/mL de DrfL I inibiu a capacidade das tumoresferas de aderir à superfície do poço para permitir a repopulação. Ao contrário do observado nas tumoresferas tratadas com o veículo (controle) onde, após 24 h da transferência para o poço (sem Plurônico F-127 em placa de 24 poços), as células conseguiram se fixar ao substrato e começar a migrar, aumentando o deslocamento e igualando a adesão e espalhamento celular àquele observado normalmente nas culturas da linhagem U-87 MG. Cabe destacar que após 72 h de tratamento com 50 µg/mL de DrfL I, só foi observada uma pequena população de células que começaram a diferenciar e migrar, mas ainda assim com comprometimento na sua morfologia. Além disso, foi observado nos poços onde as tumoresferas foram tratados com 100 µg/mL de DrfL I que a inibição da adesão celular foi total e em todos os tempos testados. Nesse caso podia ser observado um grande comprometimento da matriz extracelular que se apresentou com aspecto de areia no fundo do poço da placa.

Outro dado interessante a ser ressaltado é a diminuição da massa das tumoresferas tratadas com 50 µg/mL de DrfL I, comparados ao observado no tratamento com veículo (controle). As tumoresferas tratados com 100 µg/mL de DrfL I se mostraram sem translucência indicando uma aparente morte das células nessa condição.

Estes dados são muito importantes, e apontam a necessidade de estudos futuros que avaliem a integridade da matriz extracelular das tumoresferas tratados com DrfL I, bem como a caracterização das células que conseguem se diferenciar e migrar no tratamento com 50 µg/mL de DrfL I.

Figura 57. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático sobre as tumoresferas da linhagem U-87 MG diminuindo a capacidade de migração/adesão celular. As tumoresferas foram expostas ao veículo (Tampão Hepar-salina, controle) ou DrfL I nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24, 48 e 120 h. A) Representativo da morfologia das tumoresferas antes do tratamento. B) Representativo da resposta das tumoresferas ao tratamento. As imagens foram capturadas através do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. Barra de escala representa 200 μm .

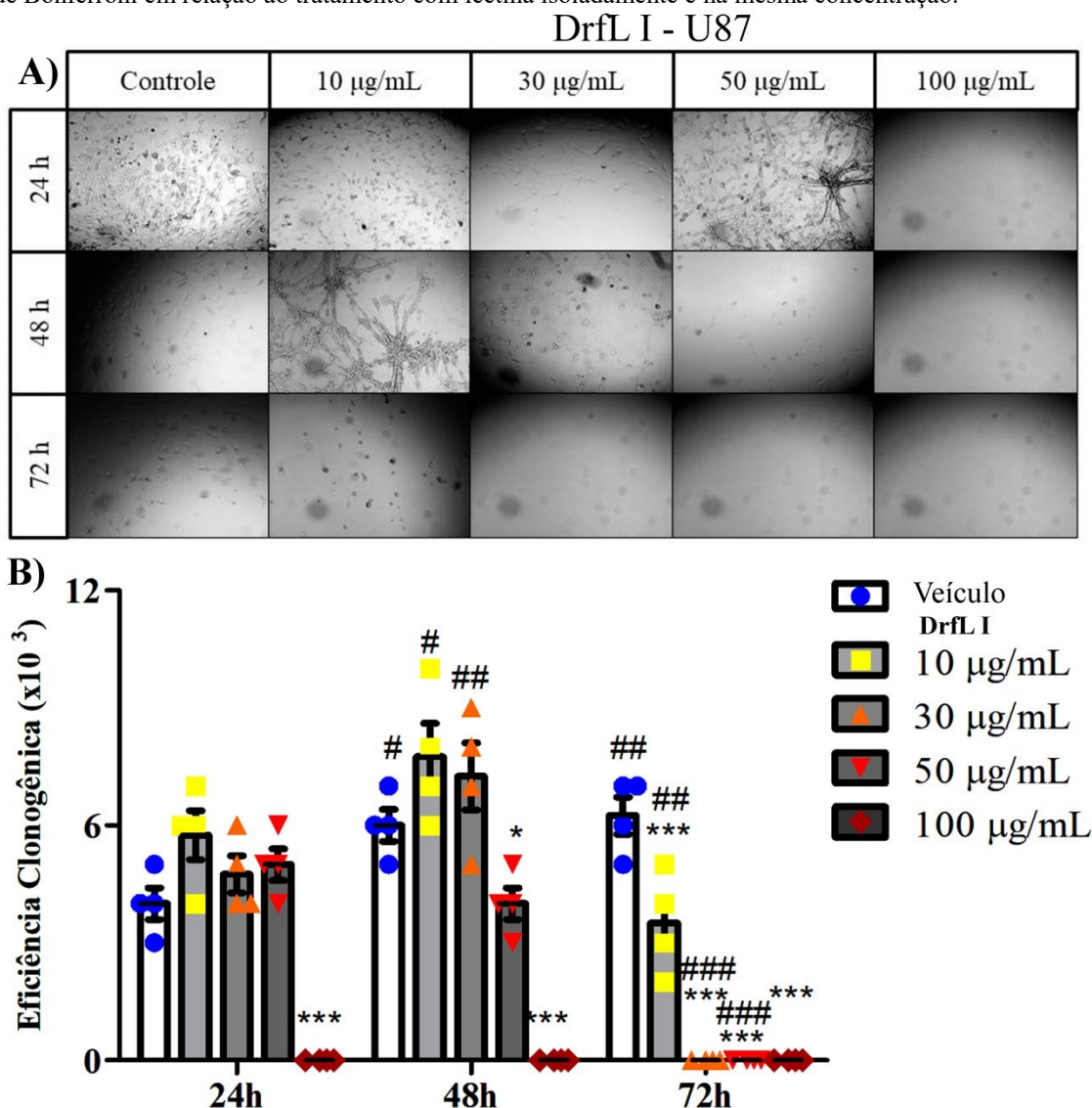


Outro aspecto importante que limita a eficiência dos tratamentos utilizados atualmente frente ao GBM é a sua eficiência clonogênica. Esta característica permite a regeneração ou mesmo a expansão do tumor, a partir da sobrevivência de algumas poucas

células. Isso faz com que os tratamentos tenham efeito paliativo e não sejam capazes de conter a evolução do tumor.

Baseadas neste fato, fomos avaliar se a lectina DrfL I teria a capacidade de inibir a eficácia clonogênica das células U-87 MG. Nas figuras 58A-B, é mostrado que a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ causou uma inibição clonogênica de mais de 90% [$F_{(4,4)} = 20,16; p < 0,001$] após 24 h de tratamento. Quando considerado um tratamento mais prolongado de 72 h, foi observado que houve uma diminuição de mais de 90% da eficácia clonogênica a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$ [$F_{(4,4)} = 20,16; p < 0,001$].

Figura 58. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático nas células U-87 MG de glioma diminuindo a eficácia clonogênica das células. As células da linhagem U-87 MG foram expostas ao veículo (Tampão HEPES-salina, controle) ou DrfL I nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24, 48 e 72 h. Após esse período de tratamento, as células foram clonadas por diluição limitante (0,5 células/poço) e incubadas por 10 dias. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da DrfL I na morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. A figura é um representativo de quatro experimentos realizados em triplicata. A barra representa 100 μm . B) Contagem em câmara de Neubauer do número de células por poço. Foram realizados quatro experimentos em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com lectina isoladamente e na mesma concentração.



9.3.3 A lectina DrfL I modula as vias de sinalização dependentes de MAPKs e Akt nas células U-87 MG de glioblastoma multiforme humano

As análises de sinalização celular das MAPKs e Akt foram realizadas após 24 h de tratamento. A figura 59A mostra um representativo da resposta na sinalização celular nas células U-87 MG frente ao tratamento por 24 h com DrfL I e veículo. Os resultados indicam

um aumento na fosforilação de JNKs e p38^{MAPK} simultaneamente a uma diminuição da fosforilação ERKs e Akt.

Na figura 59B observa-se que JNK(p54) apresentou um incremento na sua fosforilação de até 2 vezes em resposta ao tratamento quando comparado ao controle, porém só a concentração de 100 µg/mL apresentou diferença estatística [$F_{(4,4)} = 7,710$; $p < 0,05$]. Na figura 59C pode ser verificado que JNK(p46) apresentou um incremento na sua fosforilação em cerca de 3 vezes em resposta à exposição de 100 µg/mL [$F_{(4,4)} = 7,710$; $p < 0,05$] em comparação ao controle. Em relação a modulação de p38^{MAPK}, se observa na figura 59F que houve um aumento exacerbado na fosforilação de p38^{MAPK} a partir de 30 µg/mL, porém só a concentração de 100 µg/mL apresentou diferença estatística [$F_{(4,4)} = 5,209$; $p < 0,001$].

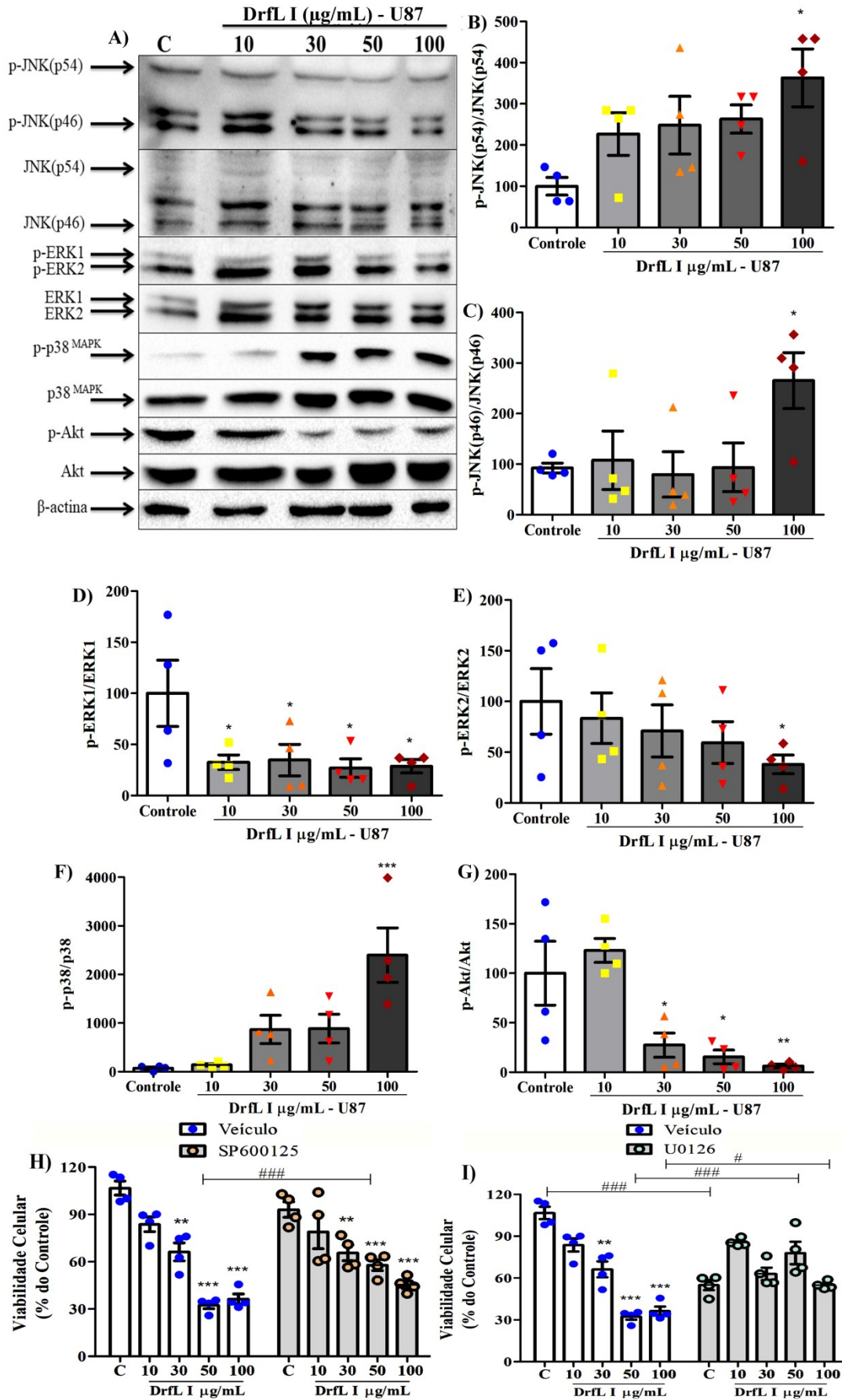
Paralelamente, como exibido na figura 59D, a lectina DrfL I teve a capacidade de reduzir a fosforilação de ERK1 a partir de 10 µg/mL [$F_{(4,4)} = 6,857$; $p < 0,05$], enquanto que ERK2 teve a fosforilação reduzida apenas frente a concentração de 100 µg/mL (Fig. 59E) [$F_{(4,4)} = 3,348$; $p < 0,05$]. Na figura 59G pode ser observado que houve uma aparente diminuição da fosforilação de Akt a partir de 30 µg/mL [$F_{(4,4)} = 1,475$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$].

Com a intenção de avaliar se as JNKs e ERKs estariam envolvidas no efeito citotóxico da lectina DrfL I nas células U-87 MG, já que ambas foram moduladas em resposta ao tratamento, as células foram pré-tratadas com seus inibidores para posteriormente comparar a resposta da viabilidade celular.

Nas figuras 59H-I observa-se que o pré-tratamento com SP600125 (inibidor de JNK) ou U0126 (inibidor de MEK1/2/ERK) limitou a ação citotóxica da lectina nas células U-87 MG. Na figura 59H verifica-se que o pré-tratamento com inibidor de JNK reduziu significativamente a citotoxicidade de DrfL I 50 µg/mL [$F_{(9,12)} = 5,348$; $p < 0,001$].

Com respeito as células pré-tratadas com U0126 (Fig. 59I) nota-se que o inibidor *per se* já induz uma queda na viabilidade celular quando comparado ao veículo [$F_{(9,12)} = 47,54$; $p < 0,01$]. Esse fato que pode estar relacionado à inibição da proliferação celular ocasionada pela inibição da via MEK/ERK pelo U0126. Em relação a ação da lectina nota-se que a citotoxicidade, normalmente observada no tratamento com DrfL I isolademanete nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento com U0126 [$F_{(9,12)} = 47,54$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente].

Figura 59. O tratamento com DrfL I nas células U-87 MG de glioma incrementa a fosforilação de JNK e p38^{MAPK}, enquanto diminui a fosforilação de Akt e ERK. A) Western blot representativo das células U-87 MG expostas ao veículo ou DrfL I por 24 h. A quantificação das proteínas é apresentada em B) JNKp54, C) JNKp46 D) ERK1, E) ERK2, F) p38^{MAPK} e G) Akt. Efeito dos inibidores de JNK e MEK1/2/ERK sobre a viabilidade celular medido pelo método de MTT. As células da linhagem U-87 MG foram pré-tratadas com H) 10 μ M de SP600125 (inibidor de JNK) por 7 h ou I) 10 μ M de U0126 (inibidor de ERK) por 30 min, após este período as células foram tratadas com a lectina por 24 h, sendo realizada uma comparação da viabilidade das células tratadas só com a lectina. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento somente com a lectina na mesma concentração.



9.3.4 O mecanismo de ação da DrfL I nas células U-87 MG é dependente de uma rede interconectada entre a ativação das proteínas relacionadas com autofagia e caspases-8.

Uma vez determinado que o tratamento com a DrfL I nas células U-87 MG causava modulação nas proteínas cinases, a seguir foi avaliado se poderiam estar sendo moduladas vias relacionadas a autofagia e apoptose em resposta ao tratamento.

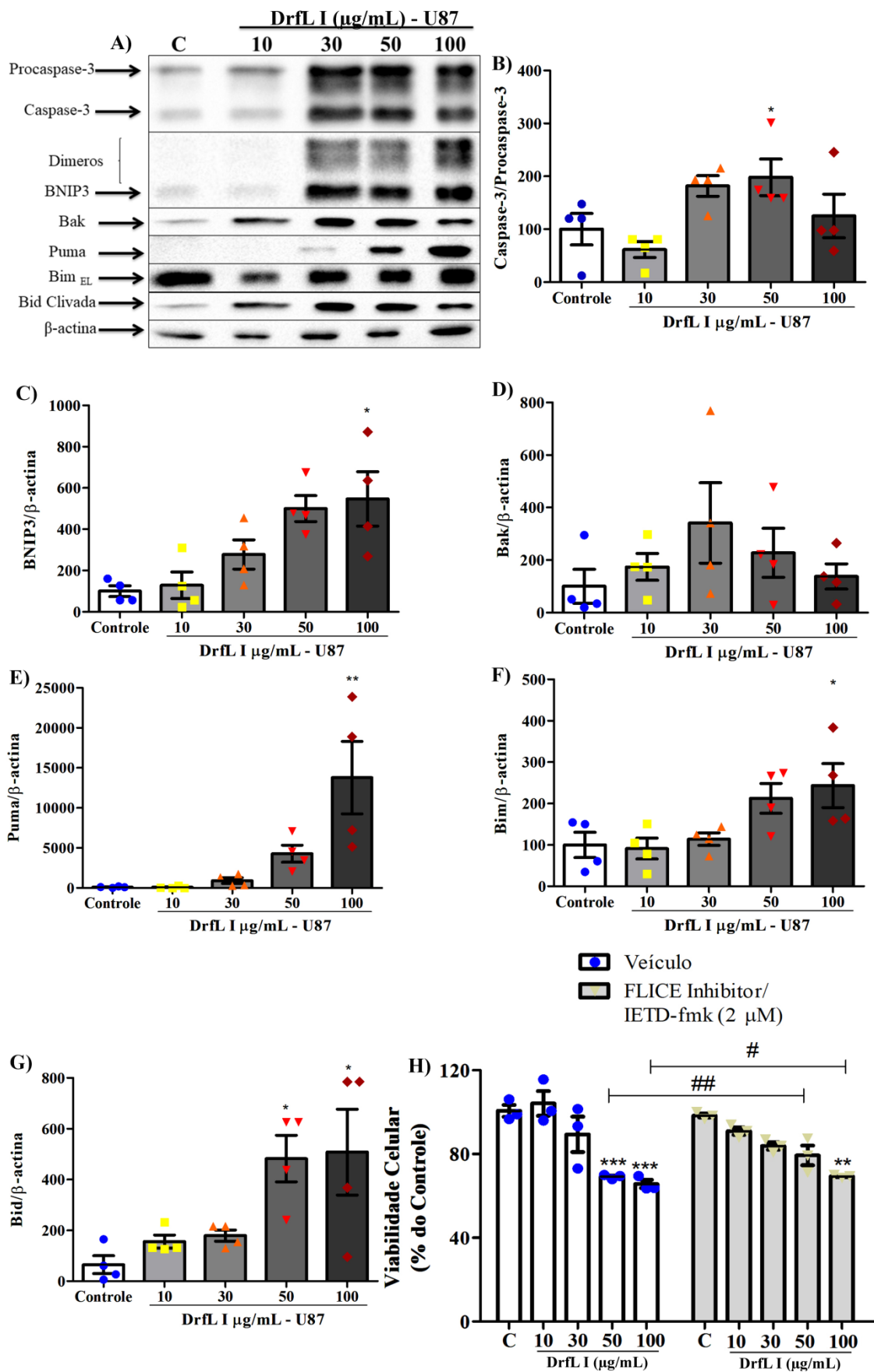
A figura 60 apresenta os resultados da análise da ativação da via apoptótica nas células U-87 MG frente ao tratamento com DrfL I. Na figura 60A é mostrado um representativo das proteínas da família Bcl-2 e caspase-3 frente ao tratamento por 24 h com DrfL I nas concentrações de 10-100 µg/mL.

Na figura 60B é mostrada a análise quantitativa da clivagem de procaspase-3 para caspase-3, sendo evidenciado um aumento aparente da clivagem a partir de 30 µg/mL. Porém, somente a concentração de 50 µg/mL apresentou diferença estatística com respeito ao controle [$F_{(4,4)} = 7,652$; $p < 0,05$]. Sendo importante ressaltar que não foi observada clivagem da caspase-3, ou seja, aparentemente ela não estaria sendo ativada nesta linhagem celular. Na figura 60C é observado um incremento de dimerização e na expressão proteica de BNIP3 em cerca de ~2 a 3 vezes a partir da concentração de 30 µg/mL, sendo que somente a concentração de 100 µg/mL apresentou diferença estatística em relação ao controle [$F_{(4,4)} = 2,399$; $p < 0,05$]. Não foi observada alteração significativa na expressão de Bak (proteína pró-apoptótica da família Bcl-2) comparado ao controle (Fig. 60D).

Com respeito as respostas das proteínas BH3-*only* da família Bcl-2, foi observado um incremento significativo da expressão de Puma (Fig 60E) na concentração de 100 µg/mL [$F_{(4,4)} = 1,551$; $p < 0,01$]. Porém, o incremento começa a ser aparente a partir da concentração de 30 µg/mL, entretanto, não obteve significância estatística. Além disso, num perfil similar foi observado um incremento significativo de ~5 vezes na clivagem de Bid (Fig 60G) nas concentrações de 50 e 100 µg/mL [$F_{(4,4)} = 6,255$; $p < 0,05$] e na expressão de Bim (Fig 60F) na concentração de 100 µg/mL [$F_{(4,4)} = 6,519$; $p < 0,05$].

Considerando estes dados, foi avaliado se estas respostas poderiam estar relacionadas como a ativação de caspase-8. Dessa forma, as células U-87 MG foram pré-tratadas com IETF-fmk, um inibidor de caspase-8. Na figura 60H observa-se que o efeito citotóxico da lectina DrfL I foi diminuído nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, quando comparado ao efeito da lectina na respectiva concentração sem a presença do inibidor [$F_{(9,12)} = 7,29$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$].

Figura 60. O mecanismo de diminuição da viabilidade celular da DrfL I nas células U-87 MG de glioma é dependente da ativação de Caspase-8. A) Western blot representativo das células U-87 MG expostas ao veículo ou DrfL I por 24 h. A quantificação das proteínas é apresentada em B) procaspase-3/caspase-3, C) BNIP3, D) Bak, E) Puma, F) Bim e G) Bid . H) Efeito do inibidor de Caspase-8 (IETF-fmk) na viabilidade celular medido pelo método de MTT. As células da linhagem U-87 MG foram pré-tratadas com 2 μ M do inibidor de caspase-8 por 6 h, após o período às células foram tratadas com a lectina por 24 h, sendo realizada uma comparação da viabilidade das células tratadas só com a lectina. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com lectina somente na mesma concentração.



Após avaliar a modulação, pela lectina DrfL I, das proteínas da família Bcl-2 e de caspases, bem como o possível envolvimento destas proteínas na diminuição de viabilidade das células U-87 MG, foi realizado uma investigação da modulação do processo autofágico e seu possível envolvimento no mecanismo citotóxico de DrfL I.

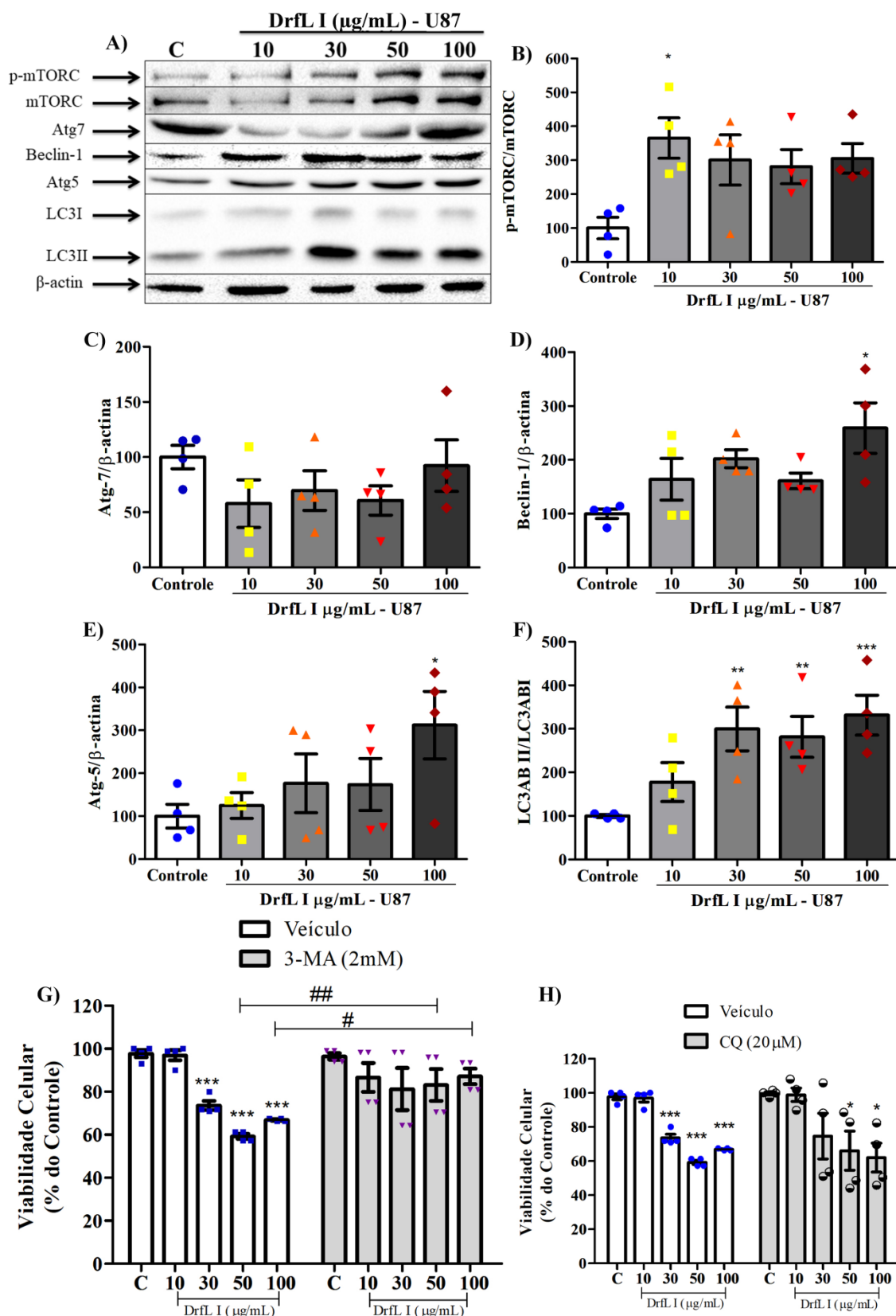
A figura 61 mostra os resultados da análise da modulação de proteínas associadas ao processo autofágico nas células U-87 MG frente o tratamento com DrfL I. A figura 61A mostra um WB representativo do complexo 1 de mTOR e de diversas proteínas relacionadas com a autofagia frente ao tratamento por 24 h com DrfL I nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g/mL}$.

Como se observa na figura 61B nas células tratadas houve um incremento de ~ 3 vezes na fosforilação de mTORC1, porém a diferença estatística só foi observada na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ [$F_{(4,4)} = 1,306$; $p < 0,05$] quando comparado com o controle. Com respeito às proteínas relacionadas com autofagia ocorreu um aumento na expressão de Beclin-1 (Fig. 61D) [$F_{(4,4)} = 0,1942$; $p < 0,05$] e de Atg-5 (Fig. 61E) [$F_{(4,4)} = 5,581$; $p < 0,05$] na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Notavelmente, houve um incremento de 2 até 3 vezes na clivagem de LC3I para LC3II (Fig. 61F) a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ [$F_{(4,4)} = 6,816$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$]. A expressão de Atg-7 não foi alterada pelo tratamento com lectina como mostrado na figura 61C.

Com a finalidade de identificar o papel do processo autofágico na indução de morte celular induzida pela lectina, as células foram pré-tratadas com 3-MA ou CQ. A figura 61G indica que o efeito citotóxico induzido pelas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I foram bloqueados pela inibição dos primeiros passos da autofagia com 3-MA [$F_{(9,12)} = 1,661$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$], respectivamente. No entanto, a figura 61F mostra que o bloqueio da formação do autofagolisossomo com CQ não ocasiona uma proteção significativa frente ao efeito citotóxico da lectina.

Figura 61. O mecanismo de ação da DrfL I para levar a morte nas células U-87 MG de glioma é dependente da ativação do processo autofágico.

A) Western blot representativo das células U-87 MG expostas ao veículo ou DrfL I por 24 h, quantificação das proteínas B) mTORC, C) Atg-7, D) Beclin-1, E) Atg-5 e F) LC3. Efeito dos inibidores de autofagia na viabilidade celular medido pelo método de MTT. As células da linhagem U-87 MG foram pré-tratadas com G) 2 mM de 3-MA por 1 h ou H) 20 μM de CQ por 72 h, após o período às células foram tratadas com a lectina por 24 h, sendo realizada uma comparação com a viabilidade das células tratadas somente com a lectina. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado como 100%) e os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com lectina somente e na mesma concentração.



Levando em consideração que o efeito citotóxico da lectina era bloqueado quando as células eram pré-tratadas com 3-MA e IETF-fmk, resolvemos corroborar se poderiam existir

mecanismos de comunicação entre essas vias. Para isso, as células foram previamente tratadas com estes inibidores e posteriormente co-tratadas com 50 µg/mL de DrfL I.

A figura 62A mostra a modulação da proteína p38^{MAPK}, de proteínas associadas a autofagia (Atg-5 e LC3) e apoptose (Bim, Bid e BNIP3), frente ao tratamento com DrfL I somente ou juntamente com os inibidores.

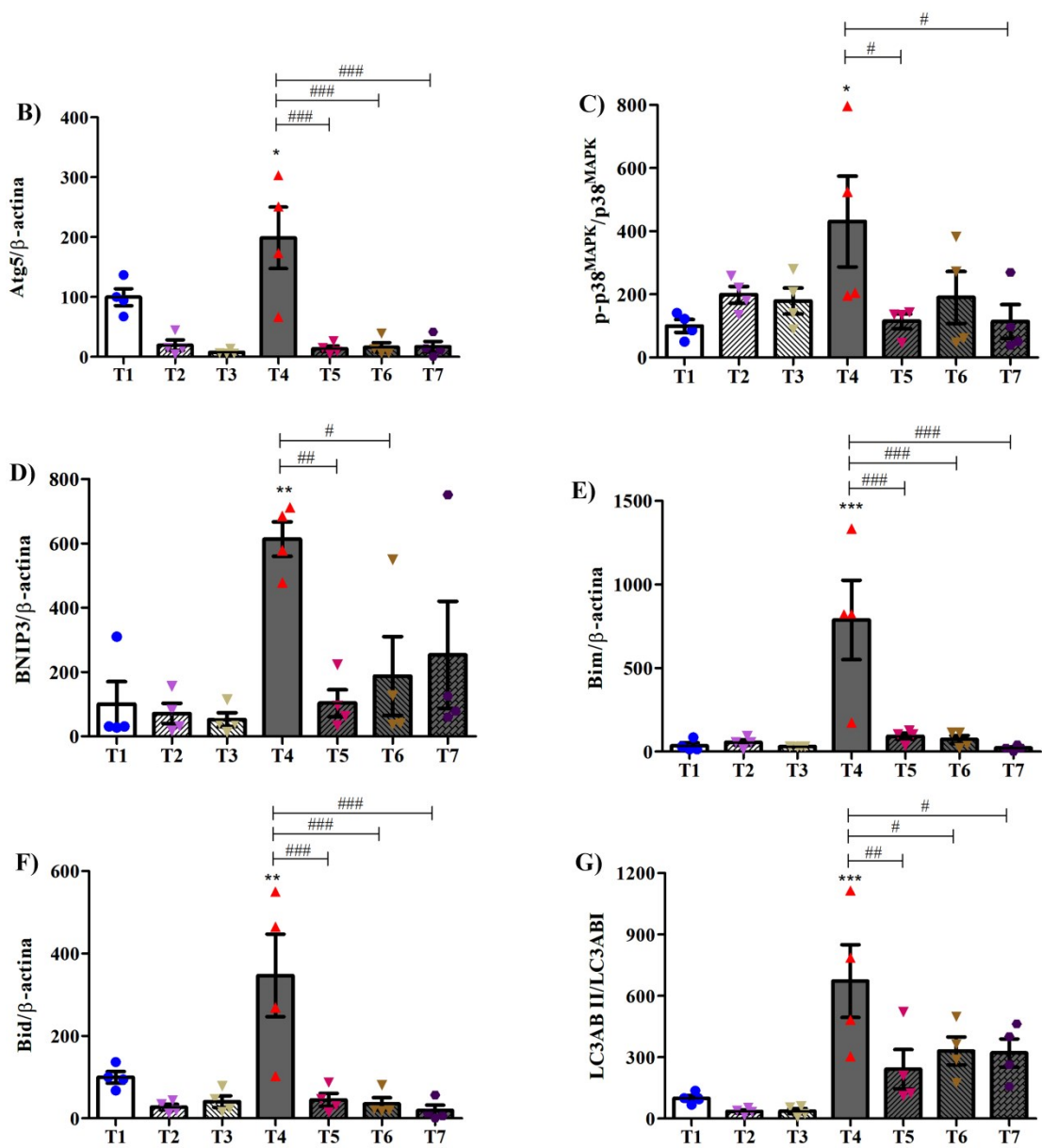
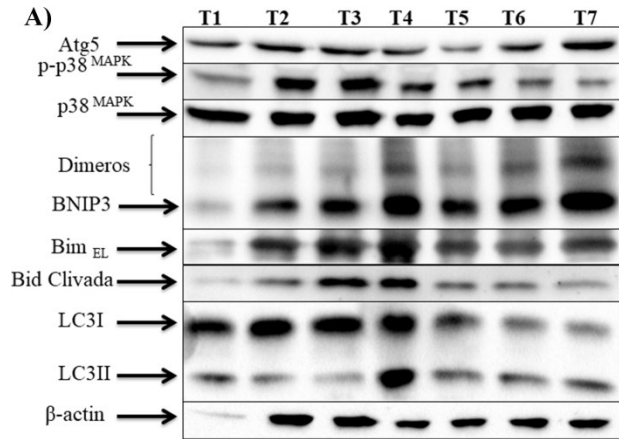
Pode ser observado que o tratamento com DrfL I promoveu aumento da fosforilação de p38^{MAPK} (Fig. 62C), da expressão de Atg5 (Fig. 62B) e da clivagem de LC3 (Fig. 62G). Além disso, elevou a expressão de Bim (Fig. 62E), Bid (Fig. 62F) e BNIP3 (Fig. 62D). Notavelmente, 3-MA preveniu todos estes efeitos (Fig. 62B-G). O inibidor de caspase 8 (IETF-fmk) também foi capaz de prevenir todos os efeitos de DrfL I, exceto a ativação de p38^{MAPK}, que foi apenas parcialmente diminuído (Fig. 62B-G). A combinação dos dois inibidores não apresentou nenhum efeito adicional ao já observado com 3-MA, em relação a prevenção da ação de DrfL I (Fig. 62B-G).

Estes resultados indicam que existe uma comunicação entre o processo de autofagia e a via apóptica extrínseca no mecanismo de ação da lectina DrfL I.

Figura 62. A DrfL I nas células U87 produz um mecanismo de *crosstalk* entre a ativação de caspase-8 e degradação autofágica. As células U87 foram pre-tratadas por 6 h com 2 µM de IETF-fmk, 1 h com 3-MA ou ambos os inibidores. Após esse período foram co-incubadas com 50 µg/mL de DrfL I por 24 h. A) Western blot representativo das células U87 expostas aos tratamentos por 24 h. A quantificação das proteínas é mostrada em B) Atg-5, C) p38^{MAPK}, D) BNIP3, E) Bim, F) Bid e G) LC3. Os dados são expressos em relação ao controle (considerado 100%) e os valores são representados como média ± E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento somente com lectina na mesma concentração.

Tratamiento

- T1= Controle
- T2= 3-MA
- T3= IETD-fmk
- T4= 50 µg/mL DrfL I
- T5= 3-MA + 50 µg/mL DrfL I
- T6= IETD-fmk + 50 µg/mL DrfL I
- T7= Cotratamiento (T5+T6)



9.4 Mecanismos de ação biológica da lectina DrfL I sobre as células GBM1 de glioblastoma humano

9.4.1 A perda de adesão celular e redução da viabilidade celular das células GBM1 estão associadas à formação de organelas vesiculares ácidas

A figura 63 mostra a resposta das células GBM1 frente ao tratamento com 10, 30, 50 e 100 µg/mL de DrfL I por 24 h.

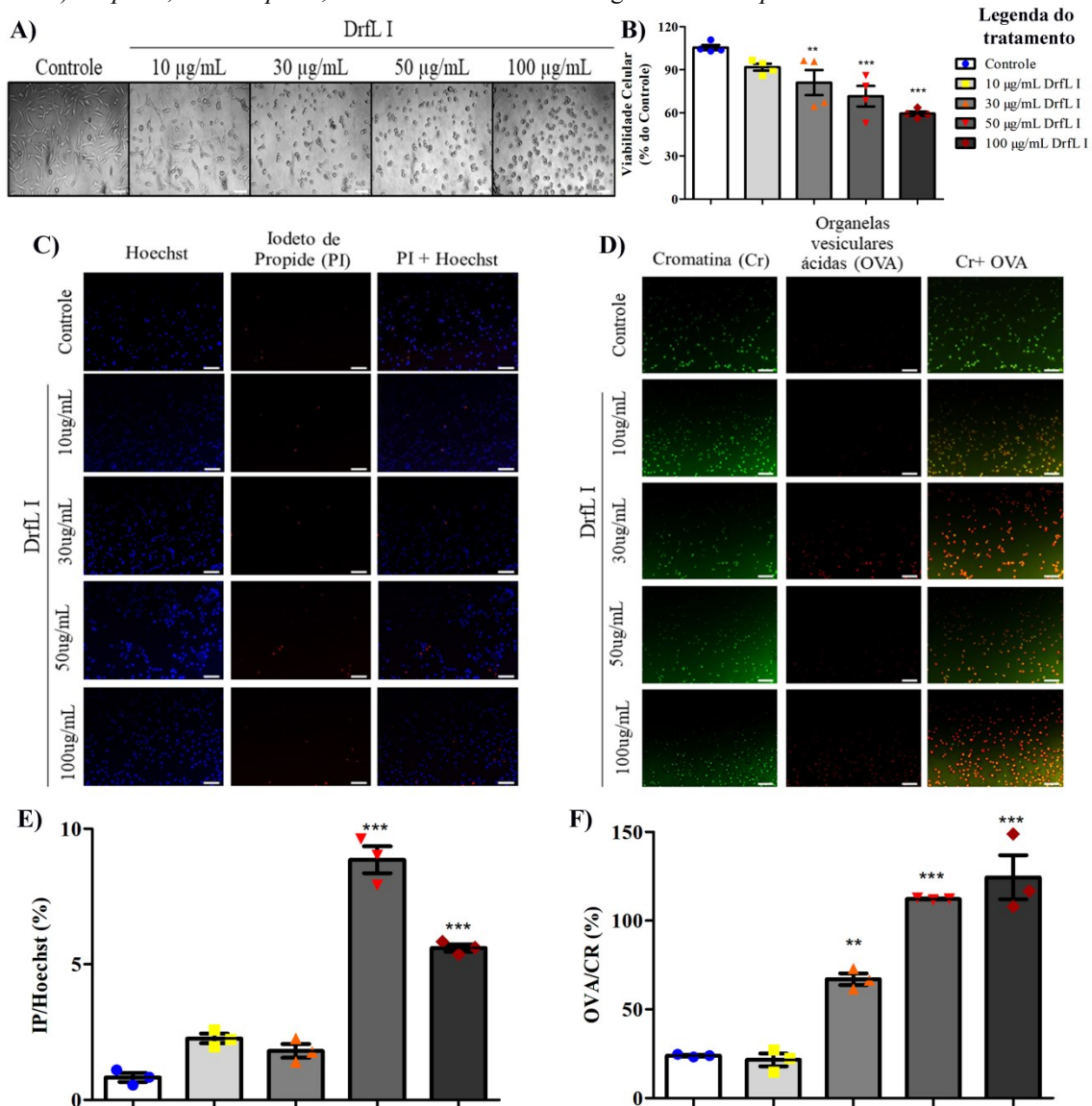
Pode ser visualizado na figura 63A que a concentração de 10 µg/mL causou retração dos prolongamentos citoplasmáticos das células. As concentrações mais elevadas da lectina, especialmente 50 e 100 µg/mL, promovem perda de adesão celular, mudança de uma morfologia plana, característica da linhagem, para uma morfologia esférica, com células de formato redondo e descoladas do fundo da placa.

As mudanças morfológicas, com perda de adesão celular, foram acompanhadas por uma redução da viabilidade celular, medida pelo método do MTT. Como mostra a figura 63B, DrfL I induziu uma queda significativa na viabilidade das células comparada ao controle a partir da concentração de 30 µg/mL como uma redução de 20% [$F_{(4,12)}= 5,336$; $p < 0,01$] e mais de 30% de redução da viabilidade nas concentrações mais elevadas de 50 e 100 µg/mL [$F_{(4,12)}= 5,336$; $p < 0,001$].

Com o propósito de relacionar as alterações morfológicas com prejuízos na membrana celular, realizou-se a coloração com IP. Porém como se observa na figura 63C-E apenas nas concentrações mais elevadas de 50 e 100 µg/mL de DrfL I ocorre um pequeno aumento que na marcação de IP e que não ultrapassa 10% [$F_{(4,3)}= 0,2527$; $p < 0,001$].

Finalmente, realizamos a coloração com LA para investigar se o processo autofágico poderia estar sendo ativado nas células GBM1 em resposta ao tratamento com DrfL I. Nas figuras 63D-F pode se observar que houve um aumento de 80% na marcação de OVA na concentração de 30 µg/mL [$F_{(4,3)}= 0,907$; $p < 0,01$]. As concentrações de 50 e 100 µg/mL promovem um aumento na marcação ainda mais intenso e que se aproxima de 100% [$F_{(4,3)}= 0,907$; $p < 0,001$].

Figura 63. O tratamento com DrfL I alterou a viabilidade celular e induziu a formação de organelas vesiculares ácidas nas células GBM1. Células de cultura primária de GBM (GBM1) foram expostas ao veículo (Tampão HEPES-salina, controle) ou DrfL I nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da DrfL I na morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. B) Viabilidade celular frente ao tratamento com DrfL I medido pelo método da redução do MTT. Foram realizados quatro experimentos em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100 %). Após o período de tratamento as células foram coradas com C) Iodeto de Propídeo e Hoechst ou D) Laranja de Acridina para posteriormente serem visualizadas através de microscopia de fluorescência com auxílio do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. Barra de escala representa 100 μm . As fluorescências da coloração com E) IP/ Hoechst ou F) LA dos diferentes tratamentos foram quantificados e expressados em porcentagem dos valores absolutos obtidas de cada tratamento (N=3 em triplicata). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.

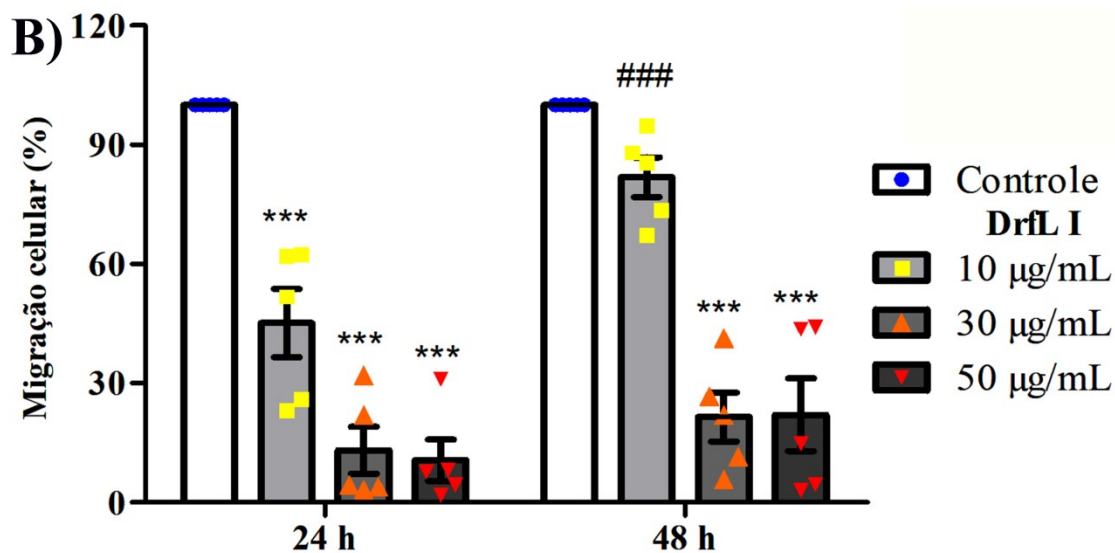
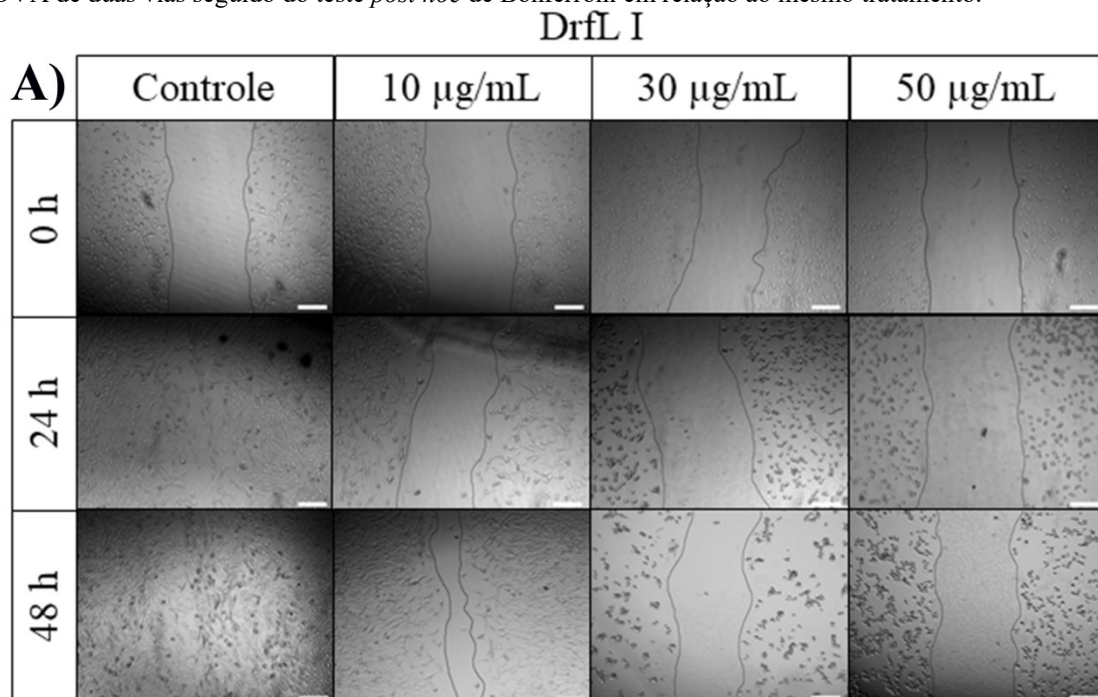


9.4.2 A DrfL I diminui a capacidade migratória das células GBM1

Com o intuito de verificar se a lectina DrfL I nas células GBM1 também possui um efeito citostática diminuindo a capacidade migratória destas células, foi realizado o ensaio de migração pela metodologia do “scratch”.

A figura 64 mostra o efeito da lectina DrfL I na migração celular das células GBM1. Como se aprecia na figura 64A, um representativo do efeito do tratamento em cada tempo testado, nas células expostas ao veículo (controle) há um aumento da densidade celular chegando ao fechamento da fissura ou risco em 24 h. Na quantificação dos resultados, apresentada na figura 64B, verifica-se que as células GBM1 tratadas com DrfL I tiveram uma queda na sua capacidade migratória, apresentando uma redução na migração/proliferação de 40% na concentração de 10 µg/mL [$F_{(3,5)} = 3,602$; $p < 0,001$] e de 80% frente às concentrações de 30 e 50 µg/mL [$F_{(3,5)} = 3,602$; $p < 0,001$] comparadas ao controle. A concentração de 10 µg/mL apresentou diminuição na sua eficiência de inibição da migração no período de 48 h de tratamento [$F_{(3,5)} = 3,602$; $p < 0,001$]. Ainda assim, cabe destacar que todas as concentrações de DrfL I testadas continuam exercendo inibição no período de 48 h.

Figura 64. O tratamento com DrfL I possui efeito citostático nas células GBM1. Células GBM1 de glioblastoma foram tratadas com veículo ou DrfL I nas concentrações 10, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo a migração analisada nos tempos 0, 24 e 48 h. Os dados são expressos em porcentagem de fechamento do risco. Os valores são representados como média \pm E.P.M. de quatro experimentos realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao controle. ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao mesmo tratamento.



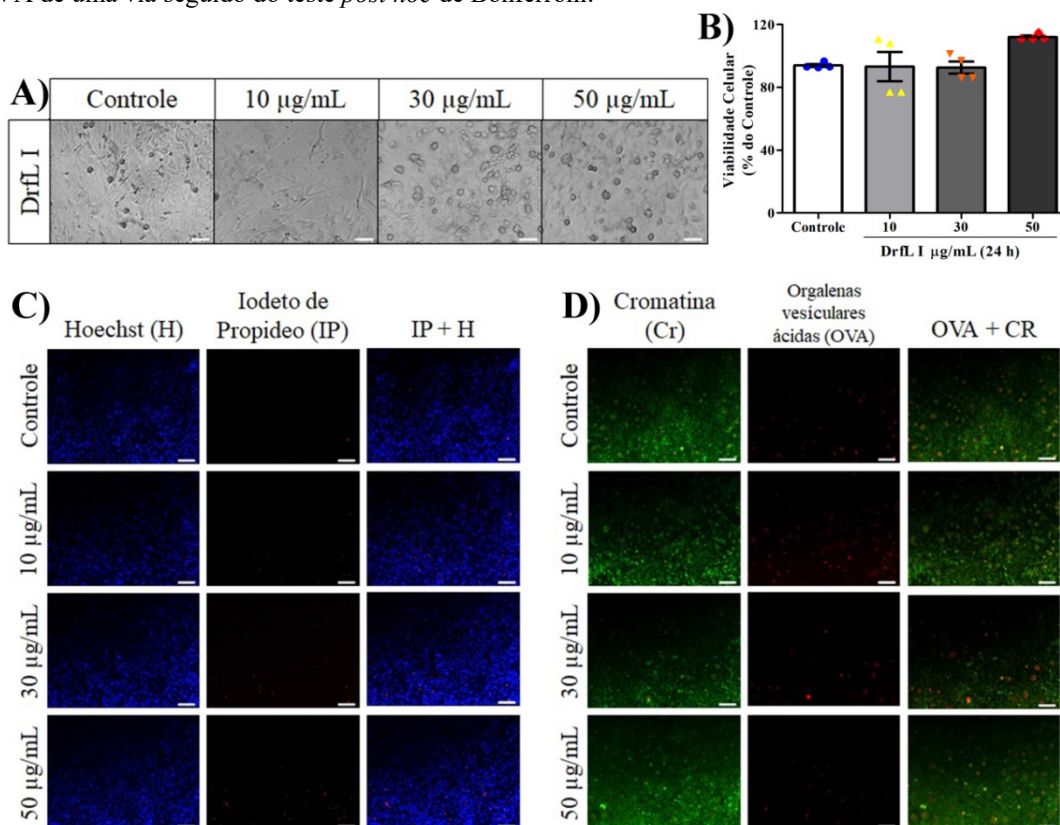
9.5 Teste de especificidade citotóxica da lectina DrfL I

Por último, para examinar se a lectina DrfL I possuiria efeito citotóxico em células gliais normais (sadias), foram realizados estudos em cultura primária de astrócitos corticais de ratos; estas culturas foram expostas aos tratamentos por 24 h, com veículo ou 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DrfL I, sendo esses dados apresentados na figura 65.

Como se observa nas figuras 65A-B a lectina não teve a capacidade de alterar a morfologia, nem diminuir a viabilidade celular. Assim como não foi detectada uma marcação aumentada para IP e LA (Fig 65C-D).

Este conjunto de dados sugerem que a lectina DrfL I possui um efeito citotóxico seletivo sobre as células de glioma.

Figura 65. O tratamento com DrfL I não alterou a viabilidade de astrócitos sadios de cultura primária. Células de cultura primária de astrócitos sadios foram expostas ao veículo (Tampão Hebes-salina, controle) ou DrfL I nas concentrações de 10, 30 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 h. A) Microscopia óptica mostrando o efeito da DrfL I na morfologia das células expostas aos diferentes tratamentos. B) Viabilidade celular frente ao tratamento com DrfL I medido pelo método da redução do MTT. Após o período de tratamento as células foram coradas com C) Iodeto de propídeo e Hoechst ou D) Laranja de Acridina para posteriormente serem visualizadas através de microscopia de fluorescência com auxílio do microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. Barra de escala representa 100 μm . Foram realizados quatro experimentos em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100 %). ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



10 Discussão e conclusão dos resultados obtido no Capítulo II: “Mecanismo de ação biológica da lectina DrfL I em modelos celulares”

Neste Capítulo II demonstramos pela primeira vez que a lectina DrfL I mediante o reconhecimento e ligação reversível a glicanos específicos da superfície celular, promove inibição da migração/adesão celular e da eficácia clonogênica, diminuindo a viabilidade celular nas células de glioma mediante um mecanismo de comunicação que envolve a ativação de caspase-8 e o processo de autofagia. Outra vantagem do tratamento com DrfL I, aqui demonstrada, foi a ausência de estresse em astrócitos corticais saudáveis.

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo de glioma mais agressivo e de maior ocorrência dentre os tumores cerebrais e do sistema nervoso central (14,6% de todos os tumores e 48,3% dos tumores malignos) (OSTROM *et al.*, 2020, 2019). As células de GBM caracterizam-se por apresentar mutações genéticas que afetam vias de sinalização celular envolvidas na proliferação celular, sobrevivência, invasão e angiogênese (BATASH *et al.*, 2017). A massa tumoral destaca-se por apresentar resistência à quimioterapia e radioterapia, juntamente com a presença de células tronco de glioma ou “*glioma stem cells*” (GSC) que conferem a capacidade de multipotencialidade e habilidade de autorenovação (CHALMERS *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2017; HEYNCKES *et al.*, 2019). Essas características tornam o prognóstico clínico muito desfavorável, não ultrapassando os 15 meses de vida, mesmo com terapia, sendo ainda acompanhado de devastadores declínios neurocognitivos (ACHARYA *et al.*, 2010, 2011).

Nos últimos anos, as lectinas têm sido utilizadas como ferramentas para diferenciação entre tumores malignos e benignos, pela sua capacidade de reconhecer padrões específicos de glicosilação, associados a processos metastáticos (BHUTIA *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2015; MAO *et al.*, 2012; MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2020).

Com base nesses achados da literatura, nosso grupo tem demonstrado efeito citotóxico de diferentes lectinas de leguminosas da subtribo *Diocleinae*, incluindo aquelas purificadas de *Canavalia virosa* (ConV), *Canavalia bonariensis* (CaBo), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Dioclea lasiophylla* (DlyL), *Dioclea lasiocarpa* (DLL), e *Dioclea violacea* (DVL) nas linhas celulares de glioma C6 e U-87 MG (CAVADA *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2018; NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2018, 2019; NASCIMENTO, KYRIA SANTIAGO *et al.*, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017; WOLIN, INGRID A.V. *et al.*, 2021). Ao longo destes estudos, foi possível observar que embora estas lectinas apresentem uma similaridade estrutural de mais de 80%, seus efeitos em testes

biológicos são distintos para alguns parâmetros. Assim, a DrfL I se apresentou com maior eficiência em inibir a migração, adesão, sobrevivência e proliferação celular na linhagem U-87 MG, quando comparada com as lectinas ConA e DVL na mesma linhagem (NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2019). Além disso, DrfL I também teve maior capacidade de diminuir a viabilidade das células C6 e GBM1 em comparação ao efeito observado frente ao tratamento com a lectina ConBr (WOLIN, INGRID A.V. *et al.*, 2021).

Os três modelos celulares de glioma (C6, U-87 MG e GBM1) responderam frente ao tratamento com DrfL I. As alterações incluíram, perda de aderência celular e modificação das células de uma morfologia plana para esférica, sendo este evento acompanhado de uma diminuição na viabilidade celular (Fig. 44). As células C6 apresentaram-se mais sensíveis ao tratamento, considerando a retração dos prolongamentos citoplasmáticos a partir de 3 h de exposição a 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e uma queda de mais de 50% da viabilidade celular após 12 h de tratamento (Fig. 45). Porém, nas células U-87 MG, que se apresentaram mais resistentes ao tratamento, foi observada uma perda da adesão celular a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h de tratamento, acompanhado de uma queda de viabilidade em mais de 40% (Fig. 54). À vista disso, é importante ressaltar que ConBr não causou uma diminuição da viabilidade celular na linhagem U-87 MG, mesmo em concentrações mais altas (ver capítulo I). Além disso, nossos resultados publicados anteriormente demonstraram que nas mesmas condições, DvL também promoveu a diminuição da viabilidade celular somente depois de 24 h de tratamento, enquanto ConA, na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, somente promoveu ação citotóxica contra as células U-87 MG após períodos maiores (48 e 96 h) de tratamento (NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2019).

A estrutura cristalográfica da DrfL I revela que diferente da ConA esta lectina possui uma histidina na posição 131 (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017). Na literatura não há estudos em relação ao possível efeito antitumoral da lectina DrfL I, porém, recentemente mediante a técnica de simulação por “*docking*” demonstrou-se que a DrfL I possui a habilidade de interagir fortemente com manose e liga-se à N-glicanos presentes nos resíduos de glicoproteínas e glicoconjugados da superfície celular, com a mesma intensidade ao observado com as lectinas CaBo, DlyL e DLL (CAVADA *et al.*, 2019a). Nesse sentido, foi demonstrado recentemente por nosso laboratório que estas lectinas apresentaram efeitos citotóxicos na linhagem C6 (CAVADA *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2018; NASCIMENTO, KYRIA SANTIAGO *et al.*, 2017). No entanto, apesar de essas lectinas apresentarem a mesma força de interação com os resíduos glicosilados, DrfL I é mais citotóxica para as células C6

quando comparado com os resultados obtidos com CaBo, DlyL e DLL (CAVADA *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2018; NASCIMENTO, KYRIA SANTIAGO *et al.*, 2017).

Notavelmente, a concentração mais baixa de DrfL I (10 µg/mL) não foi citotóxica nos modelos de glioma estudados, porém ocasionou uma diminuição na capacidade de migração/proliferação nas células de GBM1, avaliada pelo método de “*scratch*” (Fig. 64B). Esse tipo de ação já tinha sido observado nas linhagens celulares C6 e U-87 MG, em estudo anterior apresentado em dissertação de mestrado (WOLIN, INGRID ALESSANDRA VICTORIA, 2017). Além disso, o nosso ensaio de migração no “*transwell*” de células das linhagens C6 (Fig. 46B) e U-87 MG (Fig. 56B), confirmou que os resultados anteriores da ação de DrfL I, obtidos no ensaio de migração por “*scratch*”, se relacionam realmente à capacidade da lectina de reduzir a migração e não simplesmente a proliferação celular.

Uma característica importante a ser ressaltada das células de GBM é sua frequente recidiva pós-cirurgia, e sua alta resistência à quimioterapia e radioterapia (AROUI *et al.*, 2016; PONTES *et al.*, 2012; THEELER; GILBERT, 2015). Sendo esta multipotencialidade e habilidade de auto-renovação relacionada à presença de GSCs (LIU; SONG, 2016; SANAI; ALVAREZ-BUYLLA; BERGER, 2005).

As culturas tumorais no formato esferoide ou 3D são culturas automontadas de células tumorais, no qual as interações células-célula predominam sobre as interações célula-MEC (SANT; JOHNSTON, 2017). Essas culturas caracterizam-se por apresentar várias camadas, que incluem: células das camadas externas, que possuem acesso aos nutrientes, oxigênio e capacidade de proliferação; camada intermediária, compostas por células senescentes; núcleo do esferoide, que é principalmente necrótico. Notavelmente, essas diferentes camadas apresentam diferentes gradientes de oxigênio, nutrientes, pH e capacidade proliferativa (SOUBÉLAN; TCHOGHANDJIAN, 2020). Estas tumoresferas apresentam marcadores de células tronco pré-metastáticas e mesenquimais, tais como: ATXN1, ALCAM, CD9, ITGA7, CD44 e CHI3L1. Além disso, expressam a enzima MGAT5 que influencia na adesão e migração celular (MARHUENDA *et al.*, 2021).

Utilizando este modelo, demonstramos que o tratamento (24-120 h) com DrfL I (50 µg/mL) retarda a adesão das células ao substrato, causa diminuição do deslocamento celular, bem como promove alterações na morfologia das células proliferativas que conseguem se diferenciar e migrar (Fig 57B). Não obstante, as tumoresferas tratados com 100 µg/mL parecem não se recuperar, além de ocorrer um grande comprometimento na integridade da MEC. Essa observação difere da ação de ConBr (Fig. 16B) que nestas mesmas condições, quando comparada ao controle, apenas retardou a capacidade das tumoresferas de aderir ao

substrato para permitir a repopulação, evidenciando assim uma menor eficiência de ConBr em relação ao tratamento com DrfL I.

As células no formato 3D produzem uma MEC organizada, mais compacta no núcleo, composta por fibronectina, colágeno e glicosaminoglicanos (SOUBÉLAN; TCHOGHANDJIAN, 2020). As interações célula-MEC são mediadas pelas integrinas, que da mesma forma que proteínas do microambiente extracelular sofrem modificações pós-traducionais de glicosilação. Dessa forma, elas apresentam estruturas oligossacarídicas ramificadas (N e O ligadas) e polissacarídeos lineares (glicosaminoglicanos) (MARSICO *et al.*, 2018). Estes glicocomponentes estão mutuamente envolvidos na regulação de processos fisiológicos e tumorigênicos, favorecendo processos de migração, invasão e metástase (FIANCO; CENCI; BARILÀ, 2016; OH; SUN, 2021). Porém, tem sido amplamente relatado na literatura que a rigidez da MEC pode influenciar as mudanças morfológicas e a migração celular em vários tipos de tumores, entre eles no GBM (MARHUENDA *et al.*, 2021; WINKLER *et al.*, 2020).

Nos processos de invasão e migração as células estão física e funcionalmente ligadas mediante as caderinas, que são proteínas dependentes de cálcio e indispensáveis na morfogênese e remodelação de tecidos. Por outro lado, as integrinas medeiam a adesão celular à MEC (JANISZEWSKA; PRIMI; IZARD, 2020). Em função desta organização a MEC é vista como uma rede de sinalização chave no processo tumorigênico e/ou de metástase e está ganhando cada vez mais importância em novas abordagens terapêuticas.

As proteínas transmembrana integrinas, representam uma subfamília de glicoproteínas composta por 18 subunidades α e 8 subunidades β que se associam em 24 diferentes heterodímeros, incluindo $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$. Estas proteínas proporcionam proteção celular frente à apoptose e *anoikis*, conferindo às células cancerígenas mecanismos de quimiorresistência, mediante a ativação de cascatas de sinalização envolvidas na sobrevivência celular incluindo FAK, Src, ILK (do inglês, *integrin-linked kinase*), PI3K/Akt e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013). Porém, quando ocorre perda de adesão celular este efeito protetor das integrinas pode ser perdido.

Outro ponto de regulação importante da sobrevivência celular envolve caspase-8, onde a desregulação de sua ativação ou perda de expressão é frequente nas células cancerígenas de glioblastoma, neuroblastoma e medulablastoma, favorecendo mecanismo de escape da apoptose e sendo associado a malignidade e a processos de metástase. Porém, foi observado que a ativação de algumas vias como RIPK1/Src/STAT3, Akt/p38^{MAPK}/ERK e

Rac1/PI3K/Akt, de maneira dependente de TRAIL, favorecem a migração e invasão das células cancerígenas insensíveis ao mecanismo de apoptose dependente de TRAIL (BUONFIGLIOLI; HAMBARDZUMYAN, 2021; GUAN *et al.*, 2018a; MARSICO *et al.*, 2018; OH; SUN, 2021).

O tratamento com DrfL I tanto nas células C6 (Fig. 47) quanto nas células U-87 MG (Fig. 59) causou um aumento na fosforilação de JNKs e p38^{MAPK} juntamente com inibição de ERKs e Akt. Dados da literatura demonstraram que a perda de adesão celular provoca um acúmulo de Bim no citosol, mediante a inibição da degradação proteossomal ativada pela defosforilação de ERK e da inibição da via de sinalização PI3K/Akt, responsável pela fosforilação de Bim para sua liberação do complexo do citoesqueleto (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013). Assim, em conjunto com outras proteínas da subfamília BH3, como por exemplo Puma (que podem ser reguladas pela ativação de p53 frente ao estresse) Bim poderia ativar a via apoptótica intrínseca (NAKANO; VOUSDEN, 2001). Adicionalmente, o fator modificador de Bcl-2 (Bmf), que faz parte do complexo motor miosina V, é capaz de detectar danos no citoesqueleto e então se translocar à mitocôndria para induzir a liberação do citocromo c, ativando a cascata de sinalização apoptótica (AKHTER *et al.*, 2018; TAN, B S *et al.*, 2015; WHELAN *et al.*, 2010).

Porém, os nossos dados tanto no modelo da linhagem C6 (Fig. 49) como na linhagem U-87 MG, não apresentaram ativação de caspase-3 ou incremento significativo na expressão de Bak em resposta a lectina. Corroboram com estes achados os dados apresentados na figura 50, que revela que as mitocôndrias das células C6, após serem expostas por 6 h a DrfL I, não tiveram alteração no potencial mitocondrial, bem como a observação de queda na produção de ERO pelo tratamento com DrfL I (Fig. 52). Esses dados concordam com os observados frente ao tratamento com ConBr (WOLIN, INGRID A.V. *et al.*, 2021), porém são diferentes do observado nas células tratadas com ConA, em que é observado queda do potencial de membrana (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2011; NASCIMENTO, ANA PAULA M. *et al.*, 2018, 2019).

Existem evidências na literatura demonstrando que várias proteínas podem se ligar à proteína LC3 mediante um motivo específico de interação a LC3 (LIR) (ASHRAFI; SCHWARZ, 2013; YOULE; NARENDRA, 2011). Entre elas podemos mencionar BNIP3, Nix, Puma, FUNDC1, VDAC1, PINK1, BCL1L13 (CHINNADURAI; VIJAYALINGAM; GIBSON, 2008; PANDA *et al.*, 2018; PRATT; ANNABI, 2014). BNIP3, por exemplo, pode ativar autofagia em condições de hipóxia em resposta ao fator indutor de hipóxia (HIF)-1 α , sendo esse processo relacionado a uma forma de resistência ao estresse (CHINNADURAI;

VIJAYALINGAM; GIBSON, 2008), ou ainda pela supressão da sinalização de mTORC1 pode mediar a morte celular pela via autofágica (PRATT; ANNABI, 2014). Puma, pode ativar o processo de mitofagia como resultado do aumento nos níveis de ERO e estresse do RE (PANDA *et al.*, 2018). Dessa forma, os processos autofágicos e apoptóticos podem estar interconectados por ATGs que podem ser reconhecidas e clivadas por caspases e dessa forma, podem ativar o processo autofágico, ou ao contrário, deslocar o perfil na direção da apoptose (BOOTH *et al.*, 2014; HOU *et al.*, 2010; LALAOUI *et al.*, 2015; OKADA; MAK, 2004; TREJO-SOLÍS *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2014). Alguns estudos demonstram que a clivagem de Beclin-1, ATG5, ATG4D associada à apoptose pode resultar na abolição da autofagia citoprotetora, associada a reprogramação metabólica das células cancerígenas (DEVENPORT *et al.*, 2021; DJAVAHERI-MERGNY; MAIURI; KROEMER, 2010).

No nosso estudo foi evidenciado que DrfL I induz a clivagem da LC3 tanto nas células C6 (Fig. 53) quanto na U-87 MG (Fig. 61), conjuntamente com a modulação das proteínas relacionados ao processo autofágico, entre elas, Atg-5, Atg-7 e Beclin-1, bem como causa aumento na formação de OVA nas células C6 (Fig. 51) e nas células GBM-1 (Fig. 63).

Além disso, nossos resultados documentaram uma possível comunicação entre a ativação da caspase-8 e o processo de autofagia, demonstrado mediante o pré-tratamento com 3-MA e IETF-fmk nas células U-87 MG (Fig. 62). Os resultados indicam que ambos inibidores neutralizaram parcialmente a citotoxicidade induzida pela DrfL I, avaliado pelo método de MTT, da mesma forma que anularam a indução do incremento do imunocontéudo de Atg-5, p38^{MAPK}, Bim, Bid e LC3 produto do tratamento por 24 h com DrfL I. No conjunto nossos resultados sugerem que: i) DrfL I promove autofagia; ii) este processo parece mediar o efeito citotóxico da DrfL I nas células de glioma; iii) DrfL I promove o aumento de proteínas da subfamília pró-apoptótica (BH3), especialmente Bim e Bid, essenciais na ativação da cascata programada de *anoikis* (pela perda de adesão à MEC), bem como Puma e BNIP3 (sensíveis ao estresse citosólico); iv) estes eventos são parcialmente dependentes da via autofágica e da ativação de caspase-8.

Finalmente, pode ser sugerido que DrfL I exibe seletividade citotóxicas em células cancerígenas, uma vez que as culturas primárias de astrócitos não demonstraram alterações aparentes em resposta ao tratamento com a lectina (Fig. 65). Tal seletividade pode ser atribuída a expressão de alvos glicosilados nas células cancerígenas, mas não nas células normais (LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013). Por conseguinte, é razoável hipotetizar que a seletividade da DrfL I sobre as células de glioma resulta da sua capacidade de reconhecer um padrão de glicosilação alterado na superfície da célula tumoral, sendo este

efeito dependente da integridade da estrutura terciária/quaternária da lectina e do domínio de ligação a carboidratos (Fig. 55).

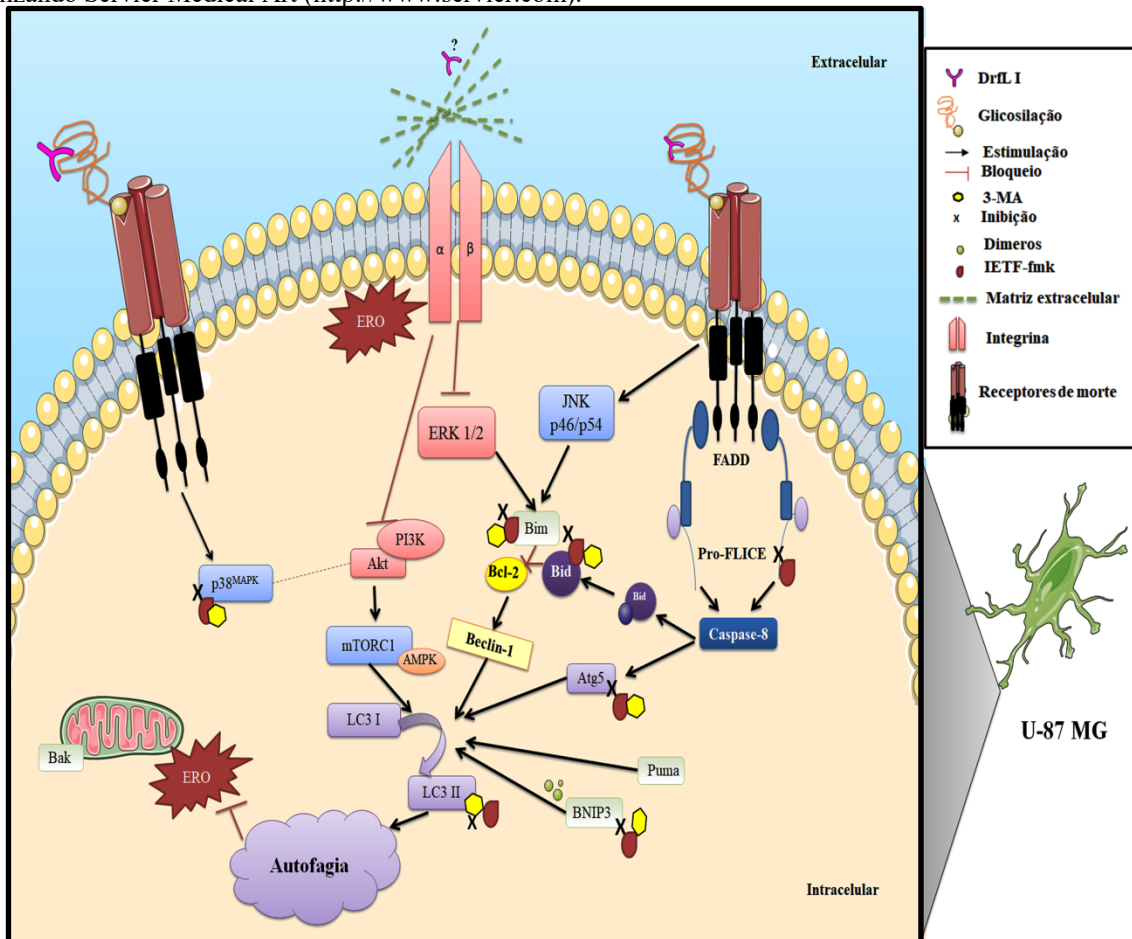
De uma maneira geral podemos dizer que os resultados do Capítulo II indicam que o efeito citotóxico da DrfL I contra as células de glioma parece ser dependente da caspase-8 e da ativação da sinalização para autofagia.

Os efeitos citostáticos/antimigratórios também ocorrem em baixas concentrações da lectina. Nas células da linhagem U-87 MG, que foi o nosso modelo de estudo da sinalização celular (Fig. 66), podemos indicar que a interação da lectina com os resíduos glicosilados, possivelmente presentes em alvos da superfície celular, desencadeia a fosforilação de p38^{MAPK} e JNK (p46/54), juntamente com a defosforilação de ERK1/2 e Akt. A diminuição da sinalização PI3K/Akt, junto ao aumento da expressão de Puma, BNIP3, Atg-5 e liberação da Beclin-1 podem estar envolvidos na clivagem da LC3, levando a autofagia que parece ser o principal processo envolvido na morte celular induzido pela lectina.

Desse modo, concluímos que a lectina DrfL I poderia ser proposta como um possível tratamento antitumoral coadjuvante contra GBM. No entanto, novos estudos devem ser realizados em modelos *in vivo* e *in vitro* a fim de aprofundar a compreensão do mecanismo de ação da lectina.

Figura 66. Representação esquemática dos efeitos da DrfL I nas células de glioma U-87 MG.

A lectina DrfL I liga-se aos resíduos glicosídicos (glicose/manose) presentes na superfície das células U-87 MG induzindo uma diminuição da viabilidade celular conjuntamente com um incremento na fosforilação de $p38^{\text{MAPK}}$ e JNK (p46/p54). Este efeito é acompanhado pela defosforilação de ERK e Akt, bem como pela inibição da migração, adesão e sobrevivência celular. Sendo importante ressaltar que a inibição da via PI3k/Akt poderia estar relacionada à ativação do processo autofágico. Como hipótese de ação sugere-se que o tratamento com a lectina poderia levar a desintegração da matriz extracelular. Esse evento primário poderia causar uma perda de ancoramento de integrinas e consequentemente defosforilação de ERK1/2 e Akt, pode levar a um incremento de estresse no citoesqueleto e favorecer o desancoramento de Bim, que junto a Bid (clivada pela caspase-8) podem se associar a Bcl-2, liberando Beclin-1 (proteína associada a promoção de autofagia). Além disso, as proteínas da subfamília BH3 estimuladas pelo estresse citosólico, Puma, BNIP3, e a proteína Atg-5 clivada por caspase-8, também estimulam a ativação do processo autofágico. A ativação da autofagia, por sua vez, poderia justificar a inibição da produção de ERO, bem como sua ocorrência em elevada taxa causar a morte celular. Em conclusão, esta complexa atividade antiglioma da DrfL I, envolveria um conjunto de mecanismos, que incluiriam: desintegração da matriz extracelular, comunicação entre a ativação de caspase-8 e modulação de proteínas autofágicas, levando a forte ativação da via autofágica e morte celular. Esta figura foi produzida utilizando Servier Medical Art (<http://www.servier.com>).



Grande parte dos resultados deste capítulo estão sendo utilizados no manuscrito do segundo artigo desta tese, intitulado: “DrfL I lectin modulates anoikis pathways and triggers glioma cell death by a mechanism dependent upon autophagy”.

Capítulo 3

- 11 Ação antitumoral do agente alquilante Temozolomida
e seu efeito combinado com as lectinas
ConBr e DrfL I.**

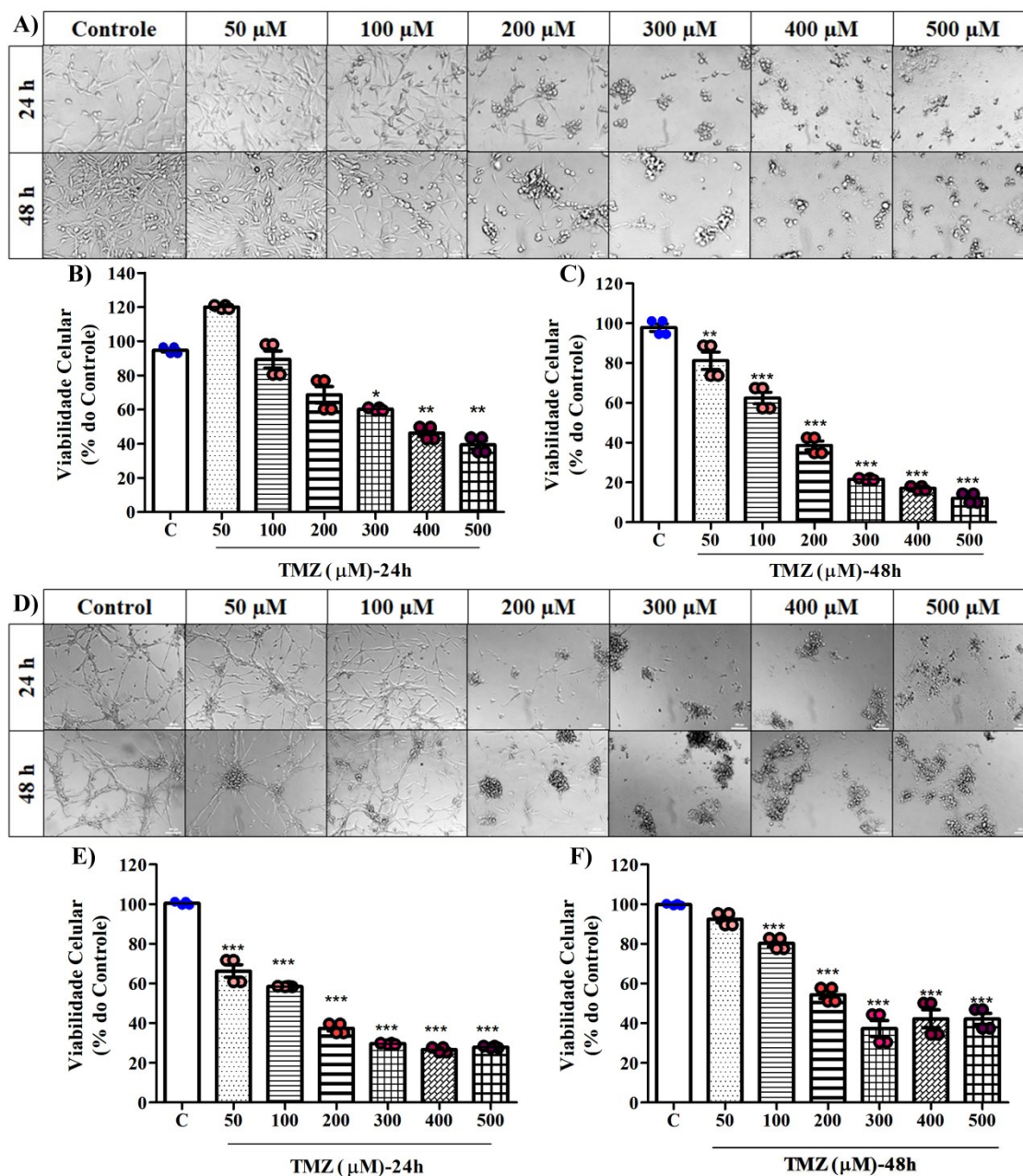
Para caracterizar uma possível interação entre o tratamento com TMZ e as lectinas ConBr e DrfL I, foi primeiramente realizada uma avaliação da resposta das células C6 e U-87 MG frente ao tratamento com TMZ nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 μM as quais foram baseadas em estudos anteriores da literatura (SHI; LI; ZHAN, 2017). A figura 67 apresenta a resposta das linhagens frente à curva concentração e tempo.

Como se observa na figura 67A as células C6 apresentaram retração dos prolongamentos citoplasmáticos na concentração de TMZ 100 μM . A partir de 200 μM , em 24 h de tratamento, foi observado perda de adesão celular com mudanças da morfologia plana para esférica e descolamento das células do fundo da placa. Após 48 h se observa estes eventos de forma mais marcante, juntamente com uma menor proliferação celular na concentração de 50 μM .

Não obstante, como se apresenta na figura 67D as células U-87 MG se mostraram mais resistentes frente ao tratamento com TMZ, apresentando alterações na morfologia a partir de 200 μM em 24 h, sendo este efeito mantido após 48 h.

Em relação à viabilidade celular, foi observado que as diferenças estatísticas, na linhagem C6 surgiram a partir de 300 μM após 24 h de exposição [$F_{(6,12)} = 1,978$; $p < 0,05$] (Fig. 67B) e a partir de 50 μM após 48 h [$F_{(6,12)} = 0,6232$; $p < 0,01$] (Fig. 67C). Entretanto, a viabilidade celular da linhagem U-87 MG foi diminuída a partir 50 μM após 24 h de exposição [$F_{(6,12)} = 2,153$; $p < 0,001$] (Fig. 67D), porém este efeito foi perdido em 48 h; já o efeito citotóxico das concentrações a partir de 100 μM se mantém [$F_{(6,12)} = 1,856$; $p < 0,001$] (Fig. 67E). Estes resultados indicam que o efeito citotóxico do TMZ sobre a linhagem U-87, embora seja mais acentuado para concentrações mais baixas e períodos de exposição mais curtos, não é sustentado nessas condições.

Figura 67. Avaliação do efeito citotóxico da TMZ sobre as células C6 e U-87 MG. As células foram expostas ao veículo (Tampão Hepar-salina, controle) ou TMZ nas concentrações 50, 100, 200, 300, 400 ou 500 μM . Microscopia óptica mostrando o efeito do tratamento na morfologia celular nas células A) C6 e D) U87 tratadas por 24 e 48 h. A barra de escala representa 200 μm . O método de redução do MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular das células C6 frente ao tratamento por B) 24 h C) 48 h e das células U87 frente ao tratamento por E) 24 h E) 48 h. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



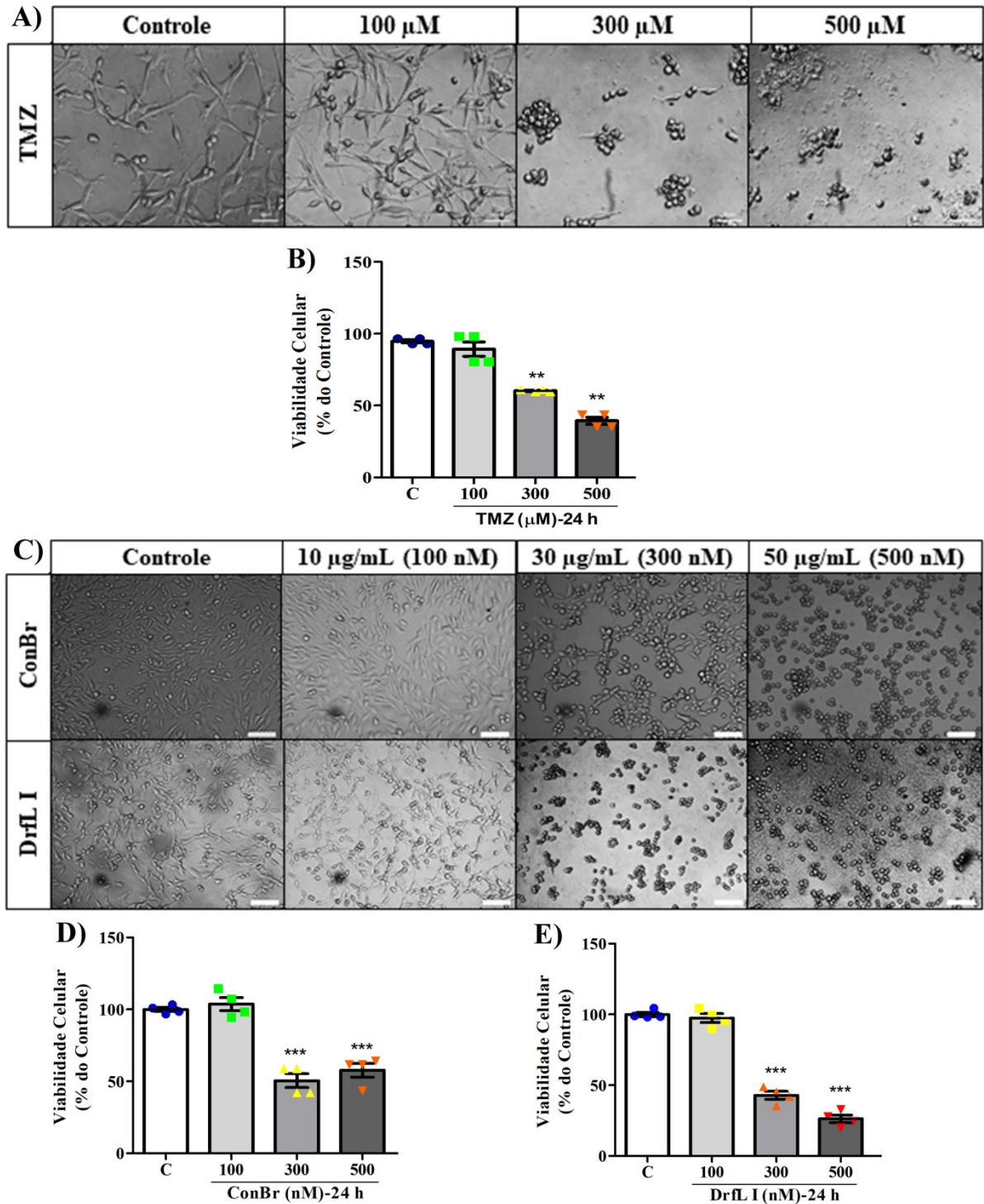
Um aspecto importante a ser considerado em este conjunto de resultados está relacionado com a potências das lectinas nas células C6 de glioma quando comparado com o medicamento de escolha na clínica, o TMZ.

Assim, estabelecendo uma comparação entre o efeito citotóxico das lectinas (ConBr e DrfL I) e TMZ nas células C6 tratadas por 24 h, podemos observar que a concentração de 30

$\mu\text{g/mL}$ das lectinas, equivalentes a 300 nM, induziram uma queda de mais de 50% da viabilidade celular (Fig. 68 C-E) sendo que o tratamento com TMZ mostrou o mesmo efeito a partir da concentração de 500 μM (Fig. 68 A-B).

Figura 68. Comparação do efeito citotóxico da TMZ e as lectinas sobre as células C6.

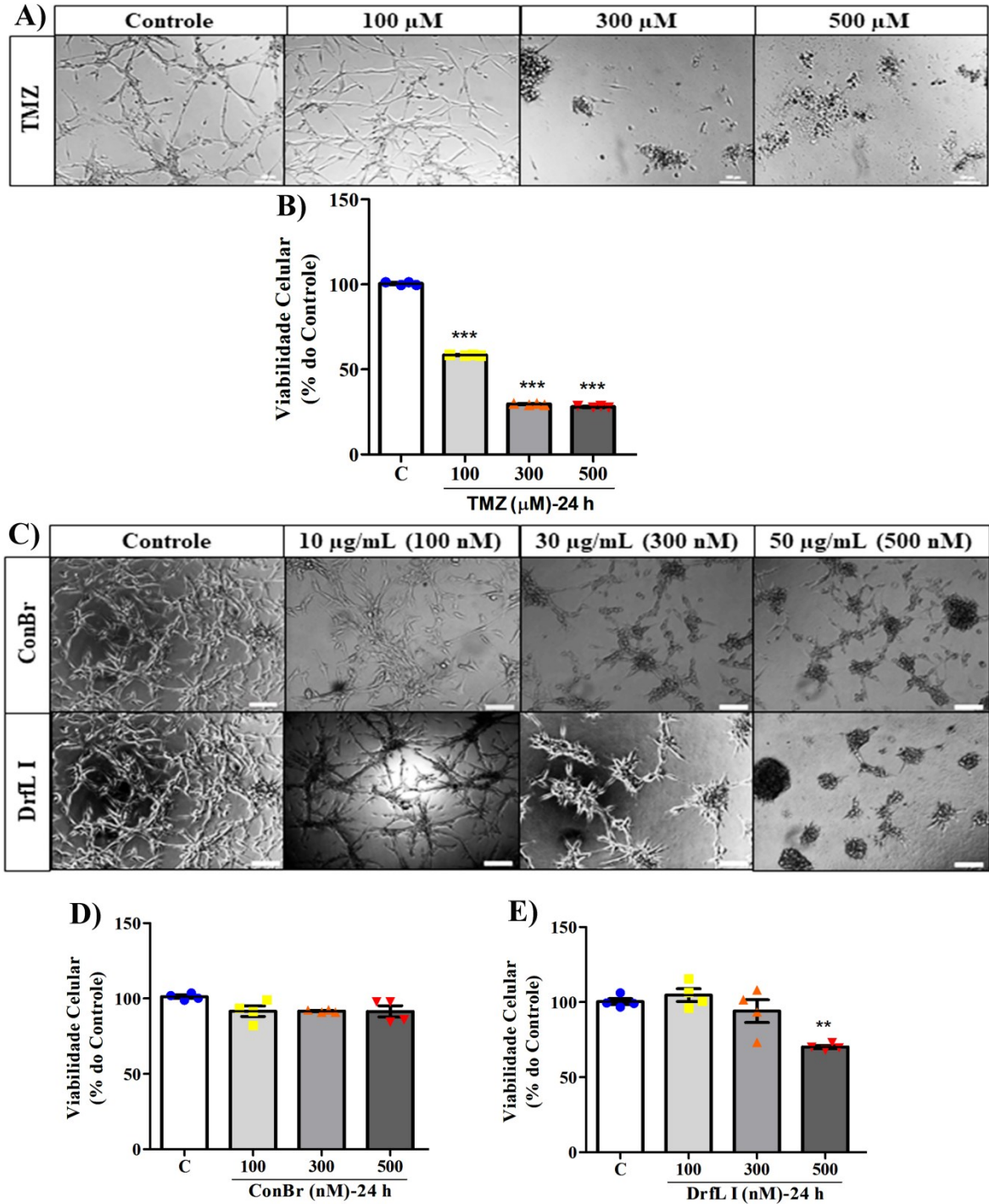
As células foram expostas ao veículo (Tampão Hepes-salina, controle) ou TMZ (100, 300 e 500 μM) ou lectinas (100, 300 e 500 nM). Microscopia óptica mostrando o efeito do tratamento na morfologia celular nas células C6 tratadas A) TMZ e C) ConBr ou DrfL I, por 24 h. A barra de escala representa 200 μm . O método de redução do MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular das células C6 frente ao tratamento com B) TMZ D) ConBr e E) DrfL I. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



Porém, as células U-87 MG se apresentaram mais sensíveis ao tratamento com TMZ (Fig. 69 A-B) quando comparado à resposta frente a ConBr (Fig. 69 C-D) por 24 h. Sendo importante ressaltar que como apresentado na figura 54, a lectina DrfL I após 48 h de tratamento induz uma queda da viabilidade de mais de 40% a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (correspondente a 100 nM), no entanto a concentração de 100 μM de TMZ perde seu efeito após 48 h (Fig. 67).

Figura 69. Comparação do efeito citotóxico da TMZ e as lectinas sobre as células

U-87 MG. As células foram expostas ao veículo (Tampão HEPES-salina, controle) ou TMZ (100, 300 e 500 μM) ou lectinas (100, 300 e 500 nM). Microscopia óptica mostrando o efeito do tratamento na morfologia celular nas células U-87 MG tratadas A) TMZ e C) ConBr ou DrfL I, por 24 h. A barra de escala representa 200 μm . O método de redução do MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular das células U-87 MG frente ao tratamento com B) TMZ D) ConBr e E) DrfL I. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



11.1 O tratamento combinado de TMZ com as lectinas altera a viabilidade celular na linhagem C6

Após verificarmos a sensibilidade das células C6 frente a TMZ, resolvemos investigar se poderia haver alguma ação aditiva ou sinérgica entre o tratamento com as lectinas e este fármaco.

Para cumprir com esse objetivo, primeiramente realizamos um ensaio controle utilizando as concentrações de 100 e 200 μM de TMZ (por serem concentrações que não apresentaram diferenças estatísticas na diminuição da viabilidade celular após 24 h de tratamento (Fig. 67B), juntamente com a lectina nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ (que não apresenta efeitos citotóxicos) e de 30 $\mu\text{g/mL}$ (que apresenta efeitos citotóxicos). Na figura 11 é apresentado o desenho experimental dos tratamentos.

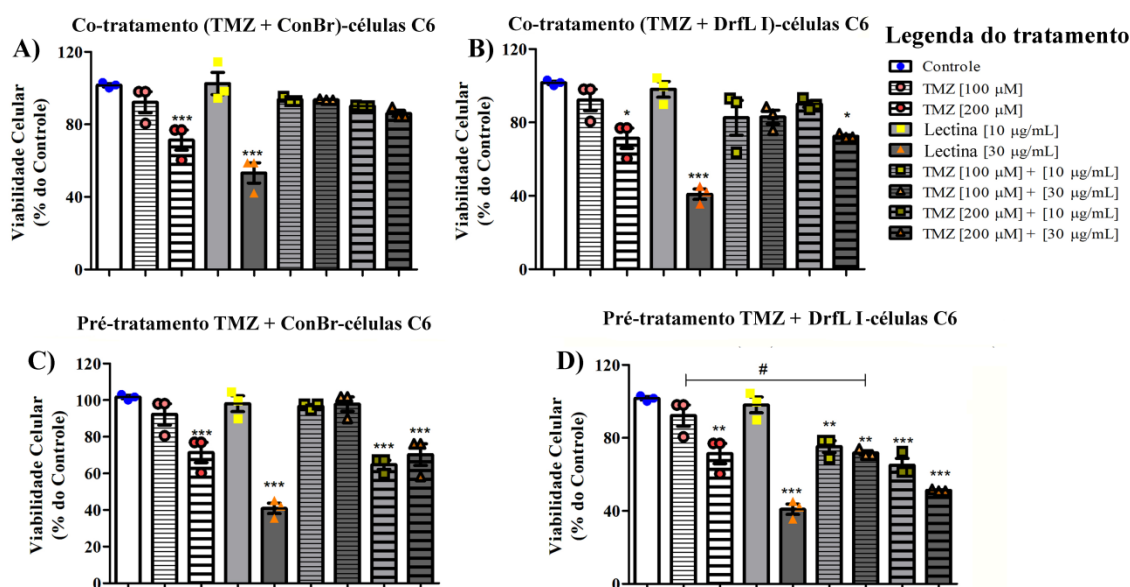
A figura 70 apresenta a resposta das células C6 frente ao tratamento simultâneo com TMZ+lectinas por 24 h e ao pré-tratamento de TMZ por 24 h seguidamente de um co-tratamento com as lectinas por mais 24 h.

Como pode-se notar na figura 70A o co-tratamento de 100 e 200 μM de TMZ + 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr não apresentaram diferenças estatísticas comparadas ao veículo (controle). Assim, parece ocorrer algum tipo de mecanismo bloqueando o efeito citotóxico da concentração de 200 μM de TMZ e de 30 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr. Mas como mostrado na figura 70B o co-tratamento de 200 μM de TMZ + 30 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I apresentou diferença estatística comparada ao veículo (controle) [$F_{(8,9)} = 0,2277$; $p < 0,05$], porém esse efeito não é estatisticamente diferente daquele apresentado pelo tratamento com 200 μM de TMZ isoladamente.

A seguir fomos avaliar o que aconteceria se as células C6 fossem pré-tratadas com TMZ para posteriormente serem co-tratadas com as lectinas.

Como mostrado na figura 70C o pré-tratamento com 200 μM de TMZ e posterior co-tratamento com 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ de ConBr apresentaram diferenças estatísticas comparadas ao veículo (controle) [$F_{(8,9)} = 4,061$; $p < 0,001$], mas não apresentam diferenças com 200 μM de TMZ. O pré-tratamento com 100 ou 200 μM de TMZ e posterior co-tratamento com 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I (Fig. 70D) apresentaram diferenças estatísticas comparadas ao veículo [$F_{(8,9)} = 0,2277$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$]. Além disso, o pré-tratamento com 100 μM de TMZ e posterior co-tratamento com 10 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I apresentou diferença estatística comparado ao controle, sendo que essas concentrações isoladamente não apresentavam efeito sobre a viabilidade das células C6.

Figura 70. Avaliação do efeito na viabilidade celular das células C6 frente ao tratamento combinado de TMZ com as lectinas. Foi realizado o método de redução do MTT para avaliar a viabilidade celular das células expostas ao có-tratamento de TMZ e A) ConBr B) DrfL I ou ao pré-tratamento por 24 h com TMZ seguido de um có-tratamento com C) ConBr D) DrfL I. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.



Diante deste conjunto de dados, decidimos pesquisar a resposta das células C6 frente ao pré-tratamento com 200 µM de TMZ e posterior co-tratamento com as lectinas.

11.1.1 Mecanismo de ação do tratamento combinado de TMZ e ConBr na linhagem celular C6

A figura 71 apresenta os resultados obtidos em resposta ao pré-tratamento com 200 µM de TMZ e posterior co-tratamento com a lectina ConBr. Primeiramente, realizamos um ensaio de MTT a fim de avaliar se a curva de resposta frente às concentrações utilizadas da lectina continua se apresentando após o pré-tratamento com 200 µM de TMZ por 24 h. Como se observa na figura 71B a curva característica da resposta das células C6 frente ao tratamento com ConBr (1, 10, 30 e 50 µg/mL) foi perdida. Após o pré-tratamento com 200 µM de TMZ as células respondem com uma curva em plateau; ou seja, o co-tratamento com a lectina, independentemente da concentração, não conseguiu exacerbar o efeito citotóxico do pré-tratamento.

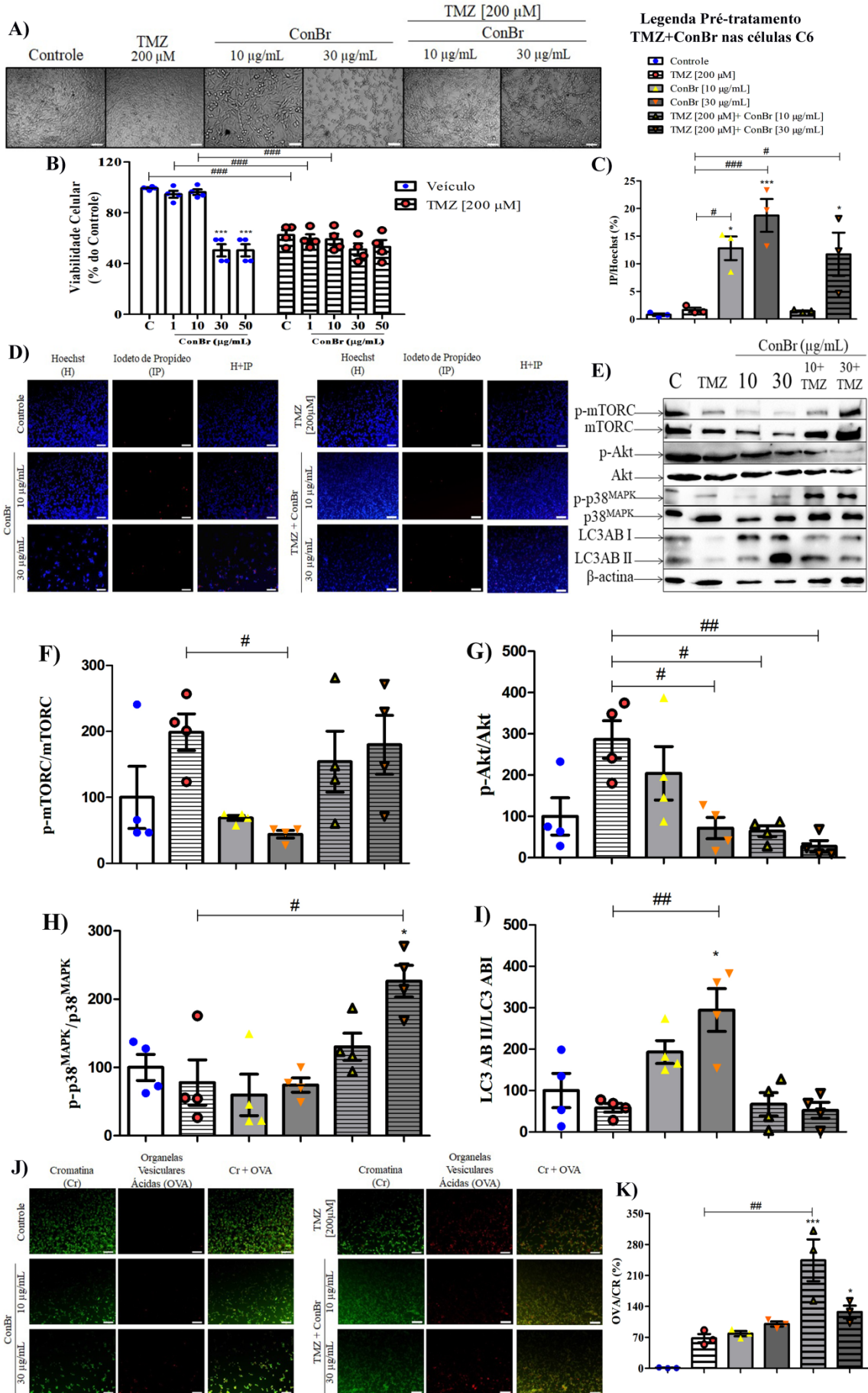
Para compreender o que estava acontecendo, nos dispomos a investigar a sinalização celular das células C6 frente ao pré-tratamento com 200 µM de TMZ + co-tratamento com 10

ou 30 µg/mL de ConBr, sendo apresentado o representativo da expressão proteica na figura 71E.

Foi observado um incremento na fosforilação de mTORC1 (Fig. 71F) e p38^{MAPK} (Fig. 71H) nos tratamentos combinados de 200 µM de TMZ + 10 µg/mL de ConBr e 200 µM de TMZ + 30 µg/mL de ConBr, quando comparados ao efeito da lectina. Entretanto, a fosforilação da mTORC1 não apresentou alterações quando comparado ao efeito do TMZ isoladamente. Paralelamente a isso, foi observado uma diminuição na clivagem de LC3 (Fig. 71I) nos tratamentos combinados de 200 µM de TMZ + 10 µg/mL de ConBr e 200 µM de TMZ + 30 µg/mL de ConBr quando comparados ao efeito da ConBr. No mesmo sentido ocorreu uma diminuição na fosforilação de Akt (Fig. 71G) em resposta ao tratamento combinado de 200 µM de TMZ + 10 µg/mL de ConBr comparado ao efeito da lectina isoladamente.

A avaliação por microscopia de fluorescência revelou uma menor marcação para IP (Fig. 71C-D), sendo interessante destacar que o tratamento combinado de 200 µM de TMZ + 10 µg/mL de ConBr não apresenta diferenças com o tratamento de 200 µM de TMZ, enquanto nessas mesmas condições ocorre grande aumento na marcação de OVA nos tratamentos (Fig. 71J-K).

Figura 71. Mecanismo de ação do tratamento combinado de 200 µM e a lectina ConBr nas células C6. A) Microscopia óptica mostrando o efeito do tratamento combinado de TMZ e ConBr. A barra de escala representa 200 µm. B) Viabilidade celular frente ao tratamento medido pelo método da redução do MTT. C) Quantificação e D) Representativo da coloração com Iodeto de Propídeo (IP) e Hoechst. A barra de escala representa 100 µm. E) Western blot representativo das células C6 tratadas com TMZ (200 µM – 24 h), veículo (12 h), ou ConBr (10 e 30 µg/mL – 12 h) e pré tratadas com TMZ (200 µM – 24 h) acrescidas de ConBr (10 e 30 µg/mL – 12 h); quantificação das proteínas F) mTORC G) Akt H) p38^{MAPK} I) LC3. J) Representativo e K) Quantificação e da coloração com Laranja de Acridina (LA). A barra de escala representa 200 µm. Os dados da microscopia de fluorescência estão apresentados como porcentagem do valor absoluto obtido de cada tratamento (N=3 em triplicata.), enquanto os resultados de MTT e WB estão apresentados como média ± E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%) (N=4 em triplicata). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com só lectina na mesma concentração ou do efeito da TMZ sozinha.



11.1.2 Mecanismo de ação do tratamento combinado de TMZ e DrfL I na linhagem celular C6

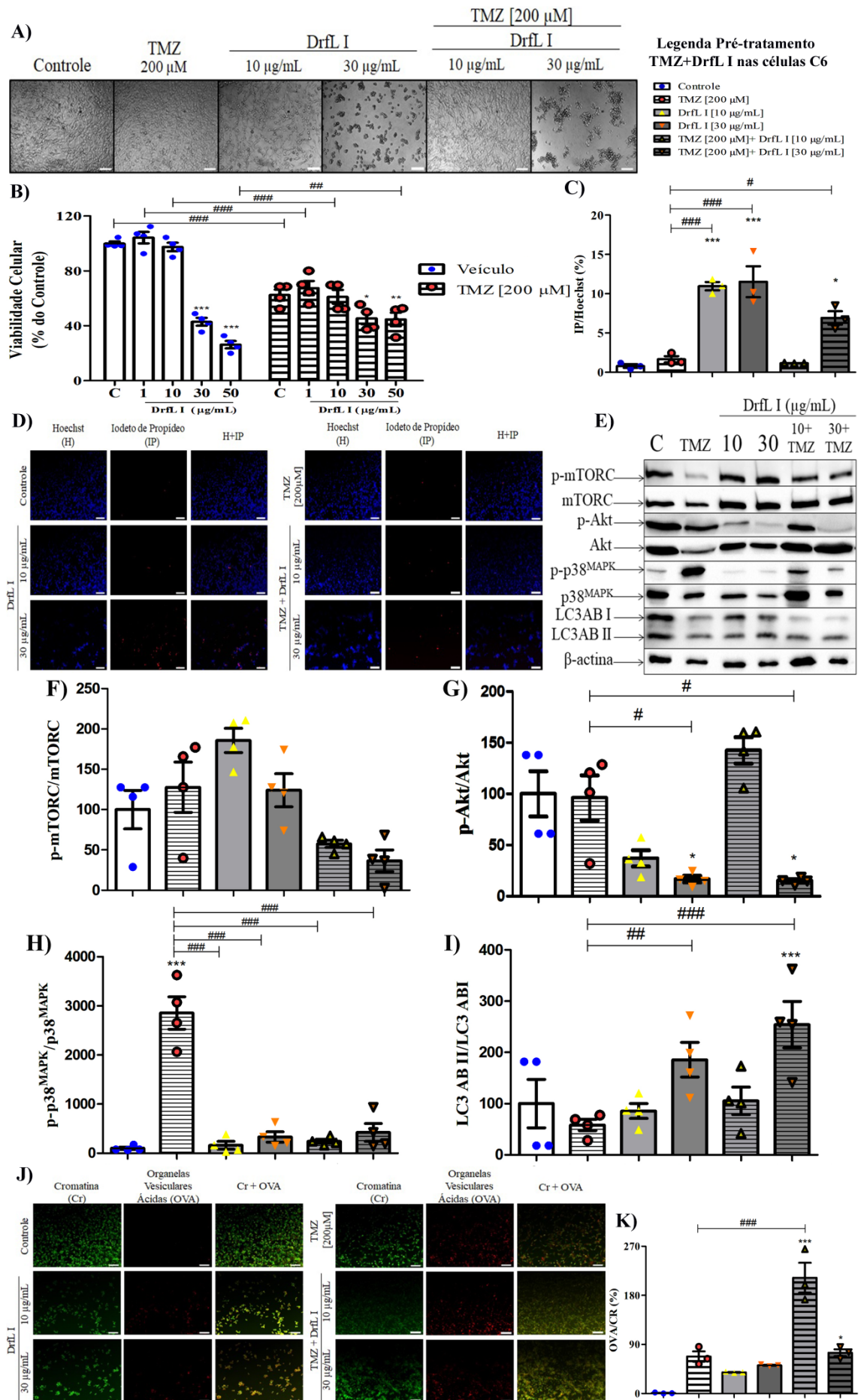
A figura 72 apresenta os resultados obtidos em resposta ao pré-tratamento com 200 μM de TMZ e posterior co-tratamento com a lectina DrfL I. Primeiramente, realizamos um ensaio de MTT a fim de avaliar se a curva de resposta frente a lectina isoladamente se mantém após o pré-tratamento com 200 μM de TMZ por 24 h. Como se observa na figura 72B o pré-tratamento com 200 μM de TMZ diminuiu um 40% a viabilidade celular. As concentrações de 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I promovem diminuição adicional de cerca de 20% [$F_{(9,12)}= 2,981$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente]. Entretanto, deve ser destacado que a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ da lectina sozinha conseguiu diminuir em cerca de 80% a viabilidade celular, sendo mais efetiva do que o tratamento combinado com TMZ [$F_{(9,12)}= 2,981$; $p < 0,01$].

Para compreender o que estava acontecendo, nos dispomos a investigar a sinalização celular das células C6 frente ao pré-tratamento com 200 μM de TMZ + co-tratamento com 10 ou 30 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I, sendo apresentado o representativo da expressão proteica na figura 72E.

Foi observada uma diminuição exacerbada na fosforilação de $p38^{\text{MAPK}}$ (Fig. 72H) quando comparado ao tratamento com 200 μM de TMZ, e de mTORC1 (Fig. 72F) nos tratamentos combinados de 200 μM de TMZ + 10 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I e 200 μM de TMZ + 30 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I, quando comparados ao efeito da lectina e da TMZ isoladamente. Paralelamente, foi observado um incremento na clivagem de LC3 (Fig. 72I) nos tratamentos combinados de 200 μM de TMZ + 10 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I e 200 μM de TMZ + 30 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I quando comparados ao efeito da lectina e da TMZ, e um aumento na fosforilação de Akt (Fig. 72G) no tratamento combinado de 200 μM de TMZ + 10 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I comparado ao efeito independente da lectina e da TMZ.

A avaliação por microscopia de fluorescência revelou uma menor marcação para IP (Fig. 72C-D), sendo importante destacar que o tratamento combinado de 200 μM de TMZ + 10 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I não apresentaram diferenças com o tratamento de 200 μM de TMZ. Estes achados foram acompanhados de um incremento na marcação de OVA no tratamento combinado de 200 μM de TMZ + 10 $\mu\text{g/mL}$ de DrfL I (Fig. 72J-K).

Figura 72. Mecanismo de ação do tratamento combinado de 200 μ M e a lectina DrfL I nas células C6. A) Microscopia óptica mostrando o efeito do tratamento combinado de TMZ e DrfL I. A barra de escala representa 200 μ m. B) Viabilidade celular frente ao tratamento medido pelo método da redução do MTT. C) Quantificação e D) Representativo da coloração com Iodeto de Propídeo (IP) e Hoechst. A barra de escala representa 100 μ m. E) Western blot representativo das células C6 tratadas com TMZ (200 μ M – 24 h), veículo (12 h), ou DrfL I (10 e 30 μ g/mL – 12 h) e pré tratadas com TMZ (200 μ M – 24 h) acrescidas de DrfL I (10 e 30 μ g/mL – 12 h); quantificação das proteínas F) mTORC G) Akt H) p38^{MAPK} I) LC3. J) Representativo e K) Quantificação e da coloração com Laranja de Acridina (LA). A barra de escala representa 200 μ m. Os dados da microscopia de fluorescência estão apresentados como porcentagem do valor absoluto obtido de cada tratamento (N=3 em triplicata.), enquanto os resultados de MTT e WB estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%) (N=4 em triplicata). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com só lectina na mesma concentração ou do efeito da TMZ sozinha.



11.2 Mecanismo de ação do tratamento combinado de TMZ e DrfL I na linhagem celular U-87 MG

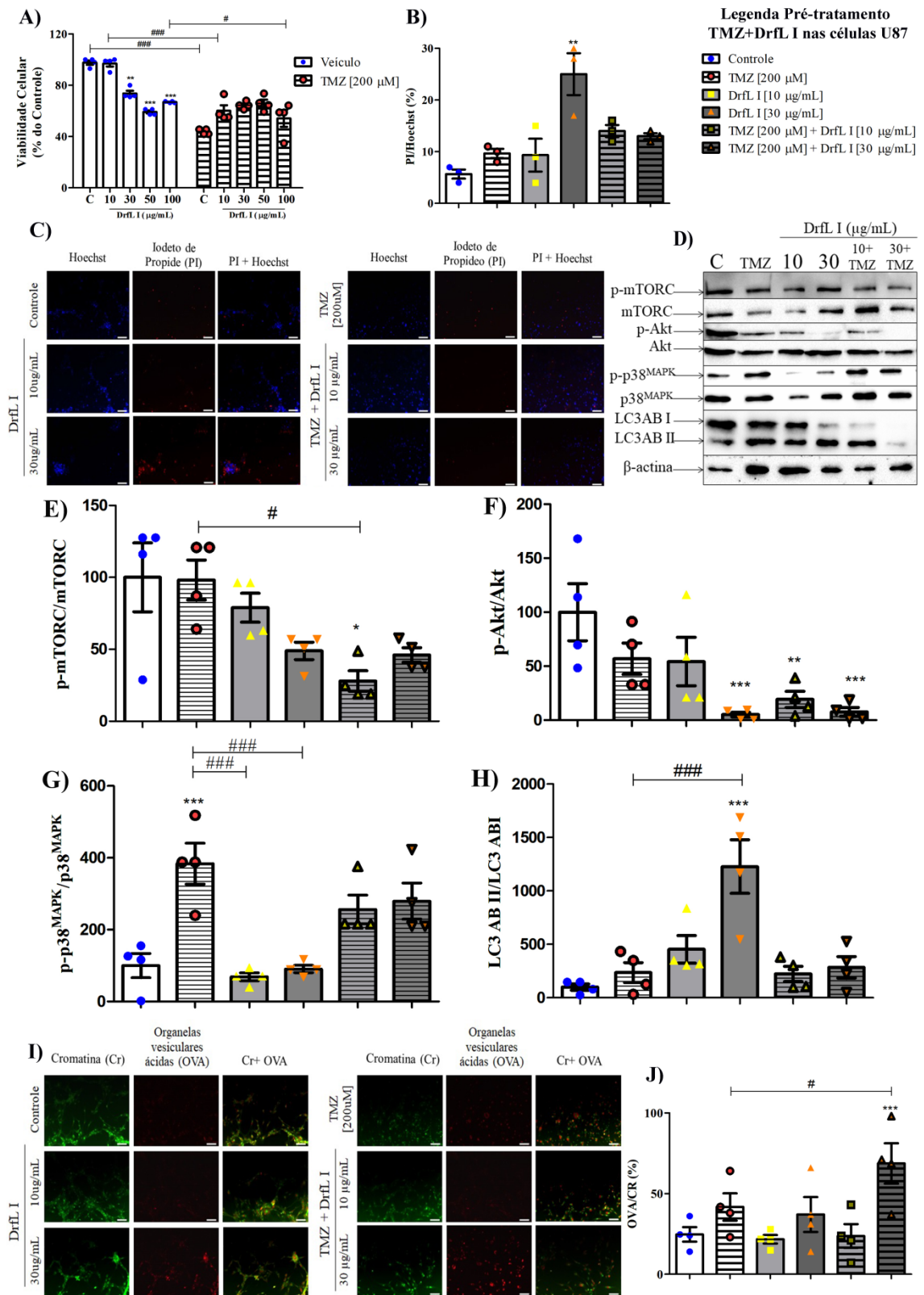
A figura 73 apresenta os resultados em resposta ao pré-tratamento com 200 μ M de TMZ e posterior co-tratamento com DrfL I das células da linhagem U-87 MG. O protocolo foi similar ao realizado com a linhagem C6. Inicialmente realizamos um ensaio de MTT a fim de avaliar se as respostas frente às concentrações utilizadas da lectina continuavam efetivas após o pré-tratamento com 200 μ M de TMZ por 24 h. Como se observa na figura 73A o pré-tratamento com 200 μ M de TMZ leva a uma curva em plateau, no qual o co-tratamento com a lectina, independentemente da concentração, não conseguiu exacerbar o efeito citotóxico do pré-tratamento com TMZ.

A seguir foi verificada a sinalização celular das células U87 frente ao pré-tratamento com 200 μ M de TMZ + co-tratamento com 10 ou 30 μ g/mL de DrfL I, sendo apresentado o representativo da expressão proteica na figura 73D.

Foi observado um aumento na fosforilação de p38^{MAPK} (Fig. 73G) nos tratamentos combinados de 200 μ M de TMZ + 10 μ g/mL de DrfL I e 200 μ M de TMZ + 30 μ g/mL de DrfL I, quando comparados ao tratamento da lectina nas mesmas concentrações. Entretanto, não houve diferença em relação ao tratamento com 200 μ M de TMZ. Adicionalmente, foi observado diminuição na fosforilação de mTORC1 (Fig. 73E), Akt (Fig. 73F) e na clivagem de LC3 (Fig. 73H) nos tratamentos combinados de 200 μ M de TMZ + 10 μ g/mL de DrfL I e 200 μ M de TMZ + 30 μ g/mL de DrfL I.

A avaliação por microscopia de fluorescência revelou uma menor marcação para IP no tratamento combinado de 200 μ M de TMZ + 30 μ g/mL de DrfL I (Fig. 73B-C). Além disso, verificou-se um incremento na marcação de OVA no tratamento combinado de 200 μ M de TMZ + 30 μ g/mL de DrfL I (Fig. 73I-J).

Figura 73. Mecanismo de ação do tratamento combinado de 200 μ M e a lectina DrfL I nas células U87. A) Viabilidade celular frente ao tratamento medido pelo método da redução do MTT. B) Quantificação e C) Representativo da coloração com Iodeto de Propídeo (IP) e Hoechst. A barra de escala representa 100 μ m. D) Western blot representativo das células U87 tratadas com TMZ (200 μ M – 24 h), veículo (24 h), ou DrfL I (10 e 30 μ g/mL – 24 h) e pré tratadas com TMZ (200 μ M – 24 h) acrescidas de DrfL I (10 e 30 μ g/mL – 24 h); quantificação das proteínas E) mTORC F) Akt G) p38^{MAPK} H) LC3. I) Representativo e K) Quantificação e da coloração com Laranja de Acridina (LA). A barra de escala representa 200 μ m. Os dados da microscopia de fluorescência estão apresentados como porcentagem do valor absoluto obtido de cada tratamento (N=3 em triplicata.), enquanto os resultados de MTT e WB estão apresentados como média \pm E.P.M., em porcentagem do controle (considerado como 100%) (N=4 em triplicata). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ ANOVA de duas vias seguido do teste *post hoc* de Bonferroni em relação ao tratamento com só lectina na mesma concentração ou do efeito da TMZ sozinha.



12 Discussão e conclusão dos resultados obtido no Capítulo III: “Ação do agente alquilante Temozolomida e seu efeito combinado com as lectinas ConBr e DrfL I”

O tratamento dos subtipos de gliomas consiste em uma das mais delicadas terapias, pois implica na interferência da estrutura parenquimal do tecido mais importante do corpo humano. Além disso, a característica mais comum destes tumores é a grande capacidade de infiltração o qual carrega um grave problema na remoção completa da massa tumoral. Desse modo, estratégias adjuvantes são utilizadas para garantir uma melhor eficácia na eliminação da massa tumoral, como a radiação focalizada e a utilização de fármacos anticancerígenos. Sendo a temozolomida (TMZ) o fármaco de escolha amplamente empregado desde o ano 2000 (DRESEMANN, 2010).

Embora o tratamento com TMZ prolongue significativamente a sobrevida dos pacientes, os mecanismos que promovem a sobrevivência/resistência das células tratadas apresentam um impacto negativo na eficácia do tratamento, considerando que cerca de 50% dos pacientes com GBM não respondem ao tratamento ou respondem por um curto prazo (AVGEROPOULOS; BATCHELOR, 1999; BUONFIGLIOLI; HAMBARDZUMYAN, 2021; GUAN *et al.*, 2018b; MADHUSUDAN; HICKSON, 2005; PRADOS, 2001), tornando necessária a investigação de novos compostos capazes de controlar a quimiorresistência característica das células de GBM (BRYUKHOVETSKIY *et al.*, 2017) ou de compostos que possam ser utilizados como coadjuvantes ao tratamento. Como por exemplo, o estudo “*A phase II trial of arsenic trioxide and temozolomide in combination with radiation therapy for patients with malignant gliomas*” (KUMTHEKAR *et al.*, 2017) que utiliza o trióxido de arsênio (ATO) como agente sinérgico à radioterapia ou o estudo “*Phase I trial of dimethyl fumarate, temozolomide, and radiation therapy in glioblastoma*” (SHAFER *et al.*, 2020) que utiliza o fumarato de dimetila (DMF) como coadjuvante do tratamento.

Em conjunto, os resultados obtidos neste Capítulo III mostraram que aparentemente o pré-tratamento com 200 μ M de TMZ não sensibilizou as células frente ao tratamento com as lectinas, perdendo-se a curva resposta característica do tratamento com as lectinas testadas.

Porém, no tratamento combinado com ConBr nas células C6 foi observado um incremento na fosforilação de p38^{MAPK} juntamente à inibição da Akt e da clivagem da LC3 (Fig. 71), sendo estes efeitos também observados nas células U-87 MG tratadas com DrfL I (Fig. 73). No entanto, observou-se um aumento na clivagem de LC3 no tratamento combinado de TMZ com DrfL I na linhagem C6 (Fig. 72). Entretanto, é importante apontar que a ação de

DrfL I não foi bloqueada nas células C6 tratadas com o inibidor de autofagia (3-MA) (Fig. 53). Enquanto, nos tratamentos onde o processo autofágico estava associado ao mecanismo de morte celular, mediante utilização do inibidor de autofagia 3MA (Fig. 24 e 61), foi observado uma inibição deste processo pela combinação de TMZ e lectina (Fig. 71 e 73).

A detecção da conservação da LC3 (LC3I para LC3II) por imunoblotting é amplamente utilizada no monitoramento da quantidade de autofagossomos, porém o conteúdo de LC3II é degradado pelo processo de autofagia, assim como a quantidade de autofagolisossomos é dependente do fluxo autofágico (MIZUSHIMA; YOSHIMORI, 2007). Esses dados correlacionam-se com os observados nos nossos resultados, onde a quantificação de OVA e LC3II não são equivalentes.

Achados da literatura demonstram que o mecanismo de ação da TMZ acaba ativando as vias de sinalização PI3K/Akt (envolvida na capacidade tumorigênica e invasividade das células cancerígenas) e a via das ERK (envolvida na proliferação celular) e conseqüentemente ativa os mecanismos de resistência das células cancerígenas frente ao fármaco (BIRK; HAN; BUTOWSKI, 2017; KLEIHUES; SOBIN, 2000). Infelizmente, este mecanismo foi observado nas células C6 pré-tratadas com 200 μ M de TMZ+ co-tratamento com 10 μ g/mL de DrfL I, onde houve um aumento na fosforilação de Akt (Fig. 72G), juntamente com um aumento da quantificação de OVA (Fig. 72K). Diferentemente ao demonstrado nas células C6, pré-tratadas com 200 μ M de TMZ+co-tratamento com 30 μ g/mL de DrfL I, que apresentaram maiores alterações morfológicas (comparados com os tratamentos sozinhos) (Fig. 72A), diminuição na fosforilação de Akt (Fig. 72G), juntamente ao aumento na clivagem de LC3 (Fig. 72I). Esses resultados podem se relacionar com a capacidade da DrfL I em inibir a adesão celular das células C6 após 3 h de tratamento, além de ser observado um grande comprometimento na integridade da MEC após 24 h de tratamento (Fig. 45A). No conjunto, esses dados podem ser vistos tomando em conta os efeitos da TMZ e o processo de *anoikis*, produzido pela lectina e esta relação no desfecho de morte celular. Entretanto, serão necessários estudos adicionais para estabelecer essa possível inter-relação.

No desenvolvimento do câncer, o processo de autofagia pode possuir uma dupla função, contribuir na progressão do processo de tumorigênese, à medida que auxilia na reprogramação metabólica das células cancerígenas ou no mecanismo supressor tumoral (DEVENPORT *et al.*, 2021; TAN, QIAN *et al.*, 2016).

Estudos da literatura salientaram que o tratamento com TMZ induz uma diminuição no ciclo celular (GRATAS *et al.*, 2014; KANZAWA *et al.*, 2004), podendo ser o motivo da interferência da ação posterior da lectina. Como também, vários estudos na literatura

demonstraram que mediante a ativação de processos autofágicos, como mecanismos de adaptação ao estresse, as células cancerígenas tornam-se resistentes aos quimioterápicos ou radioterapia, reforçando a ideia de que a inibição da autofagia poderia sensibilizar as células tumorais frente à irradiação (JO *et al.*, 2015; PAGLIN *et al.*, 2001) e agentes alquilantes (PANDA *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2016).

Os nossos resultados demonstraram que houve um incremento na fosforilação de p38^{MAPK} tanto nas células C6 co-tratadas com ConBr (Fig. 71H) quanto nas células U-87 MG co-tratadas com DrfL I (Fig. 73G). Diversos estudos na literatura têm implicado à p38 α na resposta celular frente a condições de estresse, como por exemplo, períodos de estresse intra ou extracelular produto de hiperosmolaridade, estresse oxidativo ou danos no DNA (CANOVAS; NEBREDA, 2021). Além disso, foi demonstrado que frente a uma hiperativação de RAS a p38 α pode exercer um *feedback* negativo, inibindo a sinalização de RAS e assim o ciclo celular. No entanto, o bloqueio ou perda da funcionalidade de p38 α pode favorecer processos de tumorigênese (MARSHALL, 2017, chap. 71; MARTÍNEZ-LIMÓN *et al.*, 2020; PAE *et al.*, 2001; WAGNER; NEBREDA, 2009; ZARUBIN; HAN, 2005).

Vários estudos da literatura vêm salientando a MEC como uma rede de sinalização chave no processo tumorigênico e/ou de metástase, e este elemento está ganhando importância em novas abordagens terapêuticas (FIANCO; CENCI; BARILÀ, 2016; MARHUENDA *et al.*, 2021; MARSICO *et al.*, 2018; OH; SUN, 2021; WINKLER *et al.*, 2020). Em função disso, futuros experimentos utilizando um pré-tratamento com a lectina e posterior co-tratamento com TMZ podem ser interessantes, considerando a capacidade de ambas as lectinas poderem comprometer a integridade da MEC, inibindo a adesão, diferenciação e migração celular, associado às alterações morfológicas das células proliferativas (Fig. 16B e 57B).

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS DA TESE

No conjunto nossos resultados sugerem que as lectinas DrfL I e ConBr nas células de glioma:

- i) promovem ativação de autofagia
- ii) este processo parece mediar o efeito citotóxico das lectinas
- iii) promovem o aumento das proteínas da subfamília Bax ou pró-apoptótica (BH3)
- iv) estes eventos são parcialmente dependentes da via autofágica e da ativação de caspase-8.

Nossos resultados indicam pela primeira vez que a DrfL I, uma lectina isolada de sementes da leguminosa *Diocleia reflexa* presente na flora brasileira, mediante o reconhecimento e ligação reversível a glicanos específicos da superfície celular, promove inibição da migração celular e da eficácia clonogênica, diminuindo a viabilidade celular nas células de GBM mediante um mecanismo de *crosstalk* entre a ativação da via apoptótica extrínseca e o processo de autofagia.

Da mesma forma o estudo da ação de ConBr, uma lectina isolada de sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis* e também presente na flora brasileira, que embora já tivesse indicação na literatura de atividade antitumoral, nosso trabalho desvendou, pela primeira vez, que aparentemente a ação antiglioma de ConBr ocorra mediante um mecanismo de *crosstalk* entre a ativação da via apoptótica extrínseca e o processo de autofagia.

Apesar de ambas as lectinas serem ConA-like, apresentando alta similaridade na sequência de aminoácidos e na estrutura cristalográfica, DrfL I apresentou maior citotoxicidade nos modelos de glioma utilizados. Assim como, seu mecanismo de ação parece ser mais conservado e estável, podendo ser uma consequência dos danos na matriz extracelular e ativação do processo de *anoikis*.

Claramente, são importantes estudos que esclareçam os alvos moleculares envolvidos na ativação destas vias.

Futuros experimentos utilizando um pré-tratamento com a lectina e posterior co-tratamento com TMZ se fazem necessários para melhor a compressão dos dados obtidos no Capítulo 3 da tese.

Em síntese, concluímos que as lectinas DrfL I e ConBr poderiam ser propostas como um possível tratamento adjuvante contra GBM considerando que foi demonstrada a ausência

de estresse em astrócitos corticais, além disso a lectina ConBr tem sido apresentada, em vários trabalhos na literatura por um efeito neuroprotetor em diversos modelos neurais não tumorais *in vivo* e *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, Munjal M. *et al.* Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 49, n. 12, p. 1846–1855, Dec. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584910005046>>.
- ACHARYA, Munjal M. *et al.* Human Neural Stem Cell Transplantation Ameliorates Radiation-Induced Cognitive Dysfunction. *Cancer Research*, v. 71, n. 14, p. 4834–4845, 15 Jul. 2011. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-0027>>.
- ÅGREN, Magnus S.; AUF DEM KELLER, Ulrich. Matrix Metalloproteinases: How Much Can They Do? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 8, p. 2678, 12 Apr. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/2678>>.
- AKHTER, Rumana *et al.* The pro-apoptotic protein Bmf co-operates with Bim and Puma in neuron death induced by β -amyloid or NGF deprivation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 88, p. 249–257, 1 Apr. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044743117303706>>. Acesso em: 7 jun. 2021.
- AKLA, Naoufal; PRATT, Jonathan; ANNABI, Borhane. Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells. *Experimental Cell Research*, v. 318, n. 19, p. 2498–2506, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.08.003>>.
- ALBUQUERQUE, Lidiane Pereira De *et al.* Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. *Acta Tropica*, v. 138, p. 23–27, Oct. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X14002022>>.
- ALDAPE, Kenneth D. *et al.* Immunohistochemical Detection of EGFRvIII in High Malignancy Grade Astrocytomas and Evaluation of Prognostic Significance. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 63, n. 7, p. 700–707, 1 Jul. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1093/jnen/63.7.700>>.
- ALLEN, Marie *et al.* Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Science Translational Medicine*, v. 8, n. 354, p. 354re3–354re3, 31 Aug. 2016. Disponível em: <<https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aaf6853>>.
- AROUI, Sonia *et al.* Naringin suppresses cell metastasis and the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) via the inhibition of ERK-P38-JNK signaling pathway in human glioblastoma. *Chemico-Biological Interactions*, v. 244, p. 195–203, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.011>>.
- ASHKENAZI, Avi. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 12, p. 1001–1012, 7 Dec. 2008. Disponível em:

- <<http://www.nature.com/articles/nrd2637>>.
- ASHRAFI, G.; SCHWARZ, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, v. 20, n. 1, p. 31–42, 29 Jan. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cdd201281>>.
- ASSREUY, Ana Maria Sampaio *et al.* Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 380, n. 6, p. 509–521, 24 Dec. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00210-009-0465-1>>.
- AUER, R.N.; MAESTRO, R.F. Del; ANDERSON, R. A Simple and Reproducible Experimental in Vivo Glioma Model. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*, v. 8, n. 4, p. 325–331, 18 Nov. 1981. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifiser/S0317167100043468/type/journal_article>.
- AVGEROPOULOS, Nicholas G.; BATCHELOR, Tracy T. New Treatment Strategies for Malignant Gliomas. *The Oncologist*, v. 4, n. 3, p. 209–224, Jun. 1999. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/theoncologist.4-3-209>>.
- BADKE, Guilherme Lellis *et al.* Glioblastoma multiforme em idosos: uma revisão sobre seu tratamento com ênfase na abordagem cirúrgica. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery*, v. 33, n. 01, p. 45–51, 11 Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1626199>>.
- BAEKELANDT, M. *et al.* Expression of Apoptosis-Related Proteins Is an Independent Determinant of Patient Prognosis in Advanced Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 18, n. 22, p. 3775–3781, 15 Nov. 2000. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2000.18.22.3775>>.
- BAGERITZ, J. *et al.* Stem cell characteristics in glioblastoma are maintained by the ecto-nucleotidase E-NPP1. *Cell Death & Differentiation*, v. 21, n. 6, p. 929–940, 14 Jun. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cdd201412>>.
- BAO, Shideng *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, v. 444, n. 7120, p. 756–760, 18 Dec. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature05236>>.
- BARAUNA, S *et al.* Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, n. 1, p. 160–169, Sep. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305706002504>>.
- BARCZYK, Malgorzata; CARRACEDO, Sergio; GULLBERG, Donald. Integrins. *Cell and Tissue Research*, v. 339, n. 1, p. 269–280, 20 Jan. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00441-009-0834-6>>.
- BARROSO-NETO, Ito Liberato *et al.* Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 543, p. 31–39, Feb. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986113003718>>.
- BARTH, Rolf F.; KAUR, Balveen. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9,

- RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 94, n. 3, p. 299–312, 21 Sep. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-009-9875-7>>.
- BATASH, Ron *et al.* Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 27, p. 3002–3009, 21 Sep. 2017. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/152454/article>>.
- BATISTA, JEC *et al.* Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Phytomedicine*, v. 25, p. 52–60, Feb. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711316302525>>.
- BENDA, Philippe *et al.* Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science*, v. 161, n. 3839, p. 370–371, 26 Jul. 1968. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.161.3839.370>>.
- BENDAS, Gerd; BORSIG, Lubor. Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *International Journal of Cell Biology*, v. 2012, p. 1–10, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2012/676731/>>.
- BENNETT, B. L. *et al.* SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 24, p. 13681–13686, 20 Nov. 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.251194298>>.
- BERANEK, David T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 231, n. 1, p. 11–30, Jul. 1990. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0027510790901732>>.
- BETIN, Virginie M. S.; LANE, Jon D. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of Cell Science*, v. 122, n. 14, p. 2554–2566, 15 Jul. 2009. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/jcs/article/122/14/2554/30856/Caspase-cleavage-of-Atg4D-stimulates-GABARAP-L1>>.
- BEZERRA, Maria Júlia Barbosa *et al.* Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, n. 4, p. 807–815, Apr. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272513000228>>.
- BHAT, Punya *et al.* Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochemical Pharmacology*, v. 147, p. 170–182, Jan. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295217307025>>.
- BHUTIA, Sujit K. *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. *Pharmacological Research*, v. 144, n. January, p. 8–18, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.001>>.
- BIES, Christiane; LEHR, Claus-Michael; WOODLEY, John F. Lectin-mediated drug targeting: history and

- applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 4, p. 425–435, 3 Mar. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X0300228X>>.
- BIGNAMI, M. *et al.* Unmasking a killer: DNA O6-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 462, n. 2–3, p. 71–82, Apr. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574200000168>>.
- BIRBRAIR, Alexander. *2017_Book_StemCellMicroenvironmentsAndBe*. [S.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-69194-7_2>.
- BIRK, Harjus S.; HAN, Seunggu J.; BUTOWSKI, Nicholas A. Treatment options for recurrent high-grade gliomas. *CNS Oncology*, v. 6, n. 1, p. 61–70, Jan. 2017. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/cns-2016-0013>>.
- BITTENCOURT, Lucas Felipe Fernandes *et al.* Novel synthetic chalcones induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Chemico-biological interactions*, v. 252, p. 74–81, 25 May 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279716300928>>.
- BOOTH, Laurence A. *et al.* The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Cellular Signalling*, v. 26, n. 3, p. 549–555, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.028>>.
- BORTUL, R. *et al.* Constitutively active Akt1 protects HL60 leukemia cells from TRAIL-induced apoptosis through a mechanism involving NF- κ B activation and cFLIPL up-regulation. *Leukemia*, v. 17, n. 2, p. 379–389, 18 Feb. 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/2402793>>.
- BOWMAN, Robert L *et al.* Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Reports*, v. 17, n. 9, p. 2445–2459, Nov. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716314723>>.
- BRAVO-SAN PEDRO, José M *et al.* The MAPK1/3 pathway is essential for the deregulation of autophagy observed in G2019S LRRK2 mutant fibroblasts. *Autophagy*, v. 8, n. 10, p. 1537–1539, 16 Oct. 2012. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kaup20>>.
- BRENNAN, Cameron W. *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, v. 155, n. 2, p. 462–477, Oct. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413012087>>.
- BRINDA, K.V. *et al.* Determinants of quaternary association in legume lectins. *Protein Science*, v. 13, n. 7, p. 1735–1749, Jul. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1110/ps.04651004>>.
- BROOKS, SA; LEATHEM, AJC. Expression of alpha-GalNAc glycoproteins by breast cancers. *British Journal of Cancer*, v. 71, n. 5, p. 1033–1038, May 1995. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc1995199>>. Acesso em: 13 jun. 2021.
- BRYUKHOVETSKIY, Igor *et al.* Alkaloids of fascaplysin are effective conventional chemotherapeutic drugs, inhibiting the proliferation of C6 glioma cells and causing their death in vitro. *Oncology Letters*, v. 13, n. 2, p. 738–746, Feb. 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.5478>>.
- BUONFIGLIOLI, Alice; HAMBARDZUMYAN, Dolores. Macrophages and microglia: the cerberus of

- glioblastoma. *Acta Neuropathologica Communications*, v. 9, n. 1, p. 54, 25 Dec. 2021. Disponível em: <<https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-021-01156-z>>.
- BURCHELL, Brian. Genetic Variation of Human UDP-Glucuronosyltransferase. *American Journal of Pharmacogenomics*, v. 3, n. 1, p. 37–52, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2165/00129785-200303010-00006>>.
- CAIRNCROSS, Gregory *et al.* Phase III Trial of Chemotherapy Plus Radiotherapy Compared With Radiotherapy Alone for Pure and Mixed Anaplastic Oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, n. 18, p. 2707–2714, 20 Jun. 2006. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.04.3414>>.
- CALATOZZOLO, Chiara *et al.* Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. *Cancer Biology & Therapy*, v. 11, n. 2, p. 242–253, 15 Jan. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.11.2.13951>>.
- CANOVAS, Begoña; NEBREDÁ, Angel R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 22, n. 5, p. 346–366, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-00322-w>>.
- CASTEDO, Maria *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, v. 23, n. 16, p. 2825–2837, 12 Apr. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1207528>>.
- CAVADA, B. *et al.* Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. *Current Protein & Peptide Science*, v. 2, n. 2, p. 123–135, 1 Jun. 2001. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=2&issue=2&spage=123>>.
- CAVADA, B.S. *et al.* LECTIN FROM *Dioclea guianensis* var. *lasiophylla* Duke seed mobilization during germination and seedling growth in the dark. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, v. 6, n. 1, p. 21–25, 1994.
- CAVADA, Benildo *et al.* ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 1, p. 30, 21 Dec. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/20/1/30>>.
- CAVADA, Benildo Sousa *et al.* *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 106, p. 369–378, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023>>.
- CAVADA, Benildo Sousa; OSTERNE, Vinicius Jose Silva; PINTO-JUNIOR, Vanir Reis; *et al.* ConBr, the Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Seeds: Forty Years of Research. *Current Protein & Peptide Science*, v. 20, n. 6, p. 600–613, 20 May 2019. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/168767/article>>.
- CAVADA, Benildo Sousa; OSTERNE, Vinicius Jose Silva; LOSSIO, Claudia Figueiredo; *et al.* One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 134, p. 901–911, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100>>.

CHAKRABORTY, Ashok K.; PAWELEK, J. M. GnT-V, macrophage and cancer metastasis: a common link. *Clinical & experimental metastasis*, v. 20, n. 4, p. 365–73, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12856724>>.

CHALMERS, Anthony J. *et al.* Cytotoxic Effects of Temozolomide and Radiation are Additive- and Schedule-Dependent. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, v. 75, n. 5, p. 1511–1519, Dec. 2009. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301609027990>>.

CHANG, Chih-Peng *et al.* Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology*, v. 45, n. 2, p. 286–296, Feb. 2007. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.21509>>.

CHAO, Chuan-Chuan *et al.* Induction of neural differentiation in rat C6 glioma cells with taxol. *Brain and Behavior*, v. 5, n. 12, p. 1–10, 26 Dec. 2015. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/brb3.414>>.

CHEN, Chu; LOU, Tao. Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, v. 8, n. 28, p. 46691–46703, 11 Jul. 2017. Disponível em:

<<https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.17358>>.

CHEN, Dongshi; YU, Jian; ZHANG, Lin. Necroptosis: An alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1865, n. 2, p. 228–236, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.03.003>>.

CHEN, J. Novel Regulatory Mechanisms of mTOR Signaling. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. [S.l: s.n.], 2004. v. 279. p. 245–257. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-18930-2_14>.

CHEN, James L *et al.* Autophagy Induction Results in Enhanced Anoikis Resistance in Models of Peritoneal Disease. *Molecular Cancer Research*, v. 15, n. 1, p. 26–34, Jan. 2017. Disponível em:

<<http://mcr.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1541-7786.MCR-16-0200-T>>.

CHEN, Long *et al.* ABCG2 downregulation in glioma stem cells enhances the therapeutic efficacy of demethoxycurcumin. *Oncotarget*, v. 8, n. 26, p. 43237–43247, 27 Jun. 2017. Disponível em:

<<https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.18018>>.

CHEN, Qi; KANG, Jian; FU, Caiyun. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 3, n. 1, p. 18, 1 Dec. 2018. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/s41392-018-0018-5>>. Acesso em: 28 may 2021.

CHEN, Wen-Liang *et al.* Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. *Oncotarget*, v. 6, n. 18, p. 16321–16340, 30 Jun. 2015. Disponível em:

<<https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.3872>>.

CHEN, Yanzhao *et al.* ISG12a inhibits HCV replication and potentiates the anti-HCV activity of IFN- α through activation of the Jak/STAT signaling pathway independent of autophagy and apoptosis. *Virus*

- Research*, v. 227, p. 231–239, 2017. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.013>>.
- CHEN, Zhu *et al.* MAP Kinases. *Chemical Reviews*, v. 101, n. 8, p. 2449–2476, Aug. 2001. Disponível em:
<<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr000241p>>.
- CHERAY, Mathilde *et al.* Glycosylation-related gene expression is linked to differentiation status in glioblastomas undifferentiated cells. *Cancer Letters*, v. 312, n. 1, p. 24–32, Dec. 2011. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383511004526>>.
- CHERRY, A.E.; STELLA, N. G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: Emerging therapeutic avenues. *Neuroscience*, v. 278, p. 222–236, Oct. 2014. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452214006897>>.
- CHINNADURAI, G.; VIJAYALINGAM, S.; GIBSON, S. B. BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene*, v. 27, n. S1, p. S114–S127, 30 Dec. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/onc200949>>.
- CHO, YoungSik *et al.* Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*, v. 137, n. 6, p. 1112–1123, Jun. 2009. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409006424>>.
- CLARK, Michael James *et al.* U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line. *PLoS Genetics*, v. 6, n. 1, p. e1000832, 29 Jan. 2010. Disponível em:
<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000832>>.
- COOPER, GM (Boston University). *The Development of cancer*. 2. ed. [S.l.]: Sinauer Associates, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>>.
- COOPER, Katrina F. Till Death Do Us Part: The Marriage of Autophagy and Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, p. 1–13, 2018. Disponível em:
<<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/4701275/>>.
- CORREIA, Jorge Luis Almeida *et al.* Molecular Characterization and Tandem Mass Spectrometry of the Lectin Extracted from the Seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. *Molecules*, v. 16, n. 11, p. 9077–9089, 28 Oct. 2011. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/16/11/9077>>.
- CORY, Suzanne; ADAMS, Jerry M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 9, p. 647–656, Sep. 2002. Disponível em:
<<http://www.nature.com/articles/nrc883>>.
- CUI, Ning; HU, Min; KHALIL, Raouf A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. [S.l.: s.n.], 2017. p. 1–73. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117317300327>>.
- D'HAENE, Nicky *et al.* Galectins and neovascularization in central nervous system tumors. *Glycobiology*, v. 24, n. 10, p. 892–898, 1 Oct. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwu049>>.
- DAL-CIM, Tharine *et al.* Guanosine prevents oxidative damage and glutamate uptake impairment induced by

- oxygen/glucose deprivation in cortical astrocyte cultures: involvement of A1 and A2A adenosine receptors and PI3K, MEK, and PKC pathways. *Purinergic Signalling*, v. 15, n. 4, p. 465–476, 13 Dec. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11302-019-09679-w>>.
- DAN, Han C; ANTONIA, Ricardo J; BALDWIN, Albert S. PI3K/Akt promotes feedforward mTORC2 activation through IKK α . *Oncotarget*, v. 7, n. 16, p. 21064–21075, 19 Apr. 2016. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget>.
- DANIAL, Nika N.; KORSMEYER, Stanley J. Cell Death. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 205–219, Jan. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404000467>>.
- DARD, L. *et al.* RAS signalling in energy metabolism and rare human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1859, n. 9, p. 845–867, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.003>>.
- DAWSON, G.; MOSKAL, J. R.; DAWSON, S. A. Transfection of 2,6 and 2,3-sialyltransferase genes and GlcNAc-transferase genes into human glioma cell line U-373 MG affects glycoconjugate expression and enhances cell death. *Journal of Neurochemistry*, v. 89, n. 6, p. 1436–1444, 29 Jun. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.2004.02435.x>>.
- DE ÁVILA, Maurício Boff *et al.* Supervised machine learning techniques to predict binding affinity. A study for cyclin-dependent kinase 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 494, n. 1–2, p. 305–310, 9 Dec. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X17320053>>. Acesso em: 29 mar. 2021.
- DE MEJÍA, Elvira González; PRISECARU, Valentin I. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45, n. 6, p. 425–445, Sep. 2005. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390591034445>>.
- DE OLIVEIRA FIGUEIROA, Evelyne *et al.* Lectin-Carbohydrate Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 34, 17 Nov. 2017. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/152641/article>>.
- DE PAUL, Ana Lucía *et al.* Neuropeptide glutamic-isoleucine (NEI) specifically stimulates the secretory activity of gonadotrophs in primary cultures of female rat pituitary cells. *Peptides*, v. 30, n. 11, p. 2081–2087, Nov. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019697810900357X>>.
- DEBERARDINIS, Ralph J.; CHANDEL, Navdeep S. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, v. 2, n. 5, p. e1600200, 1 May 2016. Disponível em: <<http://choicereviews.org/review/10.5860/CHOICE.43-2837>>.
- DEGTYAREV, Michael; REICHEL, Mike; LIN, Kui. Novel Quantitative Autophagy Analysis by Organelle Flow Cytometry after Cell Sonication. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. e87707, 29 Jan. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0087707>>.
- DENNY, Brian J. *et al.* NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. *Biochemistry*, v. 33, n. 31, p. 9045–

- 9051, Aug. 1994. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00197a003>>.
- DI PIETRO, Giuliano; MAGNO, Luiz Alexandre V.; RIOS-SANTOS, Fabrício. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 6, n. 2, p. 153–170, 17 Feb. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425250903427980>>.
- DIANOV, Grigory L.; HÜBSCHER, Ulrich. Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 6, p. 3483–3490, Apr. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt076>>.
- DICKINSON, Robin J.; KEYSE, Stephen M. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of Cell Science*, v. 119, n. 22, p. 4607–4615, 15 Nov. 2006. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/jcs/article/119/22/4607/29429/Diverse-physiological-functions-for-dual>>.
- DIKIC, Ivan; ELAZAR, Zvulun. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 6, p. 349–364, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>>.
- DJAVAHERI-MERGNY, M; MAIURI, M C; KROEMER, G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*, v. 29, n. 12, p. 1717–1719, 25 Mar. 2010. Disponível em: <www.nature.com/onc>.
- DONTA, S.T. The growth of functional rat glial cells in a serumless medium. *Experimental Cell Research*, v. 82, n. 1, p. 119–124, Nov. 1973. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014482773902528>>.
- DRESEMANN, Gregor. Temozolomide in malignant glioma. *OncoTargets and Therapy*, v. 3, p. 139, Jul. 2010. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/temozolomide-in-malignant-glioma-peer-reviewed-article-OTT>>.
- DRICKAMER, Kurt; TAYLOR, Maureen E. Biology of Animal Lectins. *Annual Review of Cell Biology*, v. 9, n. 1, p. 237–264, Nov. 1993. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cb.09.110193.001321>>.
- DRINNAN, N.; HALLIDAY, J.; RAMSDALE, T. Inhibitors of Sialyltransferases: Potential Roles in Tumor Growth and Metastasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 3, n. 6, p. 501–517, 1 Sep. 2003. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=3&issue=6&spage=501>>.
- EHTESHAM, Moneeb *et al.* The role of the CXCR4 cell surface chemokine receptor in glioma biology. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 113, n. 2, p. 153–162, 14 Jun. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-013-1108-4>>.
- ENGELHARDT, Britta; VAJKOCZY, Peter; WELLER, Roy O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature Immunology*, v. 18, n. 2, p. 123–131, 16 Feb. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni.3666>>.

- ENGELWARD, Bevin P. *et al.* A Chemical and Genetic Approach Together Define the Biological Consequences of 3-Methyladenine Lesions in the Mammalian Genome. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 9, p. 5412–5418, Feb. 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925817471274>>.
- ERSAHIN, Tulin; TUNCBAG, Nurcan; CETIN-ATALAY, Rengul. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular BioSystems*, v. 11, n. 7, p. 1946–1954, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5MB00101C>>.
- ESTRADA, Yeriel; DONG, Jianli; OSSOWSKI, Liliana. Positive crosstalk between ERK and p38 in melanoma stimulates migration and in vivo proliferation. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 22, n. 1, p. 66–76, Feb. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-148X.2008.00520.x>>.
- FAHEINA-MARTINS, Glaucia V. *et al.* Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 26, n. 7, p. 1161–1169, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.017>>.
- FAN, Qi-wen *et al.* A Dual Phosphoinositide-3-Kinase α /mTOR Inhibitor Cooperates with Blockade of Epidermal Growth Factor Receptor in PTEN -Mutant Glioma. *Cancer Research*, v. 67, n. 17, p. 7960–7965, 1 Sep. 2007. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-2154>>.
- FIANCO, G.; CENCI, C.; BARILÀ, D. Caspase-8 expression and its Src-dependent phosphorylation on Tyr380 promote cancer cell neoplastic transformation and resistance to anoikis. *Experimental Cell Research*, v. 347, n. 1, p. 114–122, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.07.013>>.
- FIDLER, Isaiah J. *et al.* The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *The Lancet Oncology*, v. 3, n. 1, p. 53–57, Jan. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204501006222>>.
- FLORES, Andréia Silva; RODRIGUES, Rodrigo Schütz. First occurrence of *Dioclea ruddiae* Maxwell (Leguminosae) in Brazil. *Hoehnea*, v. 44, n. 4, p. 607–610, Dec. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2236-89062017000400607&lng=en&tlng=en>.
- FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560055>>.
- FREDERIK H. IGNEY & PETER H. KRAMMER. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis : Nature Reviews Cancer. *Nature Review Cancer* 2, v. 2, n. April, p. 277–288, 2002. Disponível em: <http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n4/fig_tab/nrc776_F4.html>.
- FRONZA, Gilberto; GOLD, Barry. The biological effects of N3-methyladenine. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 91, n. 2, p. 250–257, 1 Feb. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.10698>>.

- FRUEHAUF, John P. *et al.* In vitro Drug Response and Molecular Markers Associated with Drug Resistance in Malignant Gliomas. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 15, p. 4523–4532, 1 Aug. 2006. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-1830>>.
- FU, Lei-lei; CHENG, Yan; LIU, Bo. Beclin-1: Autophagic regulator and therapeutic target in cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, n. 5, p. 921–924, May 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272513000472>>.
- FUSTER, Mark M.; ESKO, Jeffrey D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 7, p. 526–542, Jul. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc1649>>.
- GALLAND, Fabiana *et al.* Astrocyte culture models: Molecular and function characterization of primary culture, immortalized astrocytes and C6 glioma cells. *Neurochemistry International*, v. 131, p. 104538, Dec. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018619302645>>.
- GALLIA, Gary L. *et al.* Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 8, n. 2, p. 386–393, Feb. 2009. Disponível em: <<http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-08-0680>>.
- GALLUZZI, L *et al.* No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death & Differentiation*, v. 15, n. 7, p. 1113–1123, 29 Jul. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.
- GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*, v. 34, n. 7, p. 856–880, 23 Apr. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.201490784>>.
- GALLUZZI, Lorenzo *et al.* Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 12, n. 1, p. 103–130, 24 Jan. 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-052016-100247>>.
- GANCZ, Dana; DONIN, Natalie; FISHELSON, Zvi. Involvement of the c-jun N-terminal kinases JNK1 and JNK2 in complement-mediated cell death. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 2–3, p. 310–317, Dec. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589009007184>>.
- GAZITT, Y. TRAIL is a potent inducer of apoptosis in myeloma cells derived from multiple myeloma patients and is not cytotoxic to hematopoietic stem cells. *Leukemia*, v. 13, n. 11, p. 1817–1824, 3 Nov. 1999. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/2401501>>.
- GOFFART, Nicolas; KROONEN, Jérôme; ROGISTER, Bernard. Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment. *Cancers*, v. 5, n. 4, p. 1049–1071, 14 Aug. 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6694/5/3/1049>>.
- GÓMEZ-FERNÁNDEZ, Juan C. Functions of the C-terminal domains of apoptosis-related proteins of the Bcl-2 family. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 183, p. 77–90, Oct. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308414000656>>.

- GRAEBER, Manuel B; SCHEITHAUER, Bernd W; KREUTZBERG, Georg W. Microglia in brain tumors. *Glia*, v. 40, n. 2, p. 252–259, Nov. 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.10147>>.
- GRANGEIRO, Thalles B. *et al.* Molecular Cloning and Characterization of ConBr, the Lectin of *Canavalia Brasiliensis* Seeds. *European Journal of Biochemistry*, v. 248, n. 1, p. 43–48, 15 Aug. 1997. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1997.00043.x>>.
- GREENE-SCHLOESSER, Dana *et al.* Radiation-induced brain injury: A review. *Frontiers in Oncology*, v. 2, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00073/abstract>>.
- GRIFFITH, Thomas *et al.* TRAIL Gene Therapy: From Preclinical Development to Clinical Application. *Current Gene Therapy*, v. 9, n. 1, p. 9–19, 1 Feb. 2009. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1566-5232&volume=9&issue=1&spage=9>>.
- GRIVICICH, Ivana; REGNER, Andréa; DA ROCHA, Adriana Brondani. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancrologia*, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf>.
- GROBBEN, Bert; DE DEYN, Peter; SLEGGERS, Herman. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell and Tissue Research*, v. 310, n. 3, p. 257–270, 1 Dec. 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00441-002-0651-7>>.
- GUAN, Xiudong *et al.* Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Molecular Neurobiology*, v. 55, n. 8, p. 6927–6938, 23 Aug. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12035-018-0880-8>>.
- GUDIPATY, Swapna A. *et al.* Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 34, n. 1, p. 311–332, 6 Oct. 2018. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-100616-060748>>.
- GUERRERO-ZOTANO, Angel; MAYER, Ingrid A.; ARTEAGA, Carlos L. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 35, n. 4, p. 515–524, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10555-016-9637-x>>.
- GUERTIN, David A.; SABATINI, David M. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*, v. 12, n. 1, p. 9–22, Jul. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610807001511>>.
- GUPTA, G. S. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. Vienna: Springer Vienna, 2012. v. 9783709110. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1065-2>>.
- HAEUSGEN, W. *et al.* Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain. *Neuroscience*, v. 161, n. 4, p. 951–959, Jul. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452209006083>>.
- HAGEMANN, Carsten. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World Journal of Clinical Oncology*, v. 3, n. 5, p. 67, 2012. Disponível em:

<<http://www.wjgnet.com/2218-4333/full/v3/i5/67.htm>>.

- HAKOMORI, Senitiroh. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 16, p. 10231–10233, 6 Aug. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149519>>. Acesso em: 30 mar. 2021.
- HAMBARDZUMYAN, Dolores; GUTMANN, David H.; KETTENMANN, Helmut. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience*, v. 19, n. 1, p. 20–27, 29 Jan. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.4185>>.
- HAN, Jiahuai; WU, Jianfeng; SILKE, John. An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling. *F1000Research*, v. 9, p. 653, 29 Jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.12688/f1000research.22092.1>>. Acesso em: 3 jun. 2021.
- HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>.
- HANAHAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0092867400816839?token=240B8D386F4388390F71EC99FF69580703294ED53D38CCA2C0F001DB135C0F42672A43918813C15EFDD4FA05AC3EA2DD&originRegion=us-east-1&originCreation=20210331122250>>.
- HANDERSON, Tamara *et al.* β 1,6-Branched Oligosaccharides Are Increased in Lymph Node Metastases and Predict Poor Outcome in Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 8, p. 2969–2973, 15 Apr. 2005. Disponível em: <www.aacrjournals.org>.
- HANIF, Farina *et al.* Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28239999>>.
- HARA, Kenta *et al.* Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. *Cell*, v. 110, n. 2, p. 177–189, Jul. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402008334>>.
- HAY, Michael *et al.* Clinical_Dev_Success_Rates_for_Invdrugs_Hay_Thomas_Craighead_Economides_Rosenthal_Nature_2014. *Nature Biotechnology*, v. 32, n. 1, p. 40–51, 2014.
- HAYASHI, Keiichiro *et al.* Fluvoxamine, an anti-depressant, inhibits human glioblastoma invasion by disrupting actin polymerization. *Scientific Reports*, v. 6, n. July 2015, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep23372>>.
- HE, Congcong; LEVINE, Beth. The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 22, n. 2, p. 140–149, Apr. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067410000037>>.
- HECK, Gabriela S. *et al.* Supervised Machine Learning Methods Applied to Predict Ligand- Binding Affinity. *Current Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 23, p. 2459–2470, 11 Sep. 2017. Disponível em:

<<http://www.eurekaselect.com/153566/article>>.

- HENDGEN-COTTA, Ulrike *et al.* Cytosolic BNIP3 Dimer Interacts with Mitochondrial BAX Forming Heterodimers in the Mitochondrial Outer Membrane under Basal Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, p. 687, 23 Mar. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/18/4/687>>.
- HENNESSY, Bryan T *et al.* Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 12, p. 988–1004, Dec. 2005. Disponível em: <www.nature.com/reviews/drugdisc>.
- HENTSCHEL, Stephen J.; LANG, Frederick F. Current surgical management of glioblastoma. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, v. 9, n. 2, p. 113–25, Mar. 2003. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00130404-200303000-00007>>.
- HERMISSON, Mirjam *et al.* O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 96, n. 3, p. 766–776, Feb. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2005.03583.x>>.
- HERNANDEZ, Joseph D.; BAUM, Linda G. Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. *Glycobiology*, v. 12, n. 10, p. 127R-136R, 1 Oct. 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwf081>>.
- HERVEY-JUMPER, Shawn L.; BERGER, Mitchel S. Role of Surgical Resection in Low- and High-Grade Gliomas. *Current Treatment Options in Neurology*, v. 16, n. 4, p. 284, 5 Apr. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11940-014-0284-7>>.
- HEYNCKES, Sabrina *et al.* Crosslink between Temozolomide and PD-L1 immune-checkpoint inhibition in glioblastoma multiforme. *BMC Cancer*, v. 19, n. 1, p. 117, 1 Dec. 2019. Disponível em: <<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5308-y>>.
- HIDESHIMA, Teru *et al.* Biologic sequelae of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) activation in multiple myeloma cell lines. *Oncogene*, v. 22, n. 54, p. 8797–8801, 27 Nov. 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1206919>>.
- HOARAU-VÉCHOT, Jessica *et al.* Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 1, p. 181, 18 Jan. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/181>>.
- HONG, Jing Fang *et al.* Anticancer activity of taraxerol acetate in human glioblastoma cells and a mouse xenograft model via induction of autophagy and apoptotic cell death, cell cycle arrest and inhibition of cell migration. *Molecular Medicine Reports*, v. 13, n. 6, p. 4541–4548, 2016.
- HOU, Wen *et al.* Autophagic degradation of active caspase-8. *Autophagy*, v. 6, n. 7, p. 891–900, 27 Oct. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.6.7.13038>>.
- HOUEL-RENAULT, Ludivine *et al.* Autophagy is used as a survival program in unfertilized sea urchin eggs that are destined to die by apoptosis after inactivation of MAPK1/3 (ERK2/1). *Autophagy*, v. 9, n. 10, p. 1527–1539, 25 Oct. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4161/auto.25712>>.

- HUANG, Jingxiang; MANNING, Brendan D. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochemical Society Transactions*, v. 37, n. 1, p. 217–222, 1 Feb. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.
- HWANG, Soo-Yeon; PARK, Seojeong; KWON, Youngjoo. Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 199, p. 30–57, Jul. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.006>>.
- ITOH, Naoto *et al.* The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, v. 66, n. 2, p. 233–243, Jul. 1991. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867491906145>>.
- IVANOV, Vladimir N.; WU, Jinhua; HEI, Tom K. Regulation of human glioblastoma cell death by combined treatment of cannabidiol, γ -radiation and small molecule inhibitors of cell signaling pathways. *Oncotarget*, v. 8, n. 43, p. 74068–74095, 26 Sep. 2017. Disponível em: <<https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.18240>>.
- JACOBS, Valerie L. *et al.* Current Review of in Vivo GBM Rodent Models: Emphasis on the CNS-1 Tumour Model. *ASN Neuro*, v. 3, n. 3, p. AN20110014, 8 Jul. 2011. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1042/AN20110014>>.
- JACQUES, Amanda V. *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. *Neurochemistry International*, v. 62, n. 6, p. 836–842, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.020>>.
- JAN, Yiwen *et al.* A Mitochondrial Protein, Bit1, Mediates Apoptosis Regulated by Integrins and Groucho/TLE Corepressors. *Cell*, v. 116, n. 5, p. 751–762, Mar. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404002041>>.
- JANES, Sam M; WATT, Fiona M. Switch from $\alpha\beta 5$ to $\alpha\beta 6$ integrin expression protects squamous cell carcinomas from anoikis. *Journal of Cell Biology*, v. 166, n. 3, p. 419–431, 2 Aug. 2004. Disponível em: <<http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200312074>>.
- JEONG, Hyo-Soon *et al.* Involvement of caspase-9 in autophagy-mediated cell survival pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1813, n. 1, p. 80–90, Jan. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488910002570>>. Acesso em: 30 may 2021.
- JHANWAR-UNIYAL, Meena *et al.* Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Advances in Biological Regulation*, v. 72, n. February, p. 51–62, May 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.03.003>>.
- JIANG, Li-Cheng *et al.* Inhibition of autophagy augments apoptosis in human oral squamous cell carcinoma under nutrient depletion. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 44, n. 5, p. 361–366, May 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jop.12250>>.
- JIANG, Q.-L. *et al.* Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Proliferation*, v. 48, n. 1, p. 17–28, Feb. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.12155>>.

- JIANG, W.G. *et al.* Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology*, v. 35, p. S244–S275, Dec. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X15000231>>.
- JIANG, Xiao Ning *et al.* Role and regulation mechanism of Gal-3 in non-small cell lung cancer and its potential clinical therapeutic significance. *Chemico-Biological Interactions*, v. 309, n. 44, p. 108724, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108724>>.
- JUNG, Kwang Hwa *et al.* Histone deacetylase 6 functions as a tumor suppressor by activating c-Jun NH2-terminal kinase-mediated beclin 1-dependent autophagic cell death in liver cancer. *Hepatology*, v. 56, n. 2, p. 644–657, Aug. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.25699>>.
- JURATLI, Tareq A.; SCHACKERT, Gabriele; KREX, Dietmar. Current status of local therapy in malignant gliomas — A clinical review of three selected approaches. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 139, n. 3, p. 341–358, Sep. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725813001186>>.
- KAINA, Bernd *et al.* MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair*, v. 6, n. 8, p. 1079–1099, Aug. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786407001243>>.
- KANE, J. Robert. The Role of Brain Vasculature in Glioblastoma. *Molecular Neurobiology*, v. 56, n. 9, p. 6645–6653, 2019.
- KANG, R *et al.* The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, v. 18, n. 4, p. 571–580, 11 Apr. 2011. Disponível em: <www.nature.com/cdd>.
- KANZAWA, T. *et al.* Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death & Differentiation*, v. 11, n. 4, p. 448–457, 9 Apr. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/4401359>>.
- KARRA, Aroon S; COBB, Melanie H. *MAP Kinase Pathways: Functions and Modulation Tocris Scientific Review Series. Tocris Scientific Review Series.* [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: <<https://resources.tocris.com/pdfs/literature/reviews/mapk-review-2016.pdf>>.
- KATZUNG, Bertram G.; MASTERS, Susan B.; TREVOR, Anthony J. *Basic and Clinical Pharmacology.* 12. ed. United States of America: [s.n.], 2012. Disponível em: <<https://medstudentscorner.com/tag/basic-clinical-pharmacology-15th-edition-pdf/>>.
- KHASRAW, Mustafa; LASSMAN, Andrew B. Advances in the Treatment of Malignant Gliomas. *Current Oncology Reports*, v. 12, n. 1, p. 26–33, 5 Jan. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11912-009-0077-4>>.
- KIM, Do-Hyung *et al.* mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell*, v. 110, n. 2, p. 163–175, 26 Jul. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402008085>>. Acesso em: 3 jun. 2021.
- KIM, L C; COOK, R S; CHEN, J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*, v. 36, n. 16, p. 2191–2201, 17 Apr. 2017. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/onc2016363>>.

- KINSELLA, Timothy J. Coordination of DNA Mismatch Repair and Base Excision Repair Processing of Chemotherapy and Radiation Damage for Targeting Resistant Cancers. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 6, p. 1853–1859, 15 Mar. 2009. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-08-1307>>.
- KLEIHUES, Paul; SOBIN, Leslie H. World Health Organization classification of tumors. *Cancer*, v. 88, n. 12, p. 2887–2887, 15 Jun. 2000. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(20000615\)88:12%3C2887::AID-CNCR32%3E3.0.CO;2-F](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(20000615)88:12%3C2887::AID-CNCR32%3E3.0.CO;2-F)>.
- KOGEL, Donat; FULDA, Simone; MITTELBRONN, Michel. Therapeutic Exploitation of Apoptosis and Autophagy for Glioblastoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 6, p. 438–449, 1 Jul. 2010. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/72519/article>>.
- KONDOH, Kunio; NISHIDA, Eisuke. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 8, p. 1227–1237, 1 Aug. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488906004538>>. Acesso em: 7 jun. 2021.
- KORB, Oliver; STÜTZLE, Thomas; EXNER, Thomas E. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n. 1, p. 84–96, 26 Jan. 2009. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ci800298z>>.
- KRAMER, Nina *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 752, n. 1, p. 10–24, Jan. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574212000464>>.
- KUKKONEN-MACCHI, Anu *et al.* Loss of p38 γ MAPK induces pleiotropic mitotic defects and massive cell death. *Journal of Cell Science*, v. 124, n. 2, p. 216–227, 15 Jan. 2011. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/jcs/article/124/2/216/31875/Loss-of-p38-MAPK-induces-pleiotropic-mitotic>>.
- KUMAR A, Ajaya; ABRAHAM KOSHY, Abu. Regression of Recurrent High-Grade Glioma with Temozolomide, Dexamethasone, and Levetiracetam: Case Report and Review of the Literature. *World Neurosurgery*, v. 108, p. 990.e11-990.e16, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.08.136>>.
- KUMAR, Ankit *et al.* JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases. *Future Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 15, p. 2065–2086, Oct. 2015. Disponível em: <<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.15.132>>.
- KUMAR, Anupma *et al.* Increased Sequestration of Matrix Metalloproteinases in Ageing Human Bruch's Membrane: Implications for ECM Turnover. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 51, n. 5, p. 2664, 1 May 2010. Disponível em: <<http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.09-4195>>.
- KUMTHEKAR, Priya *et al.* A phase II trial of arsenic trioxide and temozolomide in combination with

- radiation therapy for patients with malignant gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 133, n. 3, p. 589–594, 16 Jul. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-017-2469-x>>.
- KWON, Taek-Hyun *et al.* Primary glioblastoma multiforme of medulla oblongata: Case report and review of literature. *Asian Journal of Neurosurgery*, v. 7, n. 1, p. 36, 2012. Disponível em: <<http://www.asianjns.org/text.asp?2012/7/1/36/95697>>.
- LAEMMLI, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 15 Aug. 1970. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/227680a0>>.
- LALAOUI, Najoua *et al.* The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 39, p. 63–69, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.003>>.
- LANZETTA, Gaetano; MINNITI, Giuseppe. Treatment of Glioblastoma in Elderly Patients: An Overview of Current Treatments and Future Perspective. *Tumori Journal*, v. 96, n. 5, p. 650–658, 29 Sep. 2010. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/030089161009600502>>.
- LAWRENCE, C.P.; CHOW, S.C. Suppression of human T cell proliferation by the caspase inhibitors, z-VAD-FMK and z-IETD-FMK is independent of their caspase inhibition properties. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 265, n. 1, p. 103–112, Nov. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X12003985>>.
- LE MERCIER, Marie *et al.* Galectins and Gliomas. *Brain Pathology*, v. 20, n. 1, p. 17–27, Jan. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3639.2009.00270.x>>.
- LEAL, Rodrigo Bainy *et al.* Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, p. 64–76, Jul. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017342939>>.
- LEE, Jong-Soo *et al.* FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nature Cell Biology*, v. 11, n. 11, p. 1355–1362, 18 Nov. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncb1980>>.
- LEVIN, Maxim *et al.* Next generation matrix metalloproteinase inhibitors — Novel strategies bring new prospects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1864, n. 11, p. 1927–1939, Nov. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488917301611>>.
- LEVINE, Beth; KLIONSKY, Daniel J. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017.
- LI, D-D *et al.* The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene*, v. 28, n. 6, p. 886–898, 8 Feb. 2009. Disponível em: <www.nature.com/onc>.
- LI, Wen wen *et al.* Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 414,

- n. 2, p. 282–286, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.072>>.
- LI, Zhiyuan; ZHANG, Xin. Kinases Involved in Both Autophagy and Mitosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 9, p. 1884, 31 Aug. 2017. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/18/9/1884>>.
- LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329–333, 1 Feb. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2007.30>>.
- LIANG, Shumin; CHEN, Yijun; WANG, Kaifei. Culture of C6 glioma cells and establishment of model. *Anatomical Science*, v. 1, n. 1, p. 19–24, 7 Feb. 2018. Disponível em: <<http://systems.enpress-publisher.com/index.php/AS/article/view/307>>.
- LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. *Cell Death & Differentiation*, v. 20, n. 8, p. 976–986, 24 Aug. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.50>>.
- LIEBELT, Brandon D. *et al.* Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy. *Stem Cells International*, v. 2016, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7849890>>.
- LIEN, Evan C.; DIBBLE, Christian C.; TOKER, Alex. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 45, n. March, p. 62–71, Apr. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.007>>.
- LIM, Daniel A. *et al.* Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro-Oncology*, v. 9, n. 4, p. 424–429, 1 Oct. 2007. Disponível em: <<http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/9/4/424/1235666/Relationship-of-glioblastoma-multiforme-to-neural>>.
- LIN, Lin; BAEHRECKE, Eric H. Autophagy, cell death, and cancer. *Molecular & Cellular Oncology*, v. 2, n. 3, p. e985913, 3 Jul. 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/23723556.2014.985913>>.
- LINKE, Monika *et al.* mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Letters*, v. 591, n. 19, p. 3089–3103, Oct. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/1873-3468.12711>>.
- LIU, B.; WEN, X.; CHENG, Y. Survival or death: Disequilibrating the oncogenic and tumor suppressive autophagy in cancer. *Cell Death and Disease*, v. 4, n. 10, p. e892-11, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.422>>.
- LIU, Bo *et al.* Induction of apoptosis by Polygonatum odoratum lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1790, n. 8, p. 840–844, Aug. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416509001019>>.
- LIU, Bo; BIAN, He-jiao; BAO, Jin-ku. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, v. 287, n. 1, p. 1–12, Jan. 2010. Disponível em:

- <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383509003450>>.
- LIU, Bo; MIN, Ming-Wei; BAO, Jin-Ku. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. *Autophagy*, v. 5, n. 3, p. 432–433, 27 Apr. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.5.3.7924>>.
- LIU, He; SONG, Ni. Molecular Mechanism of Adult Neurogenesis and its Association with Human Brain Diseases. *Journal of Central Nervous System Disease*, v. 8, p. JCNSD.S32204, 20 Jan. 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/JCNSD.S32204>>.
- LIU, Jinsha; PANDYA, Priyanka; AFSHAR, Sepideh. Therapeutic Advances in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 4, p. 2008, 18 Feb. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/2008>>.
- LIU, Z. *et al.* Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? *Cell Proliferation*, v. 46, n. 5, p. n/a-n/a, Aug. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.12054>>.
- LOCKSHIN, Richard A; ZAKERI, Zahra. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, n. 7, p. 545–550, Jul. 2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35080097>>.
- LORIN, Séverine *et al.* Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signaling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy*, v. 6, n. 1, p. 153–154, 27 Jan. 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kaup20>>.
- LOUIS, David N. *et al.* The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, v. 114, n. 2, p. 97–109, 6 Aug. 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00401-007-0243-4>>.
- LOUIS, David N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, v. 131, n. 6, p. 803–820, 9 Jun. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00401-016-1545-1>>.
- LUM, Julian J.; DEBERARDINIS, Ralph J.; THOMPSON, Craig B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 6, p. 439–448, 13 Jun. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm1660>>.
- LYU, Su Yun; CHOI, Sang Ho; PARK, Won Bong. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Archives of Pharmacal Research*, v. 25, n. 1, p. 93–101, Feb. 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02975269>>.
- M. STRIK, Herwig *et al.* Glycobiology in Malignant Gliomas: Expression and Functions of Galectins and Possible Therapeutic Options. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 13, n. 11, p. 2299–2307, 1 Aug. 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2010&volume=13&issue=11&spage=2299>>.

- MA, S. *et al.* Analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in melanoma tumours in patients treated with dacarbazine-based chemotherapy. *Melanoma Research*, v. 12, n. 4, p. 335–342, Aug. 2002. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00008390-200208000-00005>>.
- MACKLER, B. F.; WOLSTENCROFT, R. A.; DUMONDE, D. C. Concanavalin A as an Inducer of Human Lymphocyte Mitogenic Factor. *Nature New Biology*, v. 239, n. 92, p. 139–142, Oct. 1972. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/newbio239139a0>>.
- MADHUSUDAN, Srinivasan; HICKSON, Ian D. DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *Trends in Molecular Medicine*, v. 11, n. 11, p. 503–511, Nov. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491405002066>>.
- MAIK-RACHLINE, Galia; SEGER, Rony. The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. *Drug Resistance Updates*, v. 25, p. 1–12, Mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2015.12.001>>.
- MALLADI, Srinivas *et al.* Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell*, v. 165, n. 1, p. 45–60, Mar. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416301271>>.
- MANNING, Brendan D.; TOKER, Alex. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, v. 169, n. 3, p. 381–405, 20 Apr. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417304130>>. Acesso em: 3 jun. 2021.
- MANNINO, Mariella; CHALMERS, Anthony J. Radioresistance of glioma stem cells: Intrinsic characteristic or property of the ‘microenvironment-stem cell unit’? *Molecular Oncology*, v. 5, n. 4, p. 374–386, Aug. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.molonc.2011.05.001>>.
- MAO, Hua *et al.* Deregulated Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Cancer Investigation*, v. 30, n. 1, p. 48–56, 31 Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07357907.2011.630050>>.
- MARAMPON, Francesco *et al.* MEK/ERK inhibitor U0126 affects in vitro and in vivo growth of embryonal rhabdomyosarcoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 8, n. 3, p. 543–551, Mar. 2009. Disponível em: <<http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-08-0570>>.
- MARQUES, Gabriela F.O. *et al.* Contribution of the carbohydrate-binding ability of Vatairea guianensis lectin to induce edematogenic activity. *Biochimie*, v. 140, p. 58–65, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.008>>.
- MARSHALL, John L. *Cancer Therapeutic Targets*. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1–2. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0717-2>>.
- MARTÍNEZ-LIMÓN, Adrián *et al.* The p38 pathway: From biology to cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 6, p. 1–18, 2020.
- MARTINEZ-LOPEZ, Nuria *et al.* Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nature Communications*, v. 4, p. 1–14, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3799>>.
- MARZO, Isabel; NAVAL, Javier. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochemical*

- Pharmacology*, v. 76, n. 8, p. 939–946, 2008.
- MASTERS, John R. HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 315–319, 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrc775>>.
- MAZALOVSKA, Milena; KOUOKAM, J. Calvin. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. *BioMed Research International*, v. 2020, p. 1–13, 15 May 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/1631394/>>.
- MESSAOUDI, Khaled; CLAVREUL, Anne; LAGARCE, Frédéric. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 7, p. 899–905, Jul. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135964461500080X>>.
- MICHEAU, Olivier. Regulation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Signaling by Glycosylation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p. 715, 2 Mar. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/715>>.
- MIELKE, Kirsten; HERDEGEN, Thomas. JNK and p38 stresskinases — degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, v. 61, n. 1, p. 45–60, May 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008299000428>>.
- MILDE-LANGOSCH, Karin *et al.* Relevance of β Gal- β GalNAc-containing glycans and the enzymes involved in their synthesis for invasion and survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 151, n. 3, p. 515–528, 15 Jun. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10549-015-3425-0>>.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Abc Do Câncer*. [S.l.: s.n.], 2013. v. 81.
- MITRA, Sankar. MGMT: A personal perspective. *DNA Repair*, v. 6, n. 8, p. 1064–1070, Aug. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786407001231>>.
- MIYATA, Haruo *et al.* Combination of a STAT3 inhibitor and an mTOR inhibitor against a temozolomide-resistant glioblastoma cell line. *Cancer Genomics and Proteomics*, v. 14, n. 1, p. 83–92, 2017.
- MIZUTANI, Yoichi *et al.* Downregulation of Smac/DIABLO Expression in Renal Cell Carcinoma and Its Prognostic Significance. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 3, p. 448–454, 20 Jan. 2005. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2005.02.191>>.
- MOLLINEDO, Faustino; GAJATE, C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, v. 8, n. 5, p. 413–50, Oct. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12975575>>.
- MOREIRA, Andrea Janz *et al.* Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis. *PLOS ONE*, v. 10, n. 12, p. e0144517, 11 Dec. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0144517>>.
- MOREIRA, R. A.; GAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, v. 26, n. 2, p. 113–120, Mar. 1984. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02902274>>.

- MORI, Noriko *et al.* The Tumor Microenvironment Modulates Choline and Lipid Metabolism. *Frontiers in Oncology*, v. 6, n. 262, p. 1–10, 22 Dec. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2016.00262/full>>.
- MORIWAKI, Kenta; SHINZAKI, Shinichiro; MIYOSHI, Eiji. GDP-mannose-4,6-dehydratase (GMDS) Deficiency Renders Colon Cancer Cells Resistant to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Receptor- and CD95-mediated Apoptosis by Inhibiting Complex II Formation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 50, p. 43123–43133, Dec. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820870288>>.
- MOSKAL, Joseph R.; KROES, Roger A.; DAWSON, Glyn. The glycobiology of brain tumors: disease relevance and therapeutic potential. *Expert Review of Neurotherapeutics*, v. 9, n. 10, p. 1529–1545, 9 Oct. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/ern.09.105>>.
- MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, Dec. 1983. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>>.
- MUKHOPADHYAY, Suman *et al.* The Enigma of Rapamycin Dosage. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 15, n. 3, p. 347–353, Mar. 2016. Disponível em: <<http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-15-0720>>.
- MUNDI, Prabhjot S. *et al.* AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 82, n. 4, p. 943–956, Oct. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bcp.13021>>.
- MUNSHI, Anupama; HOBBS, Marvette; MEYN, Raymond E. Clonogenic cell survival assay. *Methods in molecular medicine*, v. 110, p. 21–28, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15901923/>>.
- MURTHY, S S *et al.* Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, v. 88, p. 38–40, 2000. Disponível em: <www.karger.com/journals/ccg>.
- MUTTER, Nicole; STUPP, Roger. Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond? *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 6, n. 8, p. 1187–1204, 10 Aug. 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737140.6.8.1187>>.
- NAGANO, Nobuhisa *et al.* Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathologica*, v. 86, n. 2, p. 117–125, Jul. 1993. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00334878>>.
- NAGASAWA, Daniel T. *et al.* Temozolomide and Other Potential Agents for the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Neurosurgery Clinics of North America*, v. 23, n. 2, p. 307–322, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nec.2012.01.007>>.
- NAGELKERKE, Anika *et al.* Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: Molecular pathways controlling autophagy. *Seminars in Cancer Biology*, v. 31, p. 89–98, Apr. 2015. Disponível em:

- <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X1400073X>>.
- NAKANO, Katsunori; VOUSDEN, Karen H. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell*, v. 7, n. 3, p. 683–694, 1 Mar. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276501002143>>. Acesso em: 7 jun. 2021.
- NAMBIAR, Jyotsna *et al.* Anacardic acid inhibits gelatinases through the regulation of Spry2, MMP-14, EMMPRIN and RECK. *Experimental Cell Research*, v. 349, n. 1, p. 139–151, Nov. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482716303330>>.
- NANNI, Samuel Burke *et al.* Impact of Concanavalin-A-Mediated Cytoskeleton Disruption on Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Internalization and Cell Surface Expression in Glioblastomas. *Biomarkers in Cancer*, v. 8, p. BIC.S38894, 19 Jan. 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/BIC.S38894>>.
- NASCIMENTO, Ana Paula M. *et al.* Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 120, p. 566–577, Dec. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.106>>.
- NASCIMENTO, Ana Paula M. *et al.* Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 134, p. 660–672, Aug. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301930618X>>.
- NASCIMENTO, Kyria Santiago *et al.* Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 92, p. 79–89, Nov. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272517302406>>.
- NEWLANDS, ES *et al.* Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045: M&B 39831: NSC 362856). *British Journal of Cancer*, v. 65, n. 2, p. 287–291, Feb. 1992. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/bjc199257>>.
- NEWTON, Kim *et al.* Activity of Protein Kinase RIPK3 Determines Whether Cells Die by Necroptosis or Apoptosis. *Science*, v. 343, n. 6177, p. 1357–1360, 21 Mar. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1249361>>.
- NUTT, Catherine L; MATTHEWS, Russell T.; HOCKFIELD, Susan. Glial Tumor Invasion: A Role for the Upregulation and Cleavage of BEHAB/Brevican. *The Neuroscientist*, v. 7, n. 2, p. 113–122, 29 Apr. 2001. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/107385840100700206>>.
- OGUNRINU, Toyin Adeyemi; SONTHEIMER, Harald. Hypoxia Increases the Dependence of Glioma Cells on Glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 48, p. 37716–37724, Nov. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820467468>>.
- OH, Se-Jeong Jeong *et al.* Human U87 glioblastoma cells with stemness features display enhanced sensitivity to natural killer cell cytotoxicity through altered expression of NKG2D ligand. *Cancer Cell International*, v. 17, n. 1, p. 22, 10 Dec. 2017. Disponível em: <<http://cancer-ci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-017-0397-7>>.
- OH, You-Take; SUN, Shi-Yong. Regulation of Cancer Metastasis by TRAIL/Death Receptor Signaling.

- Biomolecules*, v. 11, n. 4, p. 499, 26 Mar. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/11/4/499>>.
- OHSUMI, Yoshinori. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, v. 24, n. 1, p. 9–23, 24 Jan. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cr2013169>>.
- OKADA, Hitoshi; MAK, Tak W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 8, p. 592–603, Aug. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc1412>>.
- OSTERNE, Vinicius Jose Silva *et al.* Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 94, p. 271–282, Jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016313812>>.
- OSTROM, Quinn T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*, v. 20, n. suppl_4, p. iv1–iv86, 1 Oct. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/20/suppl_4/iv1/5090960>.
- OSTROM, Quinn T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro-Oncology*, v. 22, n. Supplement_1, p. iv1–iv96, 30 Oct. 2020. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/22/Supplement_1/iv1/5943281>.
- OSTROM, Quinn T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncology*, v. 21, n. Supplement_5, p. v1–v100, 1 Nov. 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/21/Supplement_5/v1/5610892>.
- PAE, H.O. *et al.* Roles of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Apoptosis of Human Monoblastic Leukemia U937 Cells by Lectin-II Isolated from Korean Mistletoe. *In Vitro & Molecular Toxicology*, v. 14, n. 2, p. 99–106, Jun. 2001. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/10979330152560496>>.
- PANDA, Prashanta Kumar *et al.* PUMA dependent mitophagy by Abrus agglutinin contributes to apoptosis through ceramide generation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1865, n. 3, p. 480–495, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.12.002>>.
- PANG, Boon-Chuan *et al.* The role of surgery in high-grade glioma--is surgical resection justified? A review of the current knowledge. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, v. 36, n. 5, p. 358–63, May 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17549284>>.
- PAOLI, Paolo; GIANNONI, Elisa; CHIARUGI, Paola. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1833, n. 12, p. 3481–3498, Dec. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>>.
- PAOLILLO *et al.* Stem-like Cancer Cells in a Dynamic 3D Culture System: A Model to Study Metastatic Cell

- Adhesion and Anti-cancer Drugs. *Cells*, v. 8, n. 11, p. 1434, 13 Nov. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/8/11/1434>>.
- PARKER, Nicole R. *et al.* Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 22477, 4 Apr. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep22477>>.
- PARSONS, Jason L.; DIANOV, Grigory L. Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair*, v. 12, n. 5, p. 326–333, May 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786413000414>>.
- PEARSON, Gray *et al.* Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocrine Reviews*, v. 22, n. 2, p. 153–183, 1 Apr. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067497800610>>.
- PERRY, James R. *et al.* Temozolomide rechallenge in recurrent malignant glioma by using a continuous temozolomide schedule. *Cancer*, v. 113, n. 8, p. 2152–2157, 15 Oct. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.23813>>.
- PINHO, Salomé S.; REIS, Celso A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, v. 15, n. 9, p. 540–555, 20 Sep. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3982>>.
- PINTO-JUNIOR, Vanir R. *et al.* Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. *Journal of Molecular Recognition*, v. 29, n. 4, p. 134–141, Apr. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmr.2512>>.
- PINTO-JUNIOR, Vanir Reis *et al.* Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 98, p. 12–23, May 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016327799>>.
- PISAPIA, David J. The Updated World Health Organization Glioma Classification: Cellular and Molecular Origins of Adult Infiltrating Gliomas. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 141, n. 12, p. 1633–1645, 1 Dec. 2017. Disponível em: <<http://meridian.allenpress.com/aplm/article/141/12/1633/65906/The-Updated-World-Health-Organization-Glioma>>.
- PONTÉN, J.; MACINTYRE, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, v. 74, n. 4, p. 465–486, 1968. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4313504/>>.
- PONTES, Luciola de Barros *et al.* Glioblastoma: approach to treat elderly patients. *Einstein (São Paulo)*, v. 10, n. 4, p. 512–518, Dec. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082012000400021&lng=en&tlng=en>.
- PRADOS, M. Temozolomide in combination with other cytotoxic agents. *Seminars in Oncology*, v. 28, p. 24–

- 33, 1 Aug. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093775401900685>>. Acesso em: 25 mar. 2021.
- PRASANNA, Vaddi K.; VENKATESH, Yeldur P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. *International Immunopharmacology*, v. 26, n. 2, p. 304–313, Jun. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576915001642>>.
- PRATT, Jonathan; ANNABI, Borhane. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. *Cellular Signalling*, v. 26, n. 5, p. 917–924, May 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089865681400031X>>.
- PRATT, Jonathan; ROY, René; ANNABI, Borhane. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. *Glycobiology*, v. 22, n. 9, p. 1245–1255, 1 Sep. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cws093>>.
- PROULX-BONNEAU, Sébastien; PRATT, Jonathan; ANNABI, Borhane. A role for MT1-MMP as a cell death sensor/effector through the regulation of endoplasmic reticulum stress in U87 glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 104, n. 1, p. 33–43, 19 Aug. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-010-0468-2>>.
- PYO, Jong-Ok *et al.* Essential Roles of Atg5 and FADD in Autophagic Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 21, p. 20722–20729, May 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820640777>>.
- QUAIL, Daniela F; JOYCE, Johanna A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell*, v. 31, n. 3, p. 326–341, Mar. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610817300521>>.
- RAMALINGAM, Suresh S.; BELANI, Chandra P. Recent Advances in the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 3, n. 9, p. 1056–1064, Sep. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086415304883>>.
- RAMASWAMY, Palaniswamy *et al.* TNF- α mediated MEK–ERK signaling in invasion with putative network involving NF- κ B and STAT-6: a new perspective in glioma. *Cell Biology International*, v. 43, n. 11, p. 1257–1266, 16 Nov. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbin.11125>>.
- RAVIKUMAR, Brinda *et al.* Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, v. 90, n. 4, p. 1383–1435, Oct. 2010. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00030.2009>>.
- REFLORA. *Flora do Brasil 2020 under construction*.
- REIFENBERGER, Guido *et al.* Advances in the molecular genetics of gliomas-implications for classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 14, n. 7, p. 434–452, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.204>>.

- RESENDE, Fernando F. B. *et al.* Evaluation of TgH(CX3CR1-EGFP) mice implanted with mCherry-GL261 cells as an in vivo model for morphometrical analysis of glioma-microglia interaction. *BMC Cancer*, v. 16, n. 1, p. 72, 8 Dec. 2016. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/16/72>>.
- RICCI, M. Stacey; ZONG, Wei-Xing. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*, v. 11, n. 4, p. 324–357, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.
- RIEGER, D. K. *et al.* ConBr, A Lectin Purified from the Seeds of *Canavalia brasiliensis*, Protects Against Ischemia in Organotypic Culture of Rat Hippocampus: Potential Implication of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neurochemical Research*, v. 42, n. 2, p. 347–359, 17 Feb. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11064-016-2078-7>>.
- RIEGER, Débora K.; COSTA, Ana Paula; *et al.* Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 122, p. 53–60, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.03.008>>.
- RIEGER, Débora K.; CUNHA, Rodrigo M. S.; *et al.* ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. *Journal of Molecular Recognition*, v. 27, n. 12, p. 746–754, Dec. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmr.2401>>.
- RIKKA, S. *et al.* Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover. *Cell Death & Differentiation*, v. 18, n. 4, p. 721–731, 19 Apr. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cdd2010146>>.
- RÍOS-MARCO, Pablo *et al.* Cholesterol homeostasis and autophagic flux in perifosine-treated human hepatoblastoma HepG2 and glioblastoma U-87 MG cell lines. *Biochemical Pharmacology*, v. 96, n. 1, p. 10–19, Jul. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295215002385>>.
- ROCHA, Bruno A. M. *et al.* Purification, Characterization, and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of a Lactose-Specific Lectin from *Cymbosema roseum* Seeds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 152, n. 3, p. 383–393, 19 Mar. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-008-8334-9>>.
- RODRIGUES, Joana G. *et al.* Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. *Cellular Immunology*, v. 333, n. January, p. 46–57, Nov. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008874918301217>>.
- RORIVE, Sandrine *et al.* Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. *Glia*, v. 33, n. 3, p. 241–255, Mar. 2001. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1098-1136\(200103\)33:3%3C241::AID-GLIA1023%3E3.0.CO;2-1](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1098-1136(200103)33:3%3C241::AID-GLIA1023%3E3.0.CO;2-1)>.
- ROUSSEAU, Audrey; MOKHTARI, Karima; DUYCKAERTS, Charles. The 2007 WHO classification of

- tumors of the central nervous system – what has changed? *Current Opinion in Neurology*, v. 21, n. 6, p. 720–727, Dec. 2008. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00019052-200812000-00019>>.
- ROY, Bibhas *et al.* Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 210, n. 1, p. 96–102, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.003>>.
- ROY, Debarun *et al.* Epididymal protein ASF is a d-galactose-specific lectin with apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 84, p. 208–220, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.021>>.
- RUBIN, Joshua B. *et al.* A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 23, p. 13513–13518, 11 Nov. 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2235846100>>.
- RYVA, Bradley *et al.* Wheat Germ Agglutinin as a Potential Therapeutic Agent for Leukemia. *Frontiers in Oncology*, v. 9, n. FEB, p. 1–13, 21 Feb. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00100/full>>.
- SAARINEN, Juhani *et al.* N-Glycan structures of matrix metalloproteinase-1 derived from human fibroblasts and from HT-1080 fibrosarcoma cells. *European Journal of Biochemistry*, v. 259, n. 3, p. 829–840, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10092871/>>.
- SAN-GALLI, F. *et al.* Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma in wistar rats. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 7, n. 3, Sep. 1989. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00172924>>.
- SANAI, Nader; ALVAREZ-BUYLLA, Arturo; BERGER, Mitchel S. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 8, p. 811–822, 25 Aug. 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra043666>>.
- SANSON, Marc *et al.* Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. *Journal of Clinical Oncology*, v. 27, n. 25, p. 4150–4154, 1 Sep. 2009. Disponível em: <<http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.21.9832>>.
- SANT, Shilpa; JOHNSTON, Paul A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug discovery today. Technologies*, v. 23, p. 27–36, Mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>>.
- SANTO, Vítor E. *et al.* Adaptable stirred-tank culture strategies for large scale production of multicellular spheroid-based tumor cell models. *Journal of Biotechnology*, v. 221, p. 118–129, Mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.031>>.
- SANZ-APARICIO, Julia *et al.* The crystal structure of Canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*, v. 405, n. 1, p. 114–118, 17 Mar. 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2897%2900137-3>>.
- SARLUS, Heela; HENEKA, Michael T. Microglia in Alzheimer’s disease. *Journal of Clinical Investigation*,

- v. 127, n. 9, p. 3240–3249, 1 Sep. 2017. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/90606>>.
- SASMITA, Andrew Octavian; WONG, Ying Pei; LING, Anna Pick Kiong. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, v. 14, n. 1, p. 40–51, Feb. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ajco.12756>>.
- SATO, Atsushi *et al.* Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Research*, v. 12, n. 1, p. 119–131, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.012>>.
- SCHNEIDER, Jaime L.; CUERVO, Ana Maria. Autophagy and human disease: emerging themes. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 26, p. 16–23, Jun. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X14000355>>.
- SCHÖTTERL, Sonja *et al.* Adjuvant Therapy Using Mistletoe Containing Drugs Boosts the T-Cell-Mediated Killing of Glioma Cells and Prolongs the Survival of Glioma Bearing Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2018, p. 1–12, 27 Aug. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/3928572>>.
- SCHRIRE, B. D.; LEWIS, G. D.; LAVIN, M. Biogeography of the leguminosae. *Legumes of the world*. [S.l.: s.n.], 2005. .
- SCHWEICHEL, J.-U.; MERKER, H.-J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, v. 7, n. 3, p. 253–266, Jun. 1973. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tera.1420070306>>.
- SHAFER, Danielle *et al.* Phase I trial of dimethyl fumarate, temozolomide, and radiation therapy in glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances*, v. 2, n. 1, p. 1–5, 1 Jan. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/noa/article/doi/10.1093/noajnl/vdz052/5715095>>.
- SHATNYEVA, Olga M. *et al.* Modulation of the CD95-Induced Apoptosis: The Role of CD95 N-Glycosylation. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, p. e19927, 18 May 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0019927>>.
- SHEN, Shuying *et al.* Ursolic acid induces autophagy in U87MG cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress. *Chemico-Biological Interactions*, v. 218, p. 28–41, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.04.017>>.
- SHEN, Ying H. *et al.* Up-regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome Ten) Mediates p38 MAPK Stress Signal-induced Inhibition of Insulin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 12, p. 7727–7736, Mar. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819765843>>.
- SHI, Lin; LI, Hongyuan; ZHAN, Yang. All-trans retinoic acid enhances temozolomide-induced autophagy in human glioma cells U251 via targeting Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway. *Oncology Letters*, v. 14, n. 3, p. 2709–2714, Sep. 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6482>>.
- SILBER, John R. *et al.* O6-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1826, n. 1, p. 71–82, Aug. 2012.
Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X12000029>>.
- SILVA, Flávio de Oliveira *et al.* Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. *Research in Veterinary Science*, v. 96, n. 2, p. 276–282, Apr. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528814000290>>.
- SINA, Asmaa *et al.* The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 4, n. 1, p. 31–38, 27 Mar. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12079-009-0084-0>>.
- SINGH, Ruby *et al.* Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. *PLOS ONE*, v. 11, n. 1, p. e0146110, 21 Jan. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0146110>>.
- SINGH, Rumani; LETAI, Anthony; SAROSIEK, Kristopher. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 20, n. 3, p. 175–193, 17 Mar. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41580-018-0089-8>>.
- SINGH, Sushma; SINGH, D. K. Effect of molluscicidal components of *Abrus precatorius*, *Argemone mexicana* and *Nerium indicum* on certain biochemical parameters of *Lymnaea acuminata*. *Phytotherapy Research*, v. 13, n. 3, p. 210–213, May 1999. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199905\)13:3%3C210::AID-PTR421%3E3.0.CO;2-F](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1573(199905)13:3%3C210::AID-PTR421%3E3.0.CO;2-F)>.
- SIROIS, Isabelle *et al.* Caspase activation regulates the extracellular export of autophagic vacuoles. *Autophagy*, v. 8, n. 6, p. 927–937, 23 Jun. 2012. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kaup20>>.
- SKEIE, Bente Sandvei *et al.* Gamma knife surgery versus reoperation for recurrent glioblastoma multiforme. *World Neurosurgery*, v. 78, n. 6, p. 658–669, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2012.03.024>>.
- SLUKVIN, Igor I.; KUMAR, Akhilesh. The mesenchymoangioblast, mesodermal precursor for mesenchymal and endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 75, n. 19, p. 3507–3520, 10 Oct. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-018-2871-3>>.
- SMYTH, Peter *et al.* FLIP(L): the pseudo-caspase. *FEBS Journal*, n. L, p. 1–15, 2020.
- SOBOL, Robert W. *et al.* Requirement of mammalian DNA polymerase- β in base-excision repair. *Nature*, v. 379, n. 6561, p. 183–186, 11 Jan. 1996. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/379183a0>>.
- SONG, Fanglong *et al.* Cyclic Compressive Stress Regulates Apoptosis in Rat Osteoblasts: Involvement of PI3K/Akt and JNK MAPK Signaling Pathways. *PLOS ONE*, v. 11, n. 11, p. e0165845, 2 Nov. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0165845>>.
- SONG, Liqing *et al.* Assembly of Human Stem Cell-Derived Cortical Spheroids and Vascular Spheroids to Model 3-D Brain-like Tissues. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 5977, 12 Dec. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-42439-9>>.

- SOSA, Maria Soledad *et al.* Regulation of Tumor Cell Dormancy by Tissue Microenvironments and Autophagy. In: ENDERLING, HEIKO; ALMOG, NAVA; HLATKY, LYNN (Eds.). . *Bone. Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY: Springer New York, 2013. v. 734. p. 73–89. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.
- STAAL, S. P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, n. 14, p. 5034–5037, 1 Jul. 1987. Disponível em:
<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.84.14.5034>>.
- STAPLES, Christopher J. *et al.* Cross-talk between the p38 α and JNK MAPK Pathways Mediated by MAP Kinase Phosphatase-1 Determines Cellular Sensitivity to UV Radiation*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 34, p. 25928–25940, 20 Aug. 2010. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820595549>>. Acesso em: 7 jun. 2021.
- STOJIC, Jelena *et al.* Expression of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-11 and MMP-19 is correlated with the WHO-grading of human malignant gliomas. *Neuroscience Research*, v. 60, n. 1, p. 40–49, Jan. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010207017737>>.
- STOYANOV, George S. *et al.* Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment. *Medical Oncology*, v. 35, n. 3, p. 11–13, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1007/s12032-018-1083-x>>.
- STRIK, Herwig M. *et al.* Galectin-3: cellular distribution and correlation with WHO-grade in human gliomas. *Journal of neuro-oncology*, v. 53, n. 1, p. 13–20, May 2001. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11678425>>.
- STRIK, Herwig M.; HOFFMANN, Anna. Galectins in Malignant Gliomas: Expression, Functions, and Possible Therapeutic Options. *Galectins*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p. 223–234. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470378076.ch11>>.
- STROJNIK, Tadej *et al.* Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surgical Neurology*, v. 68, n. 2, p. 133–143, Aug. 2007. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090301906010627>>.
- STUPP, Roger *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009. Disponível em:
<[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)>.
- STUPP, Roger. Promising Survival for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme Treated With Concomitant Radiation Plus Temozolomide Followed by Adjuvant Temozolomide. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 5, p. 1375–1382, 1 Mar. 2002. Disponível em:
<<http://www.jco.org/cgi/doi/10.1200/JCO.20.5.1375>>.

- SUN, Qian *et al.* Caspase 1 activation is protective against hepatocyte cell death by up-regulating beclin 1 protein and mitochondrial autophagy in the setting of redox stress. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 22, p. 15947–15958, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.426791>>.
- SUN, Yu *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, v. 35, n. 6, p. 600–604, 2 Nov. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10799893.2015.1030412>>.
- TALMADGE, James E.; FIDLER, Isaiah J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, v. 70, n. 14, p. 5649–5669, 15 Jul. 2010. Disponível em: <www.aacrjournals.org>.
- TAM, Shing Yau; LAW, Helen Ka-Wai. JNK in Tumor Microenvironment: Present Findings and Challenges in Clinical Translation. *Cancers*, v. 13, n. 9, p. 2196, 3 May 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/13/9/2196>>.
- TAN, B S *et al.* Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF). *Cell Death & Disease*, v. 6, n. 7, p. e1826–e1826, 16 Jul. 2015. Disponível em: <www.nature.com/cddis>.
- TAN, Ting-Ting; WHITE, Eileen. Therapeutic Targeting of Death Pathways in Cancer: Mechanisms for Activating Cell Death in Cancer Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [S.l.: s.n.], 2008. p. 81–104. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6554-5_5>.
- TANG, Nan *et al.* Control of Mitotic Spindle Angle by the RAS-Regulated ERK1/2 Pathway Determines Lung Tube Shape. *Science*, v. 333, n. 6040, p. 342–345, 15 Jul. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1204831>>.
- TANIGUCHI, Naoyuki *et al.* Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 9, n. 1, p. 1–25, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.03.003>>.
- TANNOCK, Ian F. *et al.* *The Basic Science of Oncology*. 5. ed. [S.l.]: McGraw-Hill Professional, 2013. Disponível em: <<https://hemonc.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1791>>.
- TENTORI, Lucio; GRAZIANI, Grazia. Recent Approaches to Improve the Antitumor Efficacy of Temozolomide. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 2, p. 245–257, 1 Jan. 2009. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=16&issue=2&spage=245>>.
- THEELER, Brett J.; GILBERT, Mark R. Advances in the treatment of newly diagnosed glioblastoma. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0536-8>>.
- THUMMA, Sudheer R. *et al.* Long-Term Survival after Gamma Knife Radiosurgery in a Case of Recurrent Glioblastoma Multiforme: A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Medicine*, v. 2012, p. 1–6, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/crim/2012/545492/>>.
- TIWARI, Meenakshi *et al.* A nonapoptotic role for CASP2/caspase 2. *Autophagy*, v. 10, n. 6, p. 1054–1070, 4

- Jun. 2014. Disponível em:
<<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kaup20>>.
- TIWARI, Meenakshi *et al.* Loss of caspase-2-dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidative stress in primary cultures of young adult cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 10, p. 8493–8506, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.163824>>.
- TRAUTH, B. *et al.* Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, v. 245, n. 4915, p. 301–305, 21 Jul. 1989. Disponível em:
<<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.2787530>>.
- TREJO-SOLÍS, Cristina *et al.* Autophagic and Apoptotic Pathways as Targets for Chemotherapy in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 12, p. 3773, 27 Nov. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3773>>.
- TSANG, Lincoln L H *et al.* Characterisation of urinary metabolites of temozolomide in humans and mice and evaluation of their cytotoxicity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 26, n. 6, p. 429–436, Sep. 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02994094>>.
- TSAPRAS, Panagiotis; NEZIS, Ioannis P. Caspase involvement in autophagy. *Cell Death & Differentiation*, v. 24, n. 8, p. 1369–1379, 2 Aug. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cdd201743>>.
- TUBBS, Julie L.; PEGG, Anthony E.; TAINER, John A. DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair*, v. 6, n. 8, p. 1100–1115, Aug. 2007. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786407001280>>.
- TUNG, Jai-Nien *et al.* Inhibition of pentraxin 3 in glioma cells impairs proliferation and invasion in vitro and in vivo. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 129, n. 2, p. 201–209, 9 Sep. 2016. Disponível em:
<<http://link.springer.com/10.1007/s11060-016-2168-z>>.
- VAN DAMME, Els J. M. *et al.* Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 17, n. 6, p. 575–692, Nov. 1998. Disponível em:
<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689891304276>>.
- VAN DAMME, Els J.M. *et al.* The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. *Glycoconjugate Journal*, v. 20, n. 7/8, p. 449–460, 2003. Disponível em:
<<http://link.springer.com/10.1023/B:GLYC.0000038291.67527.a5>>.
- VAN KESSEL, Emma *et al.* Tumor-related neurocognitive dysfunction in patients with diffuse glioma: a systematic review of neurocognitive functioning prior to anti-tumor treatment. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 134, n. 1, p. 9–18, 31 Aug. 2017. Disponível em:
<<http://link.springer.com/10.1007/s11060-017-2503-z>>.
- VAN NIFTERIK, K A *et al.* Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *British Journal of Cancer*, v. 103, n. 1, p. 29–35, 1 Jun. 2010.

- Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/6605712>>.
- VAUX, David L.; CORY, Suzanne; ADAMS, Jerry M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, v. 335, n. 6189, p. 440–442, Sep. 1988.
- Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/335440a0>>.
- VEILLON, Lucas *et al.* Glycosylation Changes in Brain Cancer. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 9, n. 1, p. 51–72, 17 Jan. 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchemneuro.7b00271>>.
- VERHAAK, Roel G.W. *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, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>>.
- VINCI, Maria *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology*, v. 10, n. 1, p. 29, 2012.
- Disponível em: <<http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-10-29>>.
- VINCI, Maria *et al.* Tumor Spheroid-Based Migration Assays for Evaluation of Therapeutic Agents. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2013. v. 986. p. 253–266. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-311-4_16>.
- WAGNER, Erwin F.; NEBREDA, Ángel R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, n. 8, p. 537–549, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2694>>.
- WAGNER, Klaus W. *et al.* Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature Medicine*, v. 13, n. 9, p. 1070–1077, 2 Sep. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm1627>>.
- WAIT, Scott D. *et al.* Polymeric drug delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncology*, v. 17, n. suppl 2, p. ii9–ii23, 1 Mar. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/neuro-oncology/article-lookup/doi/10.1093/neuonc/nou360>>.
- WALKER, Keenan A. Chronic low-grade inflammation,. v. 1, n. 1, p. 3–4, [S.d.].
- WANG, Kewei. Molecular mechanisms of liver injury: Apoptosis or necrosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 66, n. 8, p. 351–356, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2014.04.004>>.
- WANG, Shu-ya *et al.* Polygonatum cyrtoneura lectin, a potential antineoplastic drug targeting programmed cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 406, n. 4, p. 497–500, Mar. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X11002415>>.
- WANG, Yongjun *et al.* Macroautophagy and chaperone-mediated autophagy are required for hepatocyte resistance to oxidant stress. *Hepatology*, v. 52, n. 1, p. 266–277, Jul. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.23645>>.
- WARREN, Chloe F. A.; WONG-BROWN, Michelle W.; BOWDEN, Nikola A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death & Disease*, v. 10, n. 3, p. 177, 21 Mar. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41419-019-1407-6>>.

- WEI, Q. *et al.* Multiregion whole-exome sequencing of matched primary and metastatic tumors revealed genomic heterogeneity and suggested polyclonal seeding in colorectal cancer metastasis. *Annals of Oncology*, v. 28, n. 9, p. 2135–2141, Sep. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419352408>>.
- WEI, Yongjie *et al.* JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Molecular Cell*, v. 30, n. 6, p. 678–688, Jun. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276508003894>>.
- WEISWALD, Louis-Bastien; BELLET, Dominique; DANGLES-MARIE, Virginie. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*, v. 17, n. 1, p. 1–15, Jan. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558614001948>>.
- WELTE, Thomas *et al.* Oncogenic mTOR signalling recruits myeloid-derived suppressor cells to promote tumour initiation. *Nature Cell Biology*, v. 18, n. 6, p. 632–644, 16 Jun. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncb3355>>.
- WEN, Xin *et al.* Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 65, p. 402–410, Dec. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584913003444>>.
- WESSELING, P.; CAPPER, D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 44, n. 2, p. 139–150, Feb. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nan.12432>>.
- WESTPHAL, Dana *et al.* Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1813, n. 4, p. 521–531, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.019>>.
- WHELAN, Kelly A *et al.* Hypoxia Suppression of Bim and Bmf Blocks Anoikis and Luminal Clearing during Mammary Morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, v. 21, n. 22, p. 3829–3837, 15 Nov. 2010. Disponível em: <<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E10>>. Acesso em: 7 jun. 2021.
- WHITTLE, Ian R. *et al.* Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line tumours. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 36, n. 3, p. 231–242, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9524101/>>.
- WICK, Wolfgang; PLATTEN, Michael; WELLER, Michael. New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma. *Neuro-Oncology*, v. 11, n. 1, p. 69–79, 1 Feb. 2009. Disponível em: <<http://academic.oup.com/neuro-oncology/article/11/1/69/1050445/New-alternative-temozolomide-regimens-for-the>>.
- WIRAWAN, E *et al.* Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death & Disease*, v. 1, n. 1, p. e18–e18, 21 Jan. 2010. Disponível em: <www.nature.com/cddis>.
- WOJTON, Jeffrey; MEISEN, Walter Hans; KAUR, Balveen. How to train glioma cells to die: molecular challenges in cell death. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 126, n. 3, p. 377–384, 5 Feb. 2016. Disponível em:

- em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-015-1980-1>>.
- WOLFF, Johannes *et al.* Dexamethasone inhibits Glioma-induced Formation of Capillary like Structures in vitro and Angiogenesis in vivo. *Klinische Pädiatrie*, v. 209, n. 04, p. 275–277, 13 Jul. 1997. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2008-1043962>>.
- WOLIN, Ingrid A.V. *et al.* ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. *Biochimie*, v. 180, p. 186–204, Jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908420302790>>.
- WOLIN, Ingrid Alessandra Victoria. *AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DAS LECTINAS LEGUMINOSAS Dioclea reflexa I E Canavalia brasiliensis EM CULTURAS CELULARES DAS LINHAGENS C6 (Rattus norvegicus) E U87 (Homo sapiens)*. 2017. Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- WU, Haijian *et al.* Caspases: A Molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *International Journal of Biological Sciences*, v. 10, n. 9, p. 1072–1083, 2014. Disponível em: <<http://www.ijbs.com>>.
- WU, Nan-Lin *et al.* TRAIL-Induced Keratinocyte Differentiation Requires Caspase Activation and p63 Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 131, n. 4, p. 874–883, Apr. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2010.402>>.
- WU, Qinghua *et al.* JNK signaling in cancer cell survival. *Medicinal Research Reviews*, v. 39, n. 6, p. 2082–2104, 25 Nov. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21574>>.
- WULLSCHLEGER, Stephan; LOEWITH, Robbie; HALL, Michael N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, v. 124, n. 3, p. 471–484, Feb. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406001085>>.
- XAVIER, Mariana Morrone *et al.* SANdReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 19, n. 10, p. 801–812, 20 Dec. 2016. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/145824/article>>.
- XIAO, Xiuqing *et al.* Purification and cloning of lectin that induce cell apoptosis from *Allium chinense*. *Phytomedicine*, v. 22, n. 2, p. 238–244, Feb. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094471131400405X>>.
- XIAO, Yuzhong *et al.* MAPK1/3 regulate hepatic lipid metabolism via ATG7-dependent autophagy. *Autophagy*, v. 12, n. 3, p. 592–593, 3 Mar. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kaup20>>.
- XU, Guang *et al.* Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *International Journal of Oncology*, v. 24, n. 4, p. 893–900, 1 Apr. 2004. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.24.4.893>>.
- XU, Songli *et al.* Over-expression of α -1,4-galactosyltransferase I, II, and V in human astrocytoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 127, n. 8, p. 502–506, 1 Aug. 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s004320100246>>.

- YANG, Pei *et al.* Clinicopathological factors predictive of postoperative seizures in patients with gliomas. *Seizure*, v. 35, p. 93–99, Feb. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1059131115002940>>.
- YANG, Z.-Z *et al.* Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochemical Society Transactions*, v. 32, n. 2, p. 350–355, 2004. Disponível em: <<http://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-pdf/32/2/350/533759/bst0320350.pdf>>.
- YANG, Zhineng J. *et al.* The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 10, n. 9, p. 1533–1541, Sep. 2011. Disponível em: <<http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-11-0047>>.
- YAP, Timothy A. *et al.* Targeting the PI3K–AKT–mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 8, n. 4, p. 393–412, 1 Aug. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489208001227>>. Acesso em: 3 jun. 2021.
- YAU, Tammy *et al.* Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. *Molecules*, v. 20, n. 3, p. 3791–3810, 26 Feb. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/20/3/3791>>.
- YE, Hongxing *et al.* Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. *BMC Neurology*, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12883-016-0700-6>>.
- YE, Jing *et al.* Non-apoptotic cell death in malignant tumor cells and natural compounds. *Cancer Letters*, v. 420, p. 210–227, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.061>>.
- YOSHIMOTO, Koji *et al.* Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, v. 2, n. December, p. 1–8, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00186/abstract>>.
- YOU, Min *et al.* TRAIL induces autophagic protein cleavage through caspase activation in melanoma cell lines under arginine deprivation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 374, n. 1–2, p. 181–190, 20 Feb. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-012-1518-1>>.
- YOULE, Richard J.; NARENDRA, Derek P. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 12, n. 1, p. 9–14, 22 Jan. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm3028>>.
- YOUNG, Megan M. *et al.* Autophagosomal Membrane Serves as Platform for Intracellular Death-inducing Signaling Complex (iDISC)-mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 15, p. 12455–12468, Apr. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820531736>>.
- YU, Li. Regulation of an ATG7-beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8. *Science*, v. 304, n. 5676, p. 1500–1502, 4 Jun. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1096645>>.
- YU, Sun-Nyoung *et al.* Salinomycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis through generation of reactive oxygen species in human glioma U87MG cells. *Oncology Reports*, v.

- 37, n. 6, p. 3321–3328, Jun. 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5615>>.
- ZARUBIN, Tyler; HAN, Jiahuai. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, v. 15, n. 1, p. 11–18, Jan. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/7290257>>.
- ZEPPERNICK, Felix *et al.* Stem Cell Marker CD133 Affects Clinical Outcome in Glioma Patients. *Clinical Cancer Research*, v. 14, n. 1, p. 123–129, 1 Jan. 2008. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-07-0932>>.
- ZHANG, Jihong; F.G. STEVENS, Malcolm; D. BRADSHAW, Tracey. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*, v. 5, n. 1, p. 102–114, 1 Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1874-4672&volume=5&issue=1&spage=102>>.
- ZHANG, Mingyu *et al.* Nestin and CD133: Valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 27, n. 1, p. 85, 2008. Disponível em: <<http://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-9966-27-85>>.
- ZHANG, P. Y. *et al.* Cancer stem cells: Targeting tumors at the source. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 19, p. 1821–1828, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26044226/>>.
- ZHANG, Xiao-Yue *et al.* Upregulation of sestrin 2 expression via JNK pathway activation contributes to autophagy induction in cancer cells. *Cellular Signalling*, v. 25, n. 1, p. 150–158, 1 Jan. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089865681200246X>>. Acesso em: 8 jun. 2021.
- ZHANG, Xudong *et al.* Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by proteasome inhibitor bortezomib in human glioblastoma U87 and U251 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 385, n. 1–2, p. 265–275, 9 Jan. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-013-1835-z>>.
- ZHANG, Yan *et al.* Upregulation of matrix metalloproteinase-1 and proteinase-activated receptor-1 promotes the progression of human gliomas. *Pathology - Research and Practice*, v. 207, n. 1, p. 24–29, Jan. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0344033810002402>>.
- ZHAO, Jia *et al.* Glycosylation analysis of interleukin-23 receptor: elucidation of glycosylation sites and characterization of attached glycan structures. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 45, n. 12, p. 1416–1425, Dec. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jms.1858>>.
- ZHOU, Hongyu; HUANG, Shile. The Complexes of Mammalian Target of Rapamycin. *Current Protein & Peptide Science*, v. 11, n. 6, p. 409–424, 1 Sep. 2010. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=11&issue=6&spage=409>>.
- ZHOU, Yuan-Yuan *et al.* MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Bioscience Reports*, v. 35, n. 3, p. 1–10, 1 Jun. 2015. Disponível em:

<<https://portlandpress.com/bioscirep/article/doi/10.1042/BSR20140141/56831/MAPKJNK-signalling-a-potential-autophagy>>.

ZHU, Lei; QI, Boxiang; HOU, Daorong. Roles of HIF1 α - and HIF2 α -regulated BNIP3 in hypoxia-induced injury of neurons. *Pathology - Research and Practice*, v. 215, n. 4, p. 822–827, Apr. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0344033818316819>>.

ZHU, Yushan *et al.* Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein & Cell*, v. 1, n. 5, p. 468–477, 4 May 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13238-010-0048-4>>.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. *Physiology*, v. 19, n. 3, p. 124–128, Jun. 2004. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/nips.01519.2004>>.

ZOU, Xiao; BLANK, Michael. Targeting p38 MAP kinase signaling in cancer through post-translational modifications. *Cancer Letters*, v. 384, p. 19–26, 1 Jan. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383516306176>>. Acesso em: 3 jun. 2021.