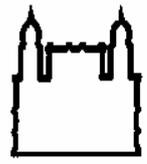




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

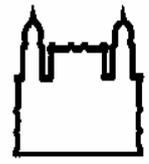
**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRATO
METANÓLICO DE *Bixa orellana* L. SOBRE CÉLULAS
ASTROCÍTICAS TUMORAIS E ASTRÓCITOS *IN VITRO***

VANESSA SANTANA FREITAS

Salvador – Bahia - Brasil
2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRATO
METANÓLICO DE *Bixa orellana* L. SOBRE CÉLULAS
ASTROCÍTICAS TUMORAIS E ASTRÓCITOS *IN VITRO***

VANESSA SANTANA FREITAS

Orientador: Dr. RAMON DOS SANTOS EL-BACHÁ

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador – Bahia - Brasil
2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Freitas, Vanessa Santana

F866i

Investigação do efeito citotóxico do extrato metanólico de *Bixa orellana* L sobre
células astrocíticas tumorais e astrócitos *in vitro* [manuscrito] /
Vanessa Santana Freitas. - 2011.

67 f.: il.; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia,
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El-bachá.

1. *Bixa orellana*. 2. Glioblastoma. 3. Necrose. 4. Citotoxicidade.
I.Título.

CDU 615.015.32:616-

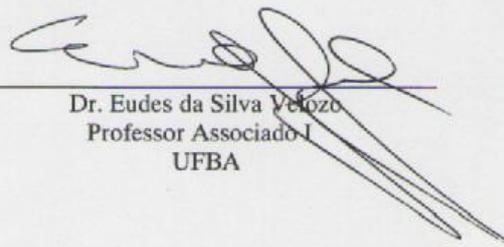
006

"Investigação do efeito citotóxico do extrato matanólico de *Bixa orellana* L. Sobre células astrocíticas tumorais astrócitos *in vitro*."

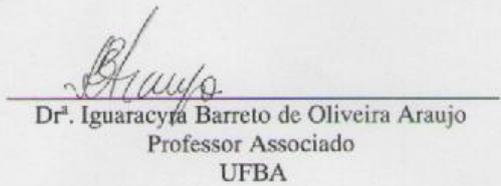
VANESSA SANTANA FREITAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

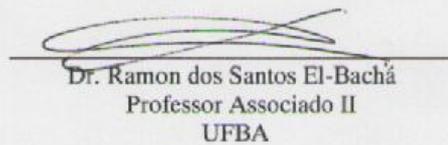
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Eudes da Silva Vellozo
Professor Associado I
UFBA



Dr. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo
Professor Associado
UFBA



Dr. Ramon dos Santos El-Bachá
Professor Associado II
UFBA

Dedico este trabalho a minha mãe, pelo apoio durante o desenvolvimento e a realização de meus ideais. Por não ser apenas mãe, e sim amiga e companheira, principalmente nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis. A vitória é sua, pelo ensinamento durante a luta, na conquista dos meus objetivos. Muito obrigada, hoje e sempre!

AGRADECIMENTOS

A energia universal recebida: “Deus, Jesus e/ou suas falanges”!

Gostaria inicialmente de destacar a importância do meu orientador, Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá para realização deste trabalho, para a minha formação como cientista e mestre em Patologia Experimental, área Neurociências, e evolução como indivíduo. As palavras de agradecimento são poucas para expressar o respeito, carinho, admiração e gratidão da oportunidade e confiança recebidos nestes três anos de trabalho. Agradeço ainda por sua orientação, paciência, exemplo de profissional e Ser humano e por estar disposto a me incentivar auxiliando e acreditando na minha capacidade durante esta caminhada.

Agradeço mais uma vez profundamente a todos que auxiliaram direta ou indiretamente nesse estudo:

À Prof.^a Maria de Fátima Dias Costa por seu exemplo de diplomacia científica e acadêmica, atenção e disponibilidade nos momentos de dúvidas.

À Prof.^a Silva Lima Costa por sugestões e esclarecimentos de metodologias, atenção e disponibilidade nos momentos de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo pela ajuda nas etapas de extração, indispensável para realização deste trabalho.

Ao Prof. Edson de Jesus Marques pelas dicas e sugestões sobre processos de extração, indispensável para realização deste trabalho.

Geraldo Pedral Sampaio pela contribuição nas análises de citometria de fluxo, paciência e dedicação nesta primeira colaboração.

Prof. Diêgo Madureira de Oliveira e Me. Rute Maria Ferreira Lima, Doutorandos do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LABNq), pelas sugestões, paciência, dedicação, ensinamentos, incentivos e amizade; fundamentais para o meu processo de formação como mestre e realização deste trabalho, pois a sabedoria de vocês ultrapassou os limites da amizade conquistada inicialmente com o interesse Científico através da arte de saber viver, conviver, ouvir e ensinar.

A toda equipe do LABNq, especialmente: Vitor, Bruno Pitanga, Noélio (obrigada pelas assessorias em informática), Érica (caronas e dicas), Rosan, Paulo Coelho (apoio e carinho), Eli, Prof.^a Cátia (sensibilidade e disposição em ajudar); Ramon, Diêgo Madureira, Rute Lima, Martins Cerqueira, Edson Marques, Lizandra Góes e Débora Leal obrigada pelo apoio técnico, carinho e amizade recebidos.

Aos meus amigos e familiares, especialmente minha mãe (Prof.^a Dr.^a Enf.^a Maria José Matos Santana) pelo exemplo de viver e ser mestre, apoios e incentivos durante toda a minha vida. A todos os amigos (as), especialmente: Gisele, Nilton, Lilane, Milena (s), Valdira, Bruno, Ângelo, Débora, e Thiago, Ramon, Diêgo, Rute, Marcus, Ricardo e Fabiana, por estarem presentes nos momentos difíceis e alegres que passei durante a elaboração deste trabalho.

Aos funcionários do CPqGM (Pós-graduação, Biblioteca e Laboratório de Microscopia) pelo profissionalismo, dedicação, atenção e respeito aos alunos de pós-graduação.

Simplesmente obrigada! Gosto e admiro muito vocês.

que só a Sabedoria permite descobrir...

“A Sabedoria é a arte do conhecimento no seu mais profundo sentido, não só pela aprendizagem adquirida nos livros, mas também pela experiência obtida através do convívio com o mundo, sendo capaz de observar e interagir.

A sabedoria não se adquire somente com a ciência, mas também com a arte de saber viver: ser humilde, tolerante e paciente. Acredito que para uma pessoa ser considerada sábia, a felicidade deve ser sempre buscada. Ao se debater com algum obstáculo, nunca pensar em desistir, pois, determinação e persistência são fundamentais para o sucesso.

Como diz um provérbio chinês, há três coisas que jamais voltam atrás: uma flecha lançada, uma palavra pronunciada e uma oportunidade perdida.

Enfim: muito sabe quem conhece a própria ignorância e continua buscando a sabedoria.”

(Adaptado de vários autores desconhecidos)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1.	A importância dos modelos experimentais <i>in vitro</i> para estudar patologia humana, especialmente o câncer	16
2.2.	Aspectos funcionais de células gliais	17
2.3.	Câncer	18
2.3.1.	Tumores do tecido neuroepitelial	18
2.3.1.1.	Glioblastoma multiforme humano (GBM)	19
2.4.	<i>Bixa orellana</i>	21
2.4.1.	Origem, etnobotânica e aplicações comerciais	21
2.4.2.	Características fitoquímicas	22
2.4.3.	Propriedades medicinais	24
3.	OBJETIVOS	27
3.1.	Geral	27
3.2.	Específicos	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1.	Desenho experimental	28
4.2.	Extração e determinação de compostos fenólicos e bixina	29
4.3.	Determinação do espectro de absorção espectrofotométrica	29
4.4.	Cultura de células: linhagens neoplásicas (GL-15 e C6) e cultura primária de astrócitos	30
4.5.	Testes de Citotoxicidade	31
4.5.1.	Viabilidade celular por MTT	31
4.5.2.	Teste de viabilidade celular com Azul Tripán	32
4.6.	Análises morfológicas	33
4.6.1.	Microscopia de contraste de fase	33
4.6.2.	Capacidade de fluorescência do extrato em microscopia de fluorescência	33
4.6.3.	Avaliação da depleção de glutation reduzido (GSH) através de microscopia de fluorescência	34
4.7.	Detecção de alterações do ciclo celular por citometria de fluxo	35
4.8.	Detecção do tipo de morte celular por citometria de fluxo	35
4.9.	Análise estatística	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	52
7.	REFERÊNCIAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ASB	Albumina sérica bovina
AST	Astrócitos murinos
BSO	Butionina-Sulfoxamina
C6	Glioma murino
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC ₅₀	Concentração que mata 50% das células
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GSH	Glutation reduzido
LabNq	Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular
MCB	Monoclorobimano
MCC	Mínima concentração citotóxica
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão Salina Fosfato
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
TMZ	Temozolamida

RESUMO

Objetivo: Investigar a capacidade antitumoral do extrato metanólico de *Bixa orellana* em células neoplásicas de Glioblastoma multiforme (GL-15) e Glioma murino (C6), sem toxicidade para as células astrocíticas normais *in vitro*.

Métodos e resultados: Caracterização do extrato por espectrofotometria por absorção de luz visível apresentou picos em 286, 363 e 435 nm. Determinou-se os teores de bixina e compostos fenólicos – 0,17 mg/mg e 0,05 mg por equivalência de pirogalol/mg de extrato seco, respectivamente. A citotoxicidade foi investigada pelo teste de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium. A Mínima Concentração Citotóxica (MCC) para GL-15 foi 180 e 80 µg/mL para C6, para astrócitos foi 240 µg/mL, após 48 horas de tratamento. O teste de exclusão com azul tripan confirmou a EC50 para GL-15 após 24 horas. A análise morfológica foi realizada por microscopia de contraste de fase e fluorescência. Comprovou-se a diminuição de células neoplásicas e alterações celulares na MCC em astrócitos. A capacidade de fluorescência foi comprovada em GL-15. A citotoxicidade não depletou GSH. Investigou-se alterações de ciclo celular e morte celular por citometria de fluxo. Alterações de ciclo celular não foram evidenciadas. O tipo de morte celular foi investigado com marcação para anexina V e Iodeto de Propídio comprovou morte por necrose em GL-15 e por apoptose tardia em C6, os astrócitos apresentaram valores pequenos de morte por apoptose tardia e necrose.

Conclusão: Os dados indicam um potencial antitumoral das substâncias presentes neste extrato para células neoplásicas sem ser tóxico para células normais.

PALAVRAS-CHAVES: *Bixa orellana*, glioblastoma, necrose, citotoxicidade

ABSTRACT

Aim: This work investigated the hypothesis that the methanol extract of *Bixa orellana* decreases the viability of GL-15 and C6 cells, without being toxic to normal astrocytes *in vitro*. **Methods:** The methanol extract of *B. orellana* seeds was obtained and characterized by UV-Vis spectrophotometry. The cytotoxic effects were assayed *in vitro* using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide method. The cell morphology was investigated by phase contrast and fluorescence microscopy. The depletion of reduced glutathione (GSH) was observed by fluorescence microscopy. The effects on cell cycle and the mode of cell death was studied by flow cytometry. **Results:** The contents of bixin and phenol were 0.17 mg/mg of extract and 0.05 mg of pyrogallol equivalent/mg of extract, respectively. Three peaks were observed at 286, 363, and 435 nm. The extract killed cells in a dose-dependent manner. The minimum cytotoxic concentrations in the two tumoral cells (GL-15 and C6) were respectively: 180 µg/mL and 80 µg/mL, meanwhile in astrocytes it was 240 µg/mL after 48 hours. The trypan blue assay confirmed the cytotoxic effect to GL-15 cells. Morphological degeneration of treated glioma cells was observed. The same was observed with astrocytes, but at a higher concentration. Treated cells became fluorescent, probably due to incorporation of bixin. The treatment neither depleted GSH, nor interfered on the cell cycle. The main kind of cell death was necrosis. **Conclusions:** Compounds present in *B. orellana* seeds are potentially cytotoxic to glioma cells, meanwhile primary astrocytes are more resistant.

KEYWORDS: *Bixa orellana*, glioblastoma, necrosis, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Enzimas envolvidas na síntese de bixina a partir do licopeno.

Figura 2: Estrutura química de substâncias presentes no extrato metanólico de *B. orellana* L. (A) *Z*-bixina ou *cis*-bixina. (B) *E*-bixina ou *trans*-bixina. (C) Norbixina. (D) Hipolaetina.

Figura 3: Espectro de absorção do extrato metanólico de *B. orellana* com picos de absorção de luz visível em 286, 363 e 435 nm.

Figura 4: Citotoxicidade do extrato metanólico de *B. orellana* em células de glioblastoma humano (GL-15) A-C, e glioma murino (C6). A. Células tratadas por 24h. B. Células tratadas por 48 horas. C. Células tratadas por 72 horas. D. Células (C6) tratadas por 48 horas. As diferenças estatísticas foram assinaladas como: (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,0001$ comparadas com o controle tratado com DMSO a 0,5 %.

Figura 5: Citotoxicidade do extrato metanólico de *B. orellana* em células astrocíticas evidenciada pelo MTT. A diferença estatística foi assinalada como: (*) $p < 0,05$ comparada com o controle tratado com DMSO a 0,5 %.

Figura 6: Teste de exclusão do Azul Tripán em GL-15 após 24 horas de tratamento com extrato metanólico de *B. orellana* a 200 $\mu\text{g/mL}$ (EXT.). (*) Diferença estatística de $p < 0,05$, em relação ao controle tratado apenas com DMSO a 0,5 %.

Figura 7: Efeito citotóxico sobre a morfologia celular após 48 horas de tratamento com extrato metanólico de *B. orellana*. Nos tratamentos das células neoplásicas (GL-15 e C6) observou-se um aumento dos espaços vazios entre as células, destacadas por asterisco, proporcional ao aumento das concentrações comparando-se com os controles de meio e DMSO; setas assinalam células arredondadas em GL-15, C6 e AST (Astrocíticas); flechas destacam alongamentos das extremidades em C6 e AST. Barra - 100 μm .

Figura 8: Fluorescência de GL-15 tratada com extrato metanólico de *B. orellana* a 200 µg/mL. A. Microscopia óptica. B. Mesmo campo observado por microscopia de fluorescência. Barra - 50 µm.

Figura 9: Investigação da depleção de GSH em células neoplásicas (GL-15 e C6) após 24 horas de tratamento. A. Controle negativo – células GL-15 tratadas com DMSO a 0,5%. B. Controle positivo - células GL-15 tratadas com BSO a 1 mM. C. Células GL-15 tratadas com extrato metanólico de *B. orellana* (200 µg/mL) por 24 horas. D. Controle negativo - células C6 tratadas com DMSO a 0,5%. E. Controle positivo - células C6 tratadas com BSO a 1 mM. F. Células C6 tratadas com extrato metanólico de *B. orellana* (200 µg/mL) por 24 horas.

Figura 10: Investigação de alterações no ciclo celular induzidas pelo extrato metanólico de *B. orellana* (80 µg/mL) após 48 horas de tratamento em células do SNC. A, B, C, células GL-15. (A) Controle não tratado. (B) Controle tratado com DMSO a 0,5%. C. Tratamento com extrato. D, E, F, células C6. (D) Controle não tratado. (E) Controle tratado com DMSO a 0,5%. F. Tratamento com extrato. G, H, I células astrocitárias (AST). (G) Controle não tratado. (H) Controle tratado com DMSO a 0,5%. (I) Tratamento com extrato.

Figura 11: Investigação por citometria de fluxo do tipo de morte induzida pelo extrato metanólico de *B. orellana* (80 µg/mL) após 48 horas de tratamento em células do SNC. A, B, C, células GL-15. (A) Controle não tratado. (B) Controle tratado com DMSO a 0,5%. C. Tratamento com extrato. D, E, F, células C6. (D) Controle não tratado. (E) Controle tratado com DMSO a 0,5%. F. Tratamento com extrato. G, H, I, células astrocitárias (AST). (G) Controle não tratado. (H) Controle tratado com DMSO a 0,5%. (I) Tratamento com extrato. (ID) Quadrante inferior direito, células marcadas com Anexina V. (IE) Quadrante inferior esquerdo, células não marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio. (SE) Quadrante superior esquerdo, células marcadas com Iodeto de Propídio. (SD) Quadrante superior direito, células marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e conseqüentemente uma das doenças que mais causa temor na sociedade. No Brasil, segundo dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade, do total de óbitos do ano de 2008, cerca de 6.934 foram causados por câncer, sendo que as neoplasias malignas do SNC (meninge, encéfalo e outras partes do SNC) corresponderam a aproximadamente 1.468 na região Nordeste e a 381 na Bahia (Brasil, 2008). Entre esses tumores, os tumores da glia, também conhecidos como gliomas, são os tumores primários mais comuns do SNC em adultos (Nakada *et al.*, 2007). A incidência de glioma maligno é de aproximadamente 5/100.000 (Stupp *et al.*, 2010). Esse tipo de tumor possui a capacidade de disseminação para áreas com células normais do SNC, através de complexos mecanismos moleculares e bioquímicos integrados, que requerem esforços coordenados de inúmeras interações intra e extracelulares (Nakada *et al.*, 2007). A ressecção cirúrgica do tumor tem sido identificada como um fator que favorece a um melhor prognóstico (Stupp *et al.*, 2010). Contudo, a cirurgia mesmo que associada à radioterapia e ao uso de agentes quimioterápicos, especialmente Temozolamida, não tem causado grande diferença no prognóstico dos pacientes, com mediana de sobrevivência de menos de 15 meses, para pacientes com glioblastoma multiforme (GBM) (Natsume *et al.*, 2011; Stupp *et al.*, 2010). Apesar disso, o fato da TMZ ter aumentado a mediana da sobrevida e a taxa de sobrevivência após 2 e 5 anos de tratamento fez com que essa droga seja considerada atualmente o quimioterápico padrão no tratamento do GBM (Stupp *et al.*, 2010).

Plantas ricas em carotenoides e compostos fenólicos podem possuir propriedades antioxidantes (Oboh *et al.*, 2011; Kuete *et al.*, 2008) ou pró-oxidantes (Zanatta *et al.*, 2010) e capacidade antitumoral (Kuete *et al.*, 2008; Pan & Ho, 2008; Cavarelli, Benassi & Mercadante, 2004). *Bixa orellana* L., uma planta regional da família *Bixaceae*, possui no arilo de suas sementes bixina (um carotenoide) e compostos fenólicos, importantes pelas propriedades antioxidantes, antitumorais e possibilidades medicinais destas substâncias (Alonso-Castro *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2011; Oboh *et al.*, 2011). Assim, investigou-se nesse trabalho a capacidade do extrato metanólico de *B.*

orellana diminuir a viabilidade de células neoplásicas de glioblastoma humano da linhagem GL-15 e da linhagem C6 de glioma murino, sem ser tóxico para as células gliais normais (astrócitos) *in vitro*, além dos possíveis efeitos da sua citotoxicidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.A importância dos modelos experimentais *in vitro* para estudar patologia humana, especialmente o câncer

A patologia experimental, como ciência, busca compreender e propor possíveis alternativas de tratamento de doenças através de estudos experimentais nos aspectos celulares, moleculares, bioquímicos, imunológicos, fisiológicos, fisiopatológicos, entre outros. Os modelos experimentais de cultivo celular *in vitro* são utilizados para investigar o potencial citotóxico de novas substâncias, que podem tornar-se um quimioterápico para o tratamento de neoplasias. Células em cultura são fáceis de serem manipuladas e observadas do ponto de vista microscópico, bioquímico e molecular, após a adição de substâncias no meio onde estão sendo cultivadas. Esses ensaios auxiliam a triagem de substâncias podendo ajudar a diminuir anos de pesquisa e viabilizam a diminuição do número de animais que poderiam ser utilizados.

Células em cultura são requisitadas para estudos em todos os ramos da Biologia, devido à diversidade de suas origens, pela variedade de células de animais e plantas que se encontram criopreservadas, assim como pela variedade de órgãos cujas células podem ser cultivadas, abrindo um universo de estudos no campo da Biomedicina. Neste contexto, podemos referir alguns trabalhos que seguem a linha experimental: Jaganathan & Mandal, 2009; Wu *et al.*, 2009; Pan & Ho, 2008; Gerhardt *et al.*, 2009; Nakada *et al.*, 2007; Anderson, McFarland, Gladso, 2009; Schmitt-Schillig *et al.*, 2005; Hand, Vender, Black, 1988. Os estudos de bioprospecção, principalmente os relacionados a carotenoides, flavonoides e compostos fenólicos, têm crescido muito nos últimos anos, especialmente pelos seus efeitos antioxidantes (Amaya 2010; Sakihama *et al.*, 2002; Jaganathan & Mandal, 2009); pró-oxidantes (Pan & Ho, 2008; He & Liu, 2008; Sakihama *et al.*, 2002) e antiproliferativo (Pan & Ho, 2008; Gerhardt *et al.*, 2009).

2.2. Aspectos funcionais de células gliais

As principais células presentes no tecido cerebral são: os neurônios, a neuroglia (glia), as células endoteliais da microvasculatura e a pequena população de células-tronco e/ou progenitoras (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011; Fonseca *et al.*, 2003). As células gliais representam aproximadamente 90% das células do cérebro humano (Verkhatsky & Butt, 2007). Apresentam duas grandes divisões: microglia (neuroglia) e macroglia (astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias) (Lent, 2010; Verkhatsky & Butt, 2007).

Na escala evolutiva a neuroglia atingiu o desenvolvimento máximo nos mamíferos, acompanhado de um aumento da complexidade cerebral e do potencial intelectual, correlacionado com um aumento marcante tanto do número, quanto da complexidade das células gliais (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011). O desenvolvimento evolutivo de massas neuronais organizadas inicialmente em gânglios e depois no sistema nervoso centralizado e funcionalmente segregado estimulou o aparecimento de células de suporte, os protoastrócitos, que controlavam a homeostasia extracelular, provia suporte metabólico, desenvolvimento regulado e assistia aos neurônios, complementando suas funções primárias (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011). Embora a neuroglia tenha sido concebida por Rudolf Virchow, na década de 1850, as imagens detalhadas dos inúmeros prolongamentos que emergem do corpo celular e que se ramificam profusamente formando uma densa arborização foram descritas na década seguinte por um jovem cientista, Otto Deiters, falecido aos 29 anos (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011), sendo atualmente caracterizadas pela expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011; Verkhatsky & Butt, 2007). Essas células desempenham a função de: aporte de metabólitos para células nervosas; controle das concentrações de íons, neurotransmissores e neuromoduladores (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011). Armazenam glicogênio (Souza *et al.*, 2010), cicatrização tissular (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011), detoxicação de xenobióticos (Dutheil *et al.*, 2009) e defesa do tecido nervoso (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011; Verkhatsky & Butt, 2007). Possuem uma grande variação e classificação baseadas na sua

morfologia, destacando-se a glia radial, células bipolares ovoides com prolongamentos alongados, sendo o mais comum e abundante tipo de astrócito presente no desenvolvimento embrionário do cérebro, localizado no córtex primário (Verkhatsky & Butt, 2007). Cajal, usando métodos de coloração histoquímica, confirmou idéias anteriores já existentes em sua época de que os astrócitos se originam da glia radial, alicerçando os descobrimentos recentes sobre as características de células-tronco desse tipo celular (Verkhatsky, Parpura & Rodríguez, 2011).

Os oligodendrócitos são células gliais, cuja principal função é produzir mielina, isolando os axônios das células do CNS, auxiliando a propagação dos estímulos nervosos (Verkhatsky & Butt, 2007).

2.3. Câncer

As células cancerosas são definidas por duas propriedades hereditárias: reprodução desobedecendo aos controles sobre os limites da divisão celular e invasão e colonização de regiões normais destinadas a outras células (Alberts *et al.*, 2004). Essas células fora de controle formam um tumor. Um tumor é uma população de células anormais caracterizadas por um crescimento irrestrito ao longo do tempo e pela habilidade em crescerem em pelo menos três compartimentos tissulares diferentes – o compartimento original; o mesênquima do sítio primário (invasão tumoral); um mesênquima distante (metástase tumoral) (Kleihues *et al.*, 2002). Os tumores benignos são limitados ao crescimento no compartimento original, não têm caráter invasivo, nem produzem metástases.

2.3.1. Tumores do tecido neuroepitelial

Os tumores da glia, também conhecidos como gliomas, são os tumores primários mais comuns do sistema nervoso central (Wen & Kesari, 2008). Os tumores do tecido neuroepitelial são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em tumores astrocíticos, oligodendrogliais, ependimais, oligoastrocíticos, do plexus coroide, neurais e mistos neuro-gliais,

da região pineal, embrionários e outros (Louis *et al.*, 2007). Os tumores astrocitários são graduados pela OMS em escala de I a IV de acordo com o grau de malignidade (Louis *et al.*, 2007). Dentre os tumores do tecido neuroepitelial, os astrocitomas constituem o principal tipo histológico, com distribuição correspondente a 31,3% de todos os tumores primários do SNC diagnosticados nos EUA, no período de 1997 a 2001 (Faria, Patrocínio & Robenhort, 2006).

O sistema de Saint Anne-Mayo classifica os astrocitomas baseando-se na presença ou ausência de quatro critérios: atipia nuclear, mitose, proliferação endotelial, necrose (Fonseca *et al.*, 2003). Nesse esquema a presença de 3 ou 4 critérios descritos define os tumores de alto grau (IV). Contudo, essa classificação não é aceita pela OMS.

Em decorrência da presença de variabilidade e discordância nos diagnósticos patológicos feitos entre observadores diferentes e da relevância clínica que isso tem para o estabelecimento do melhor regime terapêutico, uma revisão de rotina dos diagnósticos histopatológicos deveria ser considerada pelos patologistas (Stupp *et al.*, 2010; Van den Bent, 2010).

2.3.1.1. Glioblastoma multiforme

GBM é o tumor astrocítico mais frequente e de maior grau de malignidade, acometendo principalmente adultos, com idade média de 64 anos e localizam-se preferencialmente nos hemisférios cerebrais, particularmente nas regiões fronto-temporal e parietal (Faria, Patrocínio & Robenhort, 2006).

De acordo com evidências biológicas e clínicas, os tumores astrocíticos de grau IV podem ser classificados como glioblastoma, glioblastoma de célula gigante e gliossarcoma (Louis *et al.*, 2007). São tumores de crescimento rápido, bastante invasivos e altamente vascularizados, características utilizadas para sua classificação. Estes tumores dependem de neovascularização para seu desenvolvimento, nutrição e progressão. Os glioblastomas possuem potencial para invadir tecidos adjacentes e distantes nas áreas do cérebro, difundindo-se no espaço intracraniano causando vaso-oclusão, contribuindo para ocorrência de hipóxia e necrose do tecido nervoso

(Anderson, McFarland & Gladson, 2009; Nakada *et al.* 2007). Desde que os glioblastomas são resistentes à radioterapia e à quimioterapia convencionais, novas abordagens terapêuticas precisam ser estabelecidas e otimizadas (Tabatabai & Weller, 2011; Natsume & Yoshida, 2008) para realmente induzir a morte das células tumorais e evitar sua disseminação. Existem dois tipos de morte celular bastante distintos, a apoptose e a necrose. A necrose é tipicamente acompanhada de aumento da permeabilidade da membrana plasmática, intumescimento celular e por fim a ruptura da membrana plasmática. A apoptose é caracterizada por formação de vesículas na membrana plasmática (em inglês, *blebbings*), condensação da cromatina, ativação de endonucleases e externalização da fosfatidilserina. Os gliomas têm um número aumentado de células endoteliais e estratégias terapêuticas que diminuam a neovascularização utilizando inibidores podem ajudar no tratamento. Inibidores de metaloproteinases auxiliam a diminuir a migração endotelial. Inibidores do fator de crescimento vascular endotelial são importantes, por desempenhar um relevante papel na vascularização e neovascularização, ligando-se a receptores associados a tirosina cinase em células endoteliais.

Um grande problema no tratamento do glioblastoma é o fato de muitos quimioterápicos não atravessarem a barreira hematoencefálica (Natsume & Yoshida, 2008), que atua principalmente para proteger o cérebro de substâncias químicas presentes no sangue, regulando a passagem dessas moléculas na tentativa de permitir um ambiente químico protegido e em perfeito funcionamento (Lent, 2010).

2.4. *Bixa orellana*

2.4.1. Origem, etnobotânica e aplicações comerciais

B. orellana L. é uma planta tropical da família *Bixaceae*, e ordem Malvales, conforme catalogação e registro botânico por Flora Zambesiaca e também pela Flora Brasiliensis, de acordo com as normas e a importância de identificação e classificação das plantas (Nesbitt *et al.*, 2010). Popularmente, essa planta é chamada de "urucum", historicamente, o nome vem da língua Tupi, no qual *urucu* significa *tintura vermelha*, no Brasil (Pontes, 1981). Em *Yurakaré*, uma língua falada por cerca de 2500 pessoas nas planícies tropicais da região central da Bolívia, a cor *beymi* refere-se ao nome desta planta, representando tons entre o amarelo e o vermelho (Van Gijn, Hirtzel & Gipper, 2010). O nome local desta planta na Guiné é *djaboran* (Magassouba *et al.*, 2007), e na República Dominicana é *bija* (Vandebroek *et al.*, 2010).

B. orellana foi provavelmente usada como alimento pelos povos que viveram em *Kaminaljuyu*, a maior e mais importante cidade maia pré-hispânica, das montanhas da Guatemala, ocupada a partir de 1000 aC a 900 dC (Wright *et al.*, 2010). No entanto, este arbusto é considerado como uma espécie exótica em uma comunidade localizada no município de Aiuaba do Estado do Ceará no Brasil semi-árido nordestino, onde é cultivado para o uso medicinal de suas folhas e sementes para tratar a gripe, problemas de garganta, bronquite e diabetes (Cartaxo, Souza & Albuquerque, 2010). Por outro lado, *B. orellana* representa, efetivamente, 2% da área de cultivo comercial em territórios controlados pelos jivaros, grupo indígena da bacia do rio Pastaza inferior da Amazônia equatoriana, onde esta planta é conhecida como "urucum" (López & Sierra, 2011). *B. orellana* foi introduzida em Los Santos, que é um local no Panamá rural, onde é cultivada pelos agricultores para consumo humano (Garen *et al.*, 2011). Pode ser encontrado no conhecimento tradicional dos povos indígenas da América do Sul, métodos para a extração dos pigmentos das sementes de *B. orellana* através do contato com água, bem como para a preparação de sua forma seca (Bardi, Gutiérrez-Oppe & Politano, 2011). Suas

sementes produzem comercialmente o pigmento de urucum (comestível), que é usado em alimentos (Scotter *et al.*, 2002).

2.4.2. Características fitoquímicas

Um conjunto de etiquetas de seqüências expressas (do inglês “Expressed Sequence Tags”, EST) foi caracterizado a partir de uma biblioteca de cDNA de sementes de *B. orellana*, e entre os 792 clones seqüenciados, 101 codificavam transferases, como cafeato O-metiltransferase (EC 2.1.1.68) envolvida na biossíntese de flavonoides (Soares *et al.*, 2011). A expressão de um gene específico, licopeno beta cromoplasto-ciclase (GenBank CAD70565), está envolvido no ciclo de síntese do licopeno em ambas as extremidades dessa molécula linear para produção de β -caroteno (Ahrazem *et al.*, 2010). As análises espectrofotométricas de carotenoides totais nos extratos com clorofórmio mostraram que estes pigmentos estão presentes nas folhas, brotos, flores, cápsulas de frutos maduros, imaturos e sementes de frutos maduros de dois tipos de "urucum": com flores rosa ou branca (Rodríguez-Ávila *et al.*, 2011). A bixina é um pigmento específico das sementes, que também é sintetizada a partir de licopeno em reações catalisadas por enzimas (Figura 1) (Bouvier *et al.*, 2003). A análise filogenética de dioxigenases de clivagem de carotenoides a partir de diversos táxons mostra que o dioxigenase de clivagem do licopeno (BoLCD) tem homologia com genes de codificação de clivagem de carotenoides dioxigenase 4, que foram encontrados apenas nas plantas em floração (Vallabhaneni, Bradbury & Wurtzel, 2010). Os genes codificadores da síntese de bixina não estão presentes apenas em *Bixa orellana*, mas também em *Crocus sativus* (açafão) e sementes de *Vitis vinifera* (uva), e este composto pode também ser obtido e caracterizado a partir destas espécies (Ramamoorthy *et al.*, 2010). A análise do arilo de sementes por espectrometria de massa de íons secundários caracteriza o corante, sem qualquer tratamento da amostra, mostrando a presença de bixina e *m*-xileno, que resulta da degradação da bixina pela luz (Felicíssimo *et al.*, 2004). O equilíbrio da umidade é um parâmetro importante a ser conhecido a fim de evitar a degradação térmica dos pigmentos, especialmente bixina, durante a etapa de secagem das sementes, e pode ser descrito por uma equação como uma

função da umidade relativa do ar e da temperatura (Ribeiro *et al.*, 2005). Os dois principais isômeros, *trans*-bixina (Fig1 B) e *cis*-bixina (Fig1 A), têm diferentes bandas características de estiramento 1 em estudos de espectroscopia de Raman, denominado $\nu_{C=C}$. Esta posição do isômero *trans* é observada em 1523 cm^{-1} , entretanto, o *cis* mostra um sinal presente em 1.518 cm^{-1} (de Oliveira, V.E. *et al.*, 2010). Espectros Raman obtidos diretamente a partir de sementes, e também do pigmento comestível comercialmente conhecido como "coloral", sem qualquer pré-tratamento foi muito semelhante ao espectro obtido a partir do padrão de *cis*-bixina, indicando que este carotenoide é o predominante (de Oliveira, V.E. *et al.*, 2010). Algumas frações de norbixina apresentam agregados moleculares tipo H em água, que são geralmente identificados pelas bandas de absorção características no espectro visível abaixo de 400 nm (Chábera *et al.*, 2010). O espectro de absorção transitório da norbixina em água medido 1 ps após excitação com luz de comprimento de onda de 475 nm mostra a presença de espécies S1 que têm duração de 18 ps (Chábera *et al.*, 2010). Cinco picos foram observados de carotenoides em espectros de absorbância dos extratos de sementes com acetona e clorofórmio (1:9, v/v) em 276, 363, 440, 468 e 503 nm (Dias *et al.*, 2011). Os picos de absorção em 355 e 460 nm são típicos da conformação *cis*-bixina (Scotter, 2009). Dias *et al.* (2011) confirmou o pico de absorção em 360 nm. O extrato de sementes com solvente etanólico foi usado para tingir fibras e vasos em histologia vegetal e apresentaram absorbância espectrofotométrica em 272, 327, 421, 430, 456, 485 nm (Akinloye *et al.*, 2010). O corante norbixina mostrou-se mais amarelo quando comparado com a bixina, entretanto, observou-se que o aumento na sua concentração resultou em aumento de tonalidade vermelha, mas a cor vermelha é mais intensa na bixina do que na norbixina (Satyanarayana, Rao, Rao, 2010).

2.4.3. Propriedades medicinais

B. orellana foi usada como um placebo em um estudo controlado randomizado para avaliar os efeitos da água potável fortificada com ferro sobre anemia em pré-escolares, mas, curiosamente aumentos significativos do volume corpuscular médio e do hematócrito foram observados em crianças (Arcanjo *et al.*, 2010). Provavelmente, urucum e seus componentes não são tão inertes como esses autores pensaram, uma vez que o ferro está presente no interior da semente (Felicíssimo *et al.*, 2004). Bixina e norbixina foram utilizadas como sensibilizadores na preparação de células solares com filmes mesoporosos, nanoestruturados de TiO₂ e ZnO (Gómez-Ortiz *et al.*, 2010). Isto significa que as moléculas de bixina absorvem luz visível, e podem doar elétrons do estado excitado para receptores. Sabe-se que a fotoativação de algumas moléculas, como riboflavina, pode produzir espécies reativas de oxigênio, que podem induzir fenômenos biológicos como a depressão alastrante cortical no cérebro de ratos alimentados com uma dieta deficiente em vitaminas antioxidantes C e E (El-Bachá, de Lima & Guedes, 1998). Bixina não foi genotóxica comparada com a *N*-dietilnitrosamina (DEN), uma substância hepatocarcinogênica, em células hepáticas de ratos, avaliadas pelo teste do cometa (Agner *et al.*, 2004). Hagiwara *et al.* (2003) demonstraram que a norbixina não induziu hepatocarcinogênese em ratos e também não aumentou significativamente os valores de glutatona S-transferase placentária, comparada com o modelo de indução de hepatocarcinogênese com DEN. Bixina não induziu aberrações cromossômicas em linfócitos humanos (Antunes *et al.*, 2005). Norbixina (2mM) foi capaz de proteger os danos no DNA provocados pela radiação UV e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), destacando a função antioxidante e antimutagênica deste carotenoide em células de *Escherichia coli* (Júnior *et al.*, 2005). Os extratos apolares de *B. orellana* apresentaram maior atividade antioxidante que os extratos polares (Oboh *et al.*, 2011). A presença de tocotrienóis tem sido relatada em suas sementes (Falk & Munné-Bosch, 2010), e propriedades antioxidantes de *B. orellana* foram atribuídas a tocotrienóis atuando junto com bixina (Castro, Mariutti & Bragagnolo, 2011). Rojas *et al.* (2006) apresentaram uma atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* semelhante à gentamicina de extratos de

semente de *B. orellana*; esteroides e antocianinas, presentes nestas sementes, apresentaram uma atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. A atividade antibacteriana de extratos de sementes também foi detectada por sobreposição de placas cromatográficas em camada delgada com ágar contendo *Staphylococcus aureus* (Marston, 2011). Vandebroek *et al.* (2010) relataram o uso de sementes de *B. orellana* para tratar a infertilidade e infecções vaginais. Lomonte *et al.* (2009, 2010) demonstraram a capacidade do extrato de *B. orellana* reduzir o efeito letal de *Bothrops asper*, administrando intramuscularmente em ratos o veneno de *Bothrops asper* e o extrato de *B. orellana* foi administrado via intraperitoneal, comprovando *in vitro* o potencial do extrato de inibir hemorragia e edema provocados pelo veneno, indicando o efeito benéfico do extrato de *Bixa orellana* já reconhecidos pelos curandeiros da Colômbia. Bixina (Reddy, Lindo-Alexandre & Nair, 2005) e *cis*-bixina (Tibodeau, Isham & Bible, 2010) demonstram potencial antitumoral em linhagens celulares. Esta planta é utilizada no México para o tratamento empírico de condições dermatológicas e tumores de pele, e o extrato etanólico da planta inteira foi citotóxico para células de neuroblastoma N2a de camundongo (Alonso-Castro *et al.*, 2011). O extrato metanólico das sementes apresentou atividade inibitória do receptor de ligação canabinoide (CB1), o que pode ser útil para o tratamento de obesidade (Yuliana *et al.*, 2011).

Algumas propriedades medicinais de carotenoides (*cis*-bixina, *trans*-bixina e norbixina) e compostos fenólicos (*hipolaetina*) (Figura 2), provavelmente presentes no extrato metanólico de *B. orellana*, já foram investigadas por outros autores, sugerindo mais estudos para se compreender as propriedades medicinais, especialmente a capacidade antitumoral destas substâncias.

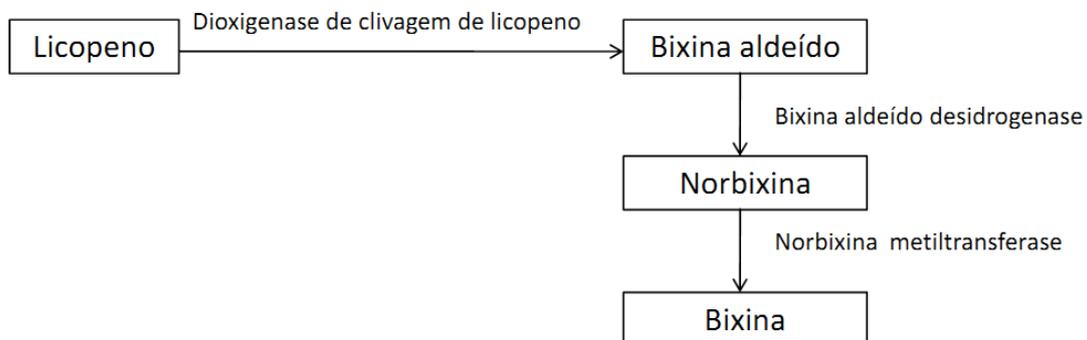


Figura 1: Enzimas envolvidas na síntese de bixina a partir do licopeno.

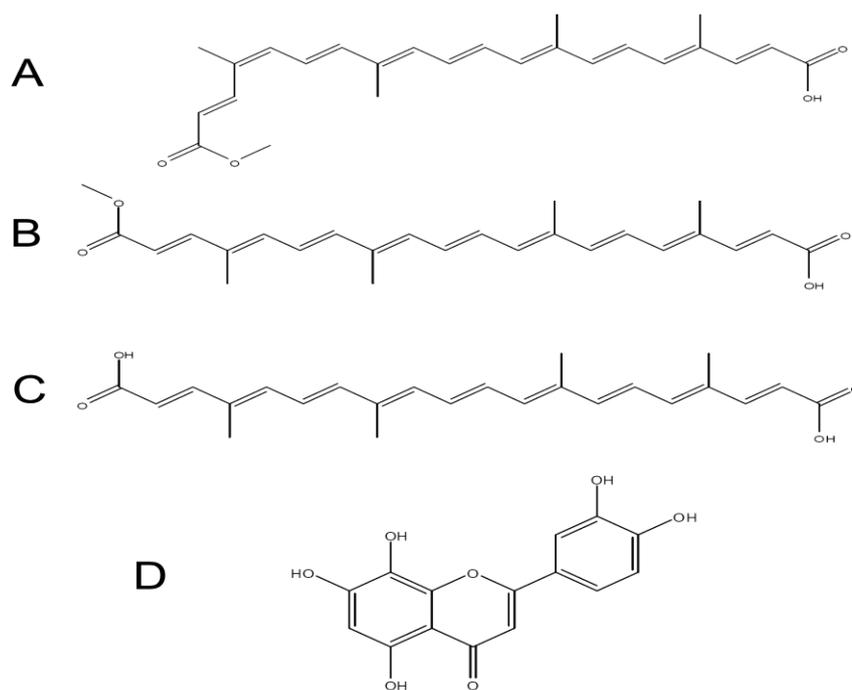


Figura 2: Estrutura química de substâncias presentes no extrato metanólico de *B. orellana* (A) Z-bixina ou *cis*-bixina. (B) E-bixina ou *trans*-bixina. (C) Norbixina. (D) Hipolaetina.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

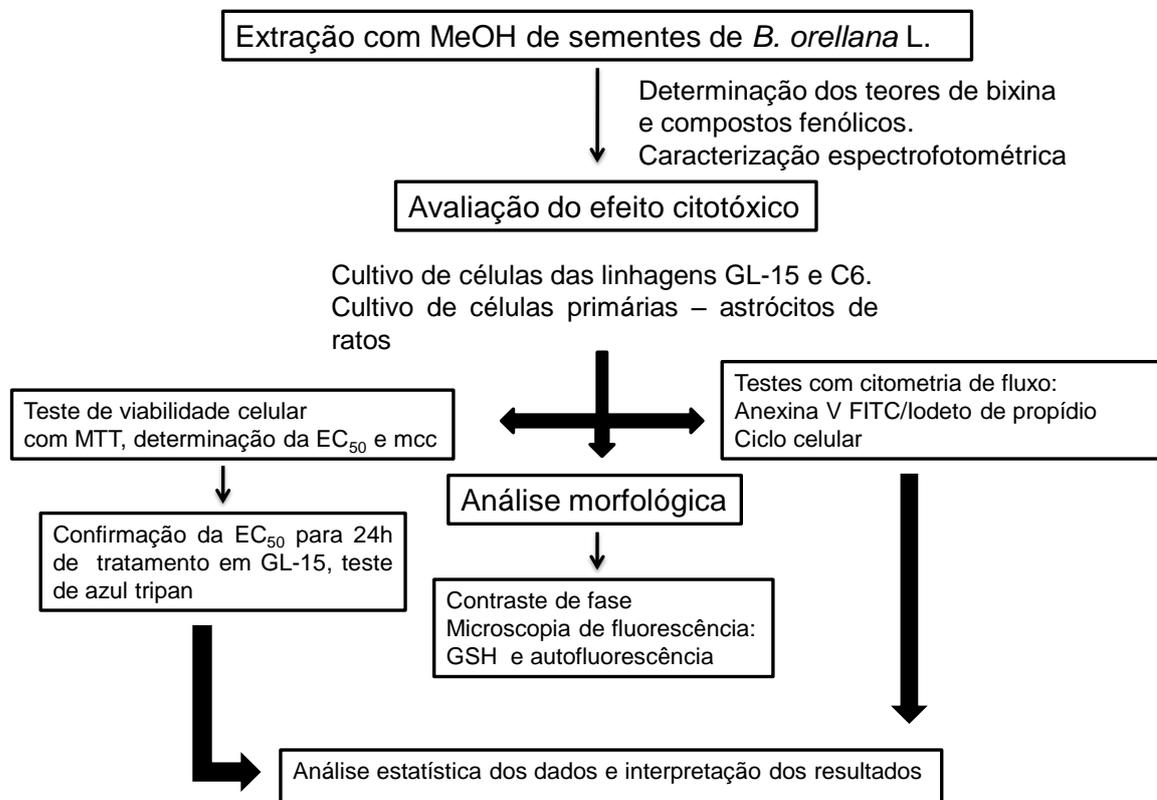
O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial do extrato metanólico de *Bixa orellana* L. diminuir a viabilidade de células neoplásicas de GBM da linhagem GL-15 e glioma murino (C6) sem toxicidade para células de astrócitos normais murinos, *in vitro* e investigar seus efeitos e mecanismos de citotoxicidade.

3.2. Específicos

- a) investigar o espectro de absorção da luz ultravioleta e visível e quais os teores de bixina e compostos fenólicos;
- b) testar o efeito da variação da concentração de extrato metanólico de *B. orellana* sobre a viabilidade, integridade e morfologia celular;
- c) determinar a concentração efetiva do extrato metanólico de *B. orellana* capaz de diminuir a viabilidade celular em 50 % (EC_{50});
- d) investigar a propriedade antiproliferativa induzida pelo extrato metanólico de *B. orellana* por interferência no ciclo celular;
- e) investigar se o mecanismo de citotoxicidade é através de depleção de glutathione reduzido (GSH);
- f) investigar o tipo de morte celular induzida pelo extrato metanólico de *B. orellana* : apoptose ou necrose;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho experimental



4.2 Extração e determinação de compostos fenólicos e bixina

As sementes de *B. orellana* (urucum) foram coletadas pelo fornecedor em dezembro de 2008 e compradas em janeiro de 2009, no Centro de abastecimento do Rio Vermelho (CEASA) de Salvador, Bahia; foram identificadas como sementes de *Bixa orellana* L. pela botânica Maria Lenise Silva Guedes (curadora do Herbário Alexandre Leal Costa, Departamento de Botânica da UFBA) por comparação com a exsicata de *Bixa orellana* L. depositada neste Herbário, nº de registro 023255. A metodologia de extração foi baseada em Cardarelli, Benassi & Mercadante (2008). O solvente utilizado para obtenção do extrato foi MeOH. As sementes (20g) foram submetidas a 4 extrações consecutivas por 12 minutos cada em um equipamento de banho com ultrassom com uma proporção massa/volume de (1:2), em temperatura ambiente. O solvente foi eliminado sob pressão reduzida e em seguida evaporado e armazenado em dessecador em congelador (temperatura de - 20 °C). A determinação da concentração de bixina foi feita através de adaptações da metodologia de Cardarelli, Benassi & Mercadante (2008). Sua concentração foi calculada pelo coeficiente de absorção a 470nm (Micronal B 382e). A determinação do conteúdo fenólico foi realizada utilizando reagente de Folin-Ciocalteu e pirogallol como padrão (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós, 1999).

4.3. Determinação do espectro de absorção espectrofotométrica

O extrato metanólico de *B. orellana* na concentração de 100 µg foi diluído em 1000 µL de DMSO, e uma segunda diluição na proporção de 1:20 (v/v) em água foi realizada, sendo utilizado como branco DMSO em água (1:20, v/v). A leitura das absorções foi realizada em espectrofotômetro (Hewlett-Packard modelo 8452) utilizando cubeta de quartzo, de 1 cm de trajeto ótico.

4.4. Cultura de células: linhagens neoplásicas (GL-15 e C6) e cultura primária de astrócitos

O LabNq mantém em estoque a linhagem GL-15 (glioblastoma multiforme humano), origem clonal (Bocchini *et al.*, 1993) e C6 (glioma murino), origem clonal descrita por Skaper & Seegmiller (1976). As células de GL-15 e C6 foram cultivadas em meio de cultivo DMEM (Cultilab, Campinas- SP), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas- SP), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Cultilab, Campinas- SP), e armazenadas em uma incubadora de CO₂ a 37 °C, até obtenção da confluência, sendo então tripsinizadas (Tripsina, Sigma – U.S.A.), e semeadas em placas onde foram realizados os testes. A densidade celular variou com os modelos experimentais utilizados, sendo: para o teste de viabilidade celular com MTT, $3,1 \times 10^4$ células/ cm² e para os teste de azul tripan, ciclo e tipo de morte celular, GSH e fluorescência, $2,1 \times 10^4$ células/ cm². A morfologia celular foi observada por microscopia em contraste de fase durante os experimentos.

As culturas primárias de astrócitos foram obtidas a partir do cérebro de ratos recém-nascidos de acordo com a descrição de MacVicar (1984), totalizando 12 ratos neonatos. Esta quantidade mínima de animais está de acordo com regras gerais estabelecidas pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (Certificado 09/09 – Faculdade de Odontologia/UFBA). Os hemisférios cerebrais foram isolados de forma asséptica e as meninges removidas. O córtex foi macerado sobre tela estéril Nitex com malha de 75 µm. As células foram ressuspensas em DMEM suplementado e semeadas em placas de cultura. Após dois dias as culturas foram levemente agitadas e o meio trocado, para eliminar as células de microglia, as outras etapas de cultivo foram as mesmas descritas para GL-15 e C6.

4.5. Testes de Citotoxicidade

4.5.1. Viabilidade celular por MTT

O teste empregando o Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) é baseado na capacidade das desidrogenases mitocondriais de células vivas converterem esse substrato amarelado em formazan, um produto azul. A quantidade de formazan formada é proporcional ao número de células viáveis. Os testes foram iniciados após as células estarem confluentes.

Soluções concentradas (48 mg/mL) do extrato metanólico foram preparadas e estocadas a -20° C. As mesmas foram diluídas e adicionadas aos 96 poços das placas, adotando-se um $n = 8$ para cada grupo. O grupo controle foi tratado apenas com o solvente (DMSO) a 0,5% diluído em meio de cultura. As células foram expostas ao extrato por 24, 48 e 72 h para as células da linhagem GL-15, e 48 h para a linhagem C6 e astrócitos, as concentrações testadas variaram entre 60 - 240 $\mu\text{g/mL}$. Ao final desta exposição, o meio foi substituído, e uma solução estéril de MTT em PBS foi diluída em meio para se obter uma concentração final de 1 mg/mL. As células foram incubadas em presença do substrato por mais duas horas. Ao final da incubação, adicionou-se uma solução de lise, que funcionou também como solvente do formazan, constituída de SDS a 20 % (p/v) em dimetilformamida, pH 4,7. No dia seguinte a placa foi lida em um leitor colorimétrico de microplacas a 540 nm. Regressões não-lineares foram feitas para se determinar a EC_{50} , um parâmetro capaz de avaliar a viabilidade das células para a linhagem GL-15, e para C6 e astrócitos foi determinada somente a mcc, na escala de diluição utilizada.

4.5.2. Teste de viabilidade celular com Azul Tripán

O teste de exclusão do azul tripán baseia-se na capacidade do corante não penetrar em membrana plasmática íntegra, característica de células viáveis. A alteração da permeabilidade de membrana em consequência à morte celular permite a passagem do corante ao interior celular, corando as células em azul. Após a exposição das células aos extratos as células mortas não aderentes são eliminadas por duas lavagens sucessivas com PBS estéril, a 4 °C. As células aderentes foram descoladas do frasco de cultura através de incubação com tripsina a 0,05 % e EDTA 0,53 mM durante 5 minutos a 37 °C. Ao fim dessa incubação a atividade da tripsina é inibida por soro fetal bovino a 10 % em meio de cultura. As células foram recuperadas por centrifugação a 2.000 \times g por 5 minutos e repostas em suspensão em meio de cultura. O azul tripán foi adicionado de maneira a se obter uma concentração final de 0,4 g/L. As células foram incubadas em presença do corante por 7 minutos e em seguida contadas em câmara de Neubauer. Contou-se as células viáveis e não viáveis.

4.6. Análises morfológicas

4.6.1. Microscopia de contraste de fase

A morfologia celular foi analisada através de microscopia de contraste de fase usando um microscópio invertido Eclipse TS100 (Nikon, Tóquio, Japão). As imagens foram obtidas através de câmera Coolpix 4300 digital (Nikon) acoplada ao microscópio. A única modificação aplicada às imagens foi a transformação das fotos coloridas para preto e branco. Uma régua com marcas a cada 10 μm (Olympus, Tóquio, Japão) foi fotografada sob as mesmas condições das amostras, servindo para dimensionar as distâncias nas fotos.

4.6.2. Capacidade de fluorescência do extrato em microscopia de fluorescência

As células foram tratadas por 48 horas com o extrato metanólico de *B. orellana* (200 $\mu\text{g/mL}$) e para fixação removeu-se o sobrenadante, lavou-se 3x com PBS, adicionando-se 1,0 mL de metanol e incubou-se por 20 minutos no congelador (temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Secou-se por 1 hora à temperatura ambiente e armazenou-se em geladeira. As células foram observadas em microscópio de fluorescência e microscopia óptica (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, EUA). Na microscopia de fluorescência as células foram observadas com unidade de espelho MWG2, com filtro de excitação entre 510 e 550 nm, filtro de emissão em 590 nm e espelho de discromatopsias com capacidade de bloqueio em 570 nm.

4.6.3. Avaliação da depleção de glutathion reduzido (GSH) através de microscopia de fluorescência

Monoclorobimano (MCB) é uma substância não fluorescente, permeável às membranas celulares e que reage com grupamentos tióis. Ao reagir com a cisteína- presente no GSH forma-se um conjugado MCB-GS. Este emite fluorescência facilmente detectada. Esta reação pode ser observada nas células vivas através de microscopia de fluorescência e é usada para investigar os níveis intracelulares de GSH em diferentes tipos celulares. Neste estudo o MCB foi utilizado para avaliar a depleção de GSH.

Após 24 h de exposição a 200 µg/mL de extrato metanólico de *B. orellana*, as células cultivadas em placas de Petri de 40 mm, foram lavadas três vezes com tampão fosfato e incubadas com 400 µL de meio contendo 1 mM de MCB, durante 40 minutos, sob as mesmas condições de cultivo anteriores descritas. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas (3x) com tampão fosfato. Após essas lavagens, levou-se as placas para observação em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51 – URA2, µMWU2), com espelho dicromático de 400 nm e um filtro de emissão de 420 nm, excitou-se o fluorocromo na faixa entre 330-385 nm. As fotografias foram realizadas utilizando-se 60 ms como tempo de exposição para todas as amostras. As imagens foram obtidas através de câmera Olympus BX-2 acoplada ao microscópio de fluorescência. A Butionina-sulfoxamina (BSO) é extensivamente usada para induzir a depleção de GSH, uma vez que essa substância inibe a γ -glutamilcisteína sintetase, enzima importante para a síntese de GSH. Este ensaio utilizou 1 mM de BSO como controle positivo. O grupo de células onde nenhuma droga foi aplicada representou o controle negativo. Todo ensaio foi realizado em ambiente livre de exposição à luz. Uma solução estoque de MCB (100 mM) foi preparada em etanol absoluto e mantida em ambiente escuro a -20°C. A concentração final de etanol no meio foi 1% (v/v).

4.7. Detecção de alterações do ciclo celular por citometria de fluxo

Após 48 h de tratamento das células cultivadas em placas de Petri (40 mm de diâmetro) com 80 µg/mL de extrato metanólico de *B. orellana*, retirou-se o sobrenadante, as placas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas (4.500 \times g por 5 minutos), o sedimento foi fixado com etanol a 70 % gelado, por 1 h a 8 °C, centrifugado novamente por 5 minutos a 4.500 \times g, o sedimento foi ressuspensão em 97 µL de PBS e 3 µL de RNase (Qiagen) por 30 minutos, adicionou-se 1970 µL de PBS e 3 µL de Iodeto de Propídio. Os controles negativos foram meio e DMSO a 0,5% (solvente do extrato). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.8. Detecção do tipo de morte celular por citometria de fluxo

Após 48 h de exposição a 80 µg/mL de extrato metanólico de *B. orellana*, as células foram cultivadas em placas de Petri (40mm de diâmetro), foram tripsinizadas e centrifugadas (2.000 \times g por 5 minutos). Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 50 µL de PBS e incubadas, durante 15 minutos, com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP), homogenizadas em 200 µL, conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante (TACS™ Annexin-V-Kit, Trevigen, Gaithersburg, Alemanha).

A anexina V é uma proteína com propriedades de ligação à fosfatidilserina. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. Na apoptose a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina-V. Entretanto, recomenda-se a utilização de IP, que marca somente as células necrosadas, ou em estágio tardio de apoptose, permitindo a diferenciação dos dois processos. As células vivas não serão marcadas nem por anexina V, nem por IP.

A análise das respostas ao tratamento com o extrato foram padronizadas para 10.000 células usando o programa Cell quest 3.1 para FACSort (Becton Dickinson San Jose, E.U.A.). Foram usados o detector de FL-

1 para aquisição dos dados correspondentes à marcação com anexina V e o FI-2 para IP.

4.9. Análise estatística

A análise estatística nos testes de citotoxicidade foi realizada pelo teste ANOVA univariado seguido do teste de Student-Newman-Keuls. Esse método serve para comparar vários grupos com variação de apenas um parâmetro, no caso, a concentração do extrato. O método ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi empregado para comparar medianas e quartis quando a distribuição das réplicas não foi normal. O cálculo da EC_{50} foi realizado por regressão não linear.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais de bixina e compostos fenólicos presentes no extrato metanólico de *B. orellana* L., foram 0,170 e 0,05 mg/mg de extrato seco, respectivamente. Esses resultados estão próximos dos percentuais descritos por Cardarelli, Benassi & Mercadante (2008). Bixina e norbixina, são carotenoides com moléculas polares, solúveis em meio aquoso (Scotter *et al.*, 2009), provavelmente presentes no extrato metanólico utilizado (Figura 2). Atualmente, as propriedades ópticas de bixina foram usadas para determinar o seu conteúdo em extratos de sementes e corantes comerciais (Dias *et al.*, 2011). O extrato metanólico demonstrou picos de absorção de luz visível em 286, 363 e 435 nm (Figura 3). Picos de 276, 440, e 503 foram atribuídos a bixina, e o pico de 363 nm foi atribuído à conformação *cis*-bixina, norbixina apresentou pico de absorção máxima em 446 nm (Chábera *et al.*, 2010). Compostos isolados, por cromatografia líquida, dos extratos de sementes de *B. orellana* com solventes acetona e metanol/água apresentaram absorção máxima para a hipolaetina (321 nm), derivado de ácido cafeico (316 nm) e a bixina apresentou picos de absorção em 430, 459 e 487 nm, em ácido fórmico a 2 % em metanol/água (Chisté *et al.*, 2011a).

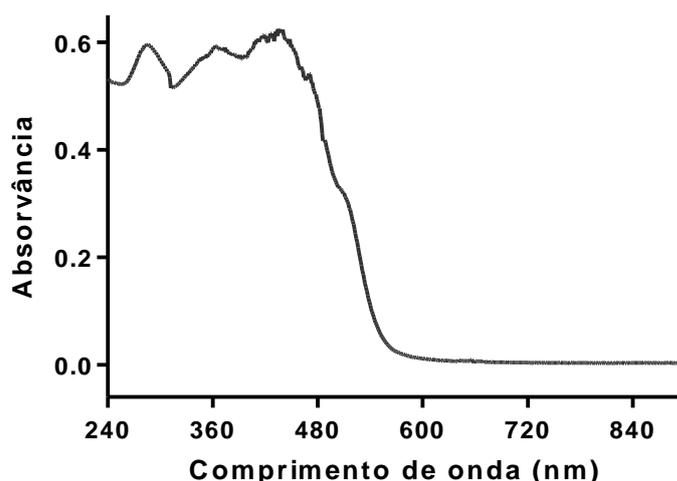


Figura 3: Espectro de absorção do extrato metanólico de *B. orellana* com picos de absorção de luz visível em 286, 363 e 435 nm.

As propriedades antitumorais de algumas substâncias naturais são de grande interesse na busca de novas drogas com este potencial. Alguns trabalhos científicos investigaram esta propriedade em modelos experimentais de cultura de células do SNC, especialmente, as células tumorais de glioma (Senft *et al.*, 2010; Gerhardt *et al.*, 2009).

O teste de MTT, freqüentemente, é utilizado para investigar o potencial citotóxico de substâncias extraídas de plantas (Senft *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2007) e quimioterápicos (Hand, Vender, Black, 1988). Neste trabalho, investigou-se a capacidade do extrato metanólico, das sementes de *B. orellana*, diminuir o metabolismo mitocondrial, um efeito citotóxico, através do teste de MTT (Figura 4).

Determinou-se as medianas das EC₅₀ nos experimentos para a linhagem GL-15 (Figura 4A - C) através das equações (1), (2), (3), e linhagem C6 (Figura 4D) através da equação (4). Nestas equações, V corresponde à viabilidade celular, normalizada para os dados medidos em condições controle, e C corresponde à concentração do extrato. O experimento representando a mediana da EC₅₀ após 24 horas de tratamento, determinada pela equação não linear (1), é representado na Figura 4A:

$$V = 40,56 + \{65,94 / [1 + 10^{(9,87 \log C - 22,06)}]\}; \quad (1)$$

$$(R^2 = 0,9622)$$

A EC₅₀ mediana calculada, após 24 horas de tratamento foi 206 µg/mL, com variação de 203 a 206 µg/mL. Neste experimento, a MCC mediana foi 180,00 µg/mL, com variação de 160,00 e 180,00 µg/mL, em três experimentos independentes.

O experimento representando a mediana da EC₅₀ após 48 horas de tratamento, determinada pela equação não linear (2), é mostrado na

Figura 4B:

$$V = 4,16 + \{104,54 / [1 + 10^{(29,17 \log C - 65,92)}]\}; \quad (2)$$

$$(R^2 = 0,9588)$$

A EC₅₀ mediana calculada foi 184 µg/mL, com variação de 158 a 238 µg/mL. Neste experimento, a MCC mediana foi 180 µg/mL, com variação de 120 e 200 µg/mL, em três experimentos independentes.

O experimento representando a mediana da EC₅₀ após 72 horas de tratamento foi determinada pela equação não linear (3), (Figura 4C):

$$V = 90,66 / [1 + 10^{(6,03 \log C - 12,75)}]; \quad (3)$$

$$(R^2 = 0,9706)$$

A EC₅₀ mediana calculada, após 72 horas, foi 126 µg/mL, com variação de 107 a 128 µg/mL. Neste experimento, a MCC mediana foi 120 µg/mL, com variação de 100 e 120 µg/mL, em três experimentos independentes.

O experimento representando a EC₅₀ em células C6 de glioma de rato, após 48 horas de tratamento, determinada pela equação não linear (4), é representado na Figura 4D:

$$V = 10,50 + \{ 85,71 / [1 + 10^{(8,50 \log C - 17,27)}] \}; \quad (4)$$

$$(R^2 = 0,9612)$$

A EC₅₀ calculada após 48 horas foi 110 µg/mL. Neste experimento, a MCC mediana foi 80 µg/mL, com variação de 60 a 100 µg/mL, após três experimentos independentes.

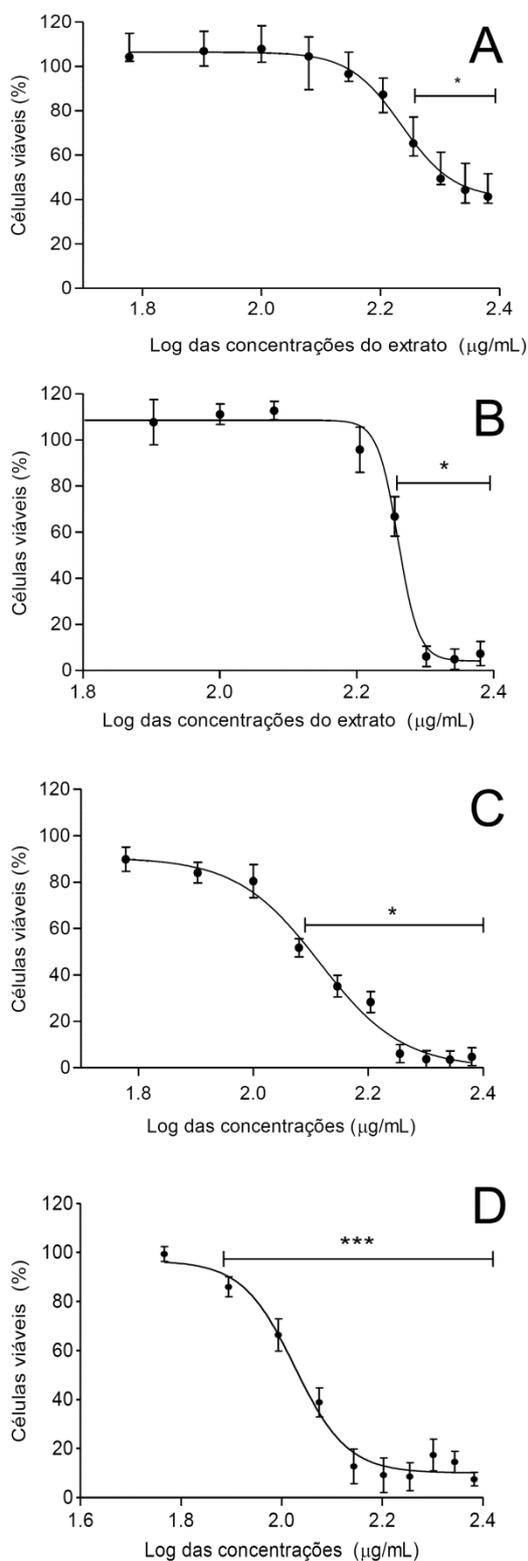


Figura 4: Citotoxicidade do extrato metanólico de *Bixa orellana* L. em células de glioblastoma humano (GL-15) A-C, e glioma murino (C6). A. Células tratadas por 24h. B. Células tratadas por 48 horas. C. Células tratadas por 72 horas. D. Células (C6) tratadas por 48 horas. As diferenças estatísticas foram assinaladas como: (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,0001$ comparadas com o controle tratado com DMSO a 0,5 %.

A diminuição do número de animais para experimentação é uma preocupação ética crescente da comunidade científica. Por isso escolhemos somente um tempo, o intermediário - após 48h de tratamento, para realizar os experimentos com astrócitos normais de ratos neonatos (Figura 5), que só apresentaram citotoxicidade na última concentração testada (240 µg/mL) em três experimentos independentes, objetivando comparar com as linhagens neoplásicas C6 e GL-15.

O trabalho de Hand, Vender, Black (1988) utilizou o teste de MTT para triagem de agentes anti-neoplásicos contra gliomas, comparando a citotoxicidade em linhagem de glioma humano e de rato (C6), indicando uma boa correlação entre o efeito citotóxico das drogas para C6 e para linhagens de glioma humano.

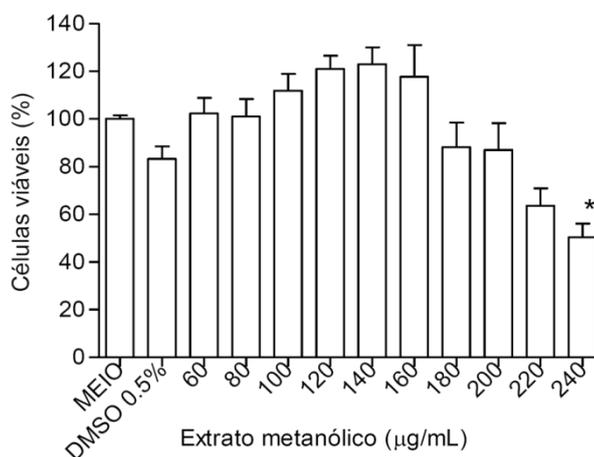


Figura 5: Citotoxicidade do extrato metanólico de *B. orellana* em células astrocíticas evidenciada pelo MTT. A diferença estatísticas foi assinalada como: (*) $p < 0,05$ comparada com o controle tratado com DMSO a 0,5 %.

Para confirmar a hipótese de diminuição da viabilidade celular na EC₅₀ determinada em GL-15 após 24h de tratamento, utilizou-se o teste de azul tripan, que é um teste de exclusão, que confirma a diminuição da quantidade de células vivas (Cavaliere *et al.*, 2004), obteve-se uma diminuição da viabilidade em 45,64% (Figura 6).

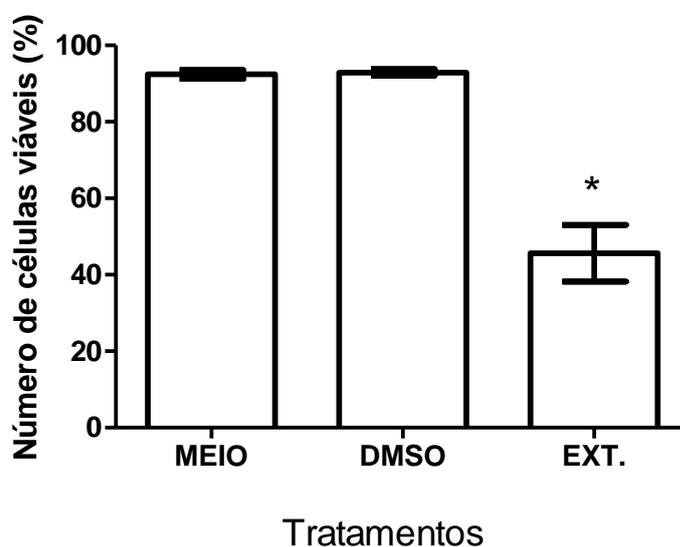


Figura 6: Teste de exclusão do Azul Tripan em GL-15 após 24 horas de tratamento com extrato metanólico de *B. orellana* a 200 µg/mL (EXT.). (*) Diferença estatística de $p < 0,05$, em relação ao controle tratado apenas com DMSO a 0,5 %.

O extrato metanólico de *B. orellana* L. induziu diminuição da viabilidade celular de células neoplásicas, indicando um efeito citotóxico maior para essas células e uma provável resistência em células normais. Outros trabalhos evidenciaram o potencial citotóxico para linhagens tumorais de substâncias provavelmente presentes no extrato metanólico: o extrato da planta é utilizado para tratamento de tumores de pele (Alonso-Castro *et al.*, 2011); o extrato etanólico de sementes foi citotóxico para células de neuroblastoma murino (N2a) (Mazzio & Solimon, 2009); bixina foi capaz de diminuir a proliferação celular de várias linhagens de células neoplásicas: HCT-116 (cólon), SF-268 (glioblastoma humano), AGS (estômago), NCI-H460 (pulmão) com as IC₅₀ de 33, 49, 45 e 39 µg/mL, respectivamente (Reddy, Lindo-Alexandre & Nair, 2005); *cis*-bixina apresentou atividade antitumoral em várias linhagens celulares - A549 (pulmão), U2OS (osteossarcoma), PC3 (próstata), HCT-118 (cólon), MCF-7 (mama), DRO (tireoide anaplásico) e BHP5-16 (tireoide papilar), e células hematopoiéticas, reduzindo a viabilidade de células de mieloma resistentes (CD138⁺) e não foi citotóxico para leucócitos normais (CD138⁻), um indicativo de citotoxicidade seletiva para células neoplásicas, característica importante para possíveis aplicações terapêuticas (Tibodeau, Isham & Bible, 2010).

As análises morfológicas com microscopia de contraste de fase demonstraram: aumento de espaços vazios entre as células e aparente diminuição da viabilidade celular, proporcional ao aumento das concentrações usadas (Figura 7), e aparecimento de células arredondadas (Figura 7) e alongamento das extremidades, que sugerem o efeito citotóxico de ativação glial (Figura 7, flecha). Pehar *et al.* (2002) observaram alongamentos das extremidades em células astrocíticas tratadas com óxido nítrico, indicando a capacidade de substâncias citotóxicas induzirem alterações morfológicas na membrana plasmática e no citoesqueleto, promovendo o aumento da expressão de proteína *GFAP*, caracterizando uma ativação glial chamada de glia reativa; esse padrão de alteração morfológica também foi observado em glioma murino (C6) por microscopia de contraste de fase (Takanaga *et al.*, 2004).

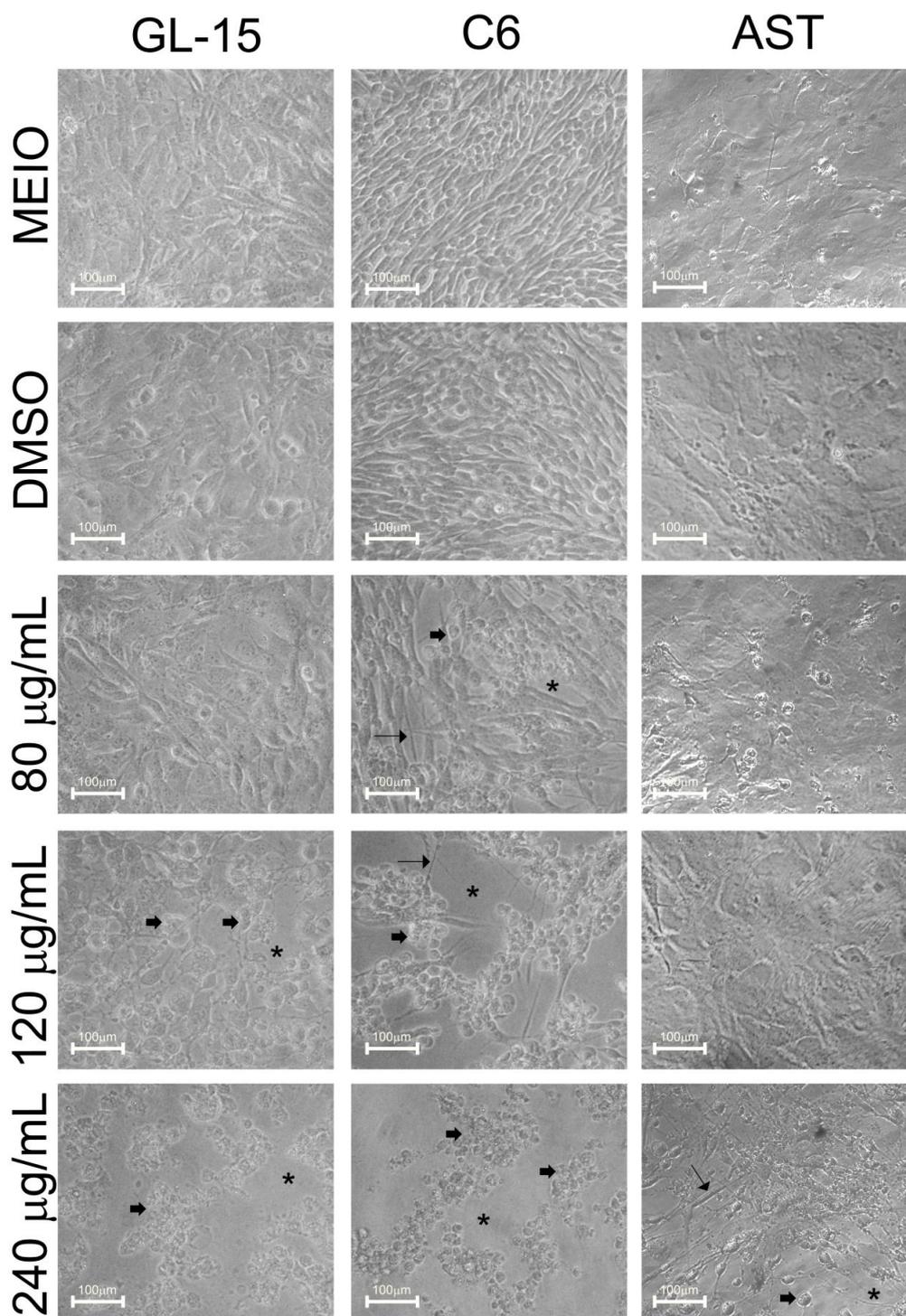


Figura 7: Efeito citotóxico sobre a morfologia celular após 48 horas de tratamento com extrato metanólico de *B. orellana*. Nos tratamentos das células neoplásicas (GL-15 e C6) observou-se um aumento dos espaços vazios entre as células, destacadas por asterisco, proporcional ao aumento das concentrações comparando-se com os controles de meio e DMSO; setas assinalam células arredondadas em GL-15, C6 e AST (Astrocitárias); flechas destacam alongamentos das extremidades em C6 e AST. Barra - 100 µm.

A capacidade de acumulação intracelular e fluorescência do extrato de *B. orellana* foi avaliada e comprovada, pela primeira vez, por microscopia de fluorescência em células neoplásicas de glioblastoma humano (GL-15) fixadas (Figura 8). Estes resultados corroboram com: Akinloye *et al.* (2010) que demonstraram a propriedade de substâncias presentes no extrato de *B. orellana* acumularem em fibras e organelas de células vegetais. Dias *et al.* (2011) utilizaram a capacidade de fluorescência entre 590 e 609 nm para determinar a quantidade de *cis*-bixina por fluorimetria após excitação do composto a 440 nm.

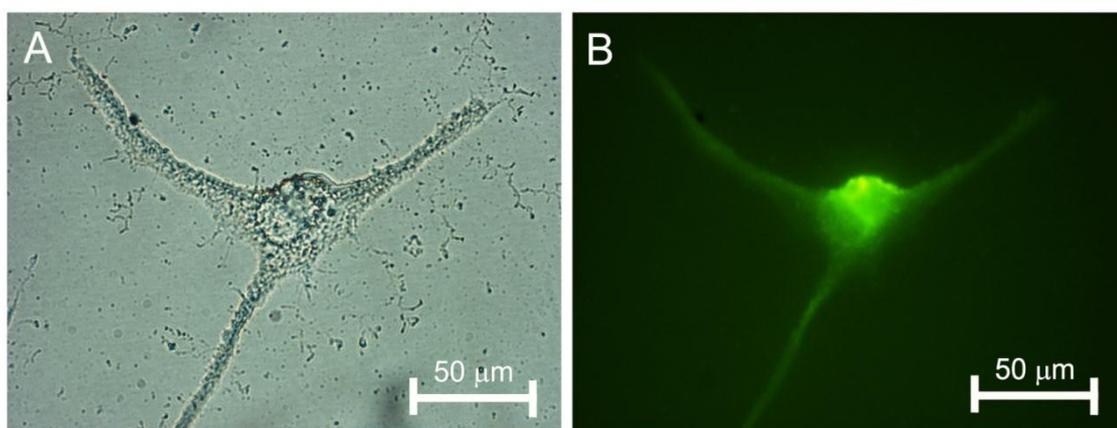


Figura 8: Fluorescência de GL-15 tratada com extrato metanólico de *B. orellana* a 200 µg/mL. A. Microscopia óptica. B. Mesmo campo observado por microscopia de fluorescência. Barra - 50 µm.

As plantas com compostos fenólicos possuem atividade antioxidantes e prooxidantes (Sakihama *et al.*, 2002). As substâncias presentes no extrato de *B. orellana* L. apresentaram propriedades antioxidantes (Chisté *et al.*, 2011b; Oboh *et al.*, 2011; Júnior *et al.*, 2005) e pró-oxidantes (Tibodeau, Isham & Bible, 2010). Os extratos polares e apolares protegeram o cérebro e o fígado do estresse oxidativo induzido pela ciclofosfamida, (Oboh, *et al.*, 2011); sugerindo que esses extratos possuem substâncias antioxidantes que podem auxiliar na diminuição de estresse oxidativo causado pelo tratamento com ciclofosfamida - um quimioterápico utilizado para tratamento de leucemia aguda e crônica, mieloma múltiplo, artrite reumatóide e transplante de medula óssea (Senthilkumar *et al.*, 2006). Mas, a *cis*-bixina induziu estresse oxidativo e morte celular de células neoplásicas, indicando um efeito pró-oxidante desta substância (Tibodeau, Isham & Bible, 2010).

A hipótese do efeito de morte celular induzida pelo extrato ser por depleção de glutathione foi investigada nas células neoplásicas, o que indicaria um possível mecanismo de toxicidade induzida pelo extrato. Mas, esta hipótese foi negada, pois após 24 horas de tratamento com o extrato metanólico de *B. orellana* na concentração de 200 µg/mL, concentração próxima da EC₅₀ determinada para GL-15 (Figura 4A), as células neoplásicas GL-15 (Figura 9C) e C6 (Figura 9F) apresentaram capacidade de fluorescência iguais aos controles negativos (Figuras 9A e 9D) e diferentes do controle positivo, tratado com butionina-sulfoxamina (BSO), que sabidamente causa depleção de glutathione (Figura 9B e 9E). Estes resultados indicam que o efeito citotóxico observado em células neoplásicas não é decorrente da depleção de glutathione, e corroboram com os dados já existentes na literatura: *cis*-bixina não depletou glutathione reduzido em células neoplásicas de pulmão (Tibodeau, Isham & Bible, 2010); o pré-tratamento de bixina, em ratos adultos, diminuiu a peroxidação lipídica e a depleção de glutathione renal, induzida pelo quimioterápico cisplatina (Silva, Antunes & Bianchi, 2001).

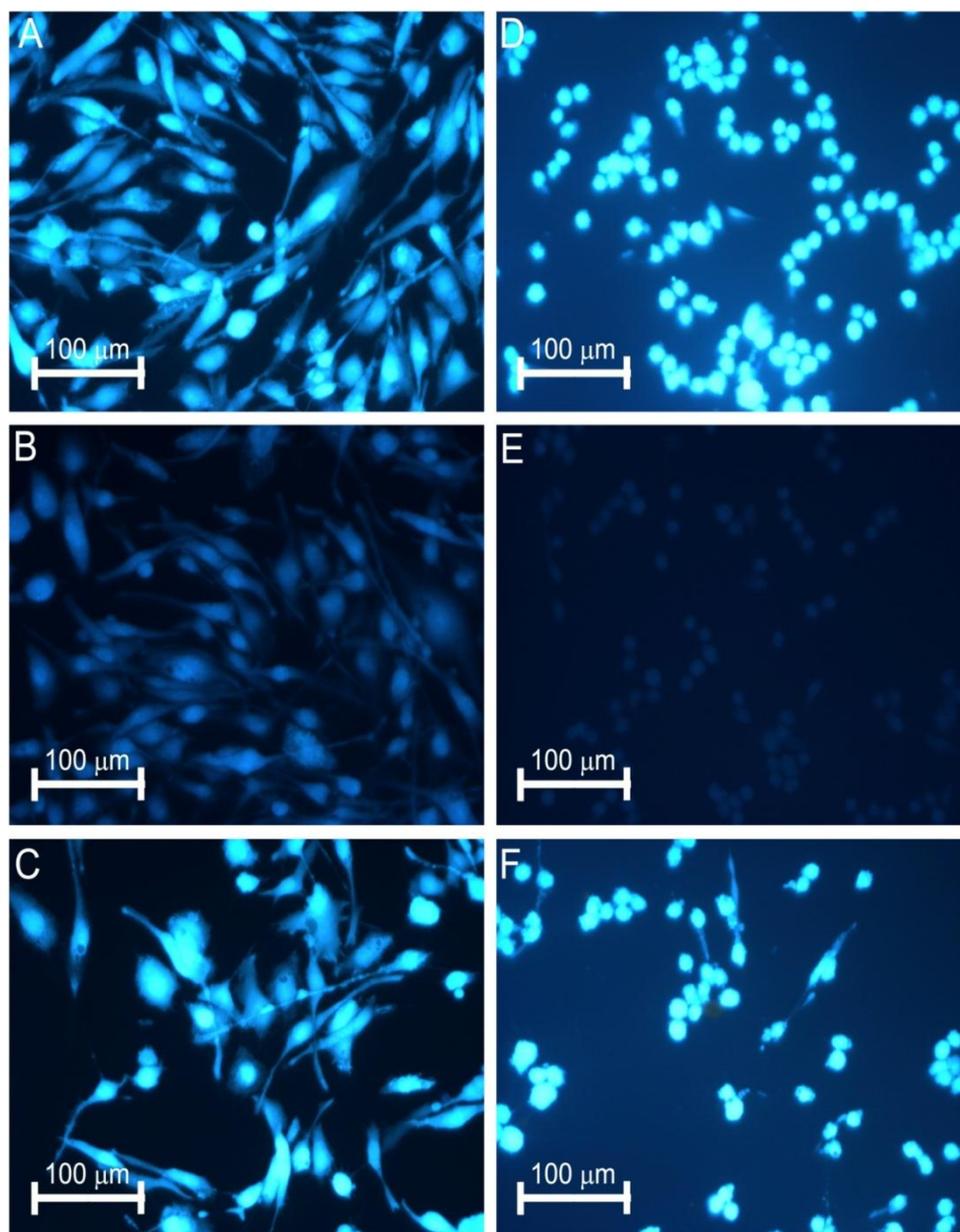
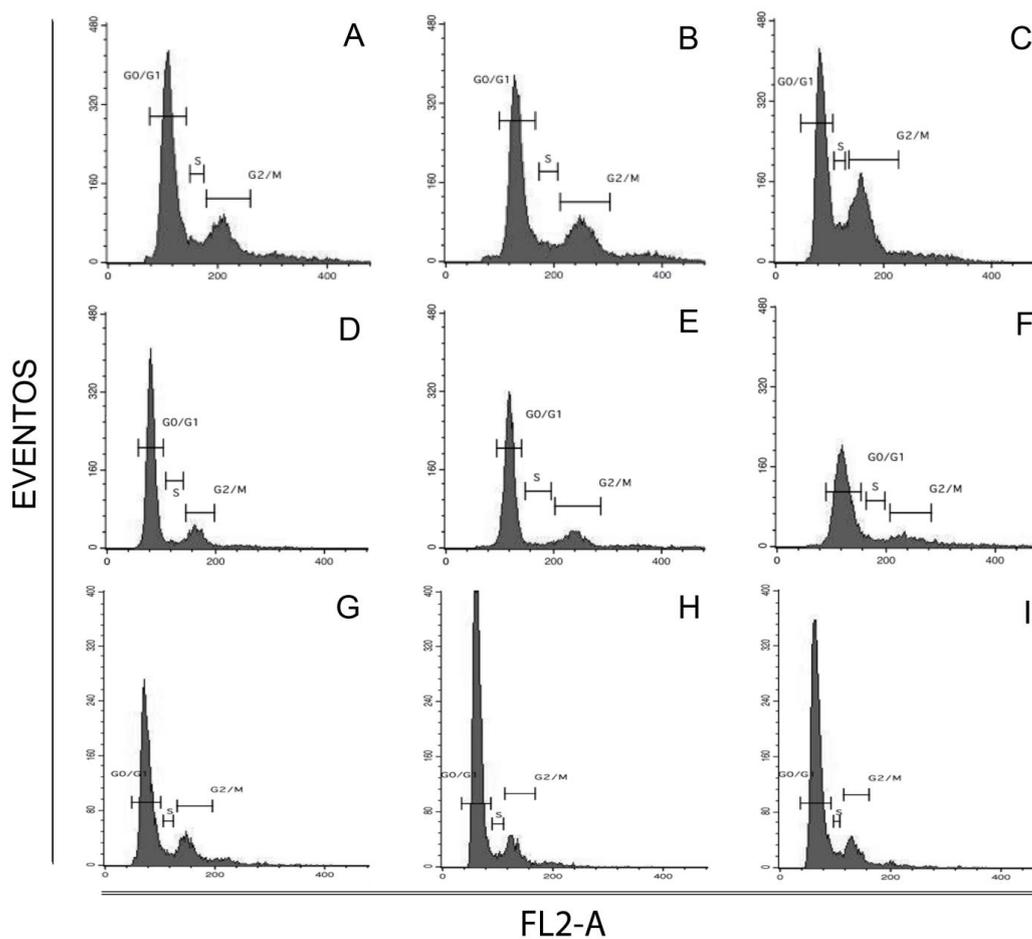


Figura 9: Investigação da depleção de GSH em células neoplásicas (GL-15 e C6) após 24 horas de tratamento. A. Controle negativo – células GL-15 tratadas com DMSO a 0,5%. B. Controle positivo - células GL-15 tratadas com BSO a 1 mM. C. Células GL-15 tratadas com extrato metanólico de *B. orellana* (200 μg/mL) por 24 horas. D. Controle negativo - células C6 tratadas com DMSO a 0,5%. E. Controle positivo - células C6 tratadas com BSO a 1 mM. F. Células C6 tratadas com extrato metanólico de *B. orellana* (200 μg/mL) por 24 horas.

Investigou-se a capacidade do efeito citotóxico do extrato metanólico interferir no ciclo celular. Mas, as alterações nas fases do ciclo celular observadas não apresentaram diferença estatística em relação aos controles tratados apenas com meio ou DMSO (Figura 10). King Jr. & Khalili (2001) informaram que os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento de meduloblastoma e glioblastoma não estavam totalmente compreendidos, e acreditava-se que a proliferação celular destes tumores deveriam estar relacionadas com alguma desordem nas fases do ciclo celular. O controle do ciclo celular de glioblastoma e neuroblastoma são realizados através da interação de uma série de eventos regulatórios envolvendo pares das ciclinas e quinases dependentes de ciclina, proteínas supressoras de tumores, e fatores de transcrição que orquestram e coordenam a expressão de genes envolvidos na fase S (Kohn, Jackman & O'Connor, 1994 apud King Jr. & Khalili, 2001). King Jr. & Khalili (2001) demonstraram um provável efeito antiproliferativo do *flurbiprofen*, através da modulação da expressão de ciclinas e/ou proteínas supressoras tumorais, especialmente uma interação da enzima ciclooxigenase (COX2) com a proteína p53, parando o ciclo celular na fase S (autorreplicação do DNA) e diminuindo a fase G2/M (fase de duplicação nuclear e divisão citoplasmática), indicando um novo papel da COX2 de controlar a proliferação celular via proteína p53. A bixina não apresentou um bom potencial inibidor da enzima COX (Reddy, Lindo-Alexandre & Nair, 2005), sugerindo que a bixina não utiliza esta via de controle de proliferação celular.



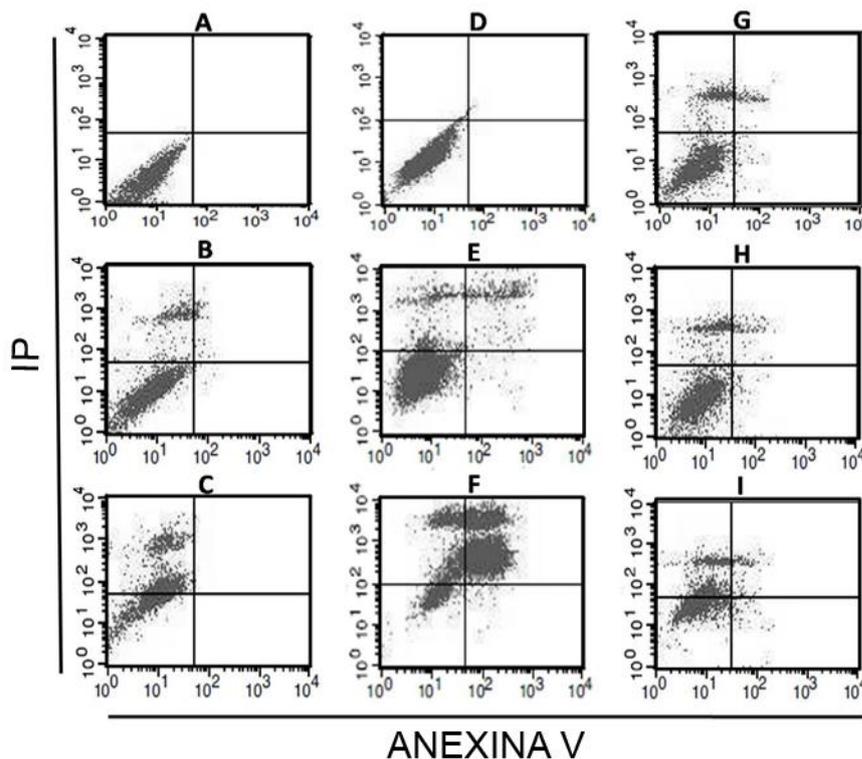
Mediana dos experimentos (%)

Fase do ciclo celular	GL-15			C6			AST		
	MEIO	DMSO	EXT.	MEIO	DMSO	EXT.	MEIO	DMSO	EXT.
G0/G1	69,47	77,57	70,29	76,41	65,05	67,66	70,28	73,31	74,74
S	4,74	3,23	5,06	3,90	5,18	4,84	6,45	4,26	6,03
G2	18,75	12,44	14,69	14,46	18,89	17,72	17,06	15,30	13,28

Figura 10: Investigação de alterações no ciclo celular induzidas pelo extrato metanólico de *B. orellana* (80 µg/mL) após 48 horas de tratamento em células do SNC. A, B, C, células GL-15. (A) Controle não tratado. (B) Controle tratado com DMSO a 0,5%. C. Tratamento com extrato. D, E, F, células C6. (D) Controle não tratado. (E) Controle tratado com DMSO a 0,5%. F. Tratamento com extrato. G, H, I, células astrocíticas (AST). (G) Controle não tratado. (H) Controle tratado com DMSO a 0,5%. (I) Tratamento com extrato.

Neste trabalho, o extrato metanólico apresentou percentuais expressivos de morte celular: em GL-15 morte por necrose com 57,45% (Figura 11C) e em C6, morte por apoptose tardia (77,10%) e necrose (14,26%), (Figura 11F). Esse tipo de morte poderia ser induzido pela capacidade de substâncias lipofílicas (*cis*-bixina) promoverem ruptura de membrana celular (Tibodeau, Isham & Bible, 2010), provável substância presente no extrato que demonstrou picos de absorção de luz visível em 363 nm (Figura 3). O pequeno percentual de morte celular por necrose, observado no controle do veículo de diluição da droga (DMSO a 0,5%) (Figuras 11B, 11E e 11H) poderia ser explicado pela capacidade do DMSO em induzir aumento de GLUT4 superficial e diminuir a capacidade de transportar glicose (Berenguer *et al.*, 2011), sugerindo que a interação do DMSO com o extrato poderia causar alteração sobre a membrana plasmática capaz de diminuir a captação de glicose para o meio intracelular como provável causa de morte. A bixina é um composto receptor ativador e proliferador de peroxissomo (PPAR) que pode regular o metabolismo lipídico e diferenciação de preadipócitos 3T3-L1, sugere-se que bixina e norbixina podem gerenciar síndrome metabólica associada a disfunções do metabolismo da glicose (Takahashi *et al.*, 2009).

O conjunto de dados apresentados indicam que o extrato metanólico foi menos citotóxico para as células normais (Astrócitos) e mais citotóxico para as células neoplásicas de glioma (C6 e GL-15), sugerindo um potencial antitumoral e possíveis aplicações clínicas das substâncias presentes no extrato. Os quimioterápicos existentes para tratamento de glioblastoma multiforme humano, especialmente temozolamida, promovem muitos efeitos colaterais e não aumentam significativamente a expectativa de sobrevivência destes pacientes (Stupp *et al.*, 2010), justificando a necessidade de mais estudos de triagem de substâncias com potencial antitumoral.



Mediana dos experimentos (%)									
QUAD.	GL-15			C6			AST		
	MEIO	DMSO	EXT.	MEIO	DMSO	EXT.	MEIO	DMSO	EXT.
SE	0,00	9,84	57,45	0,13	4,63	14,26	13,19	15,90	26,96
SD	0,05	0,56	00,49	0,04	13,18	77,10	4,07	4,57	1,36
IE	99,90	88,50	42,40	99,81	91,95	10,95	80,12	79,30	71,40
ID	0,05	0,24	0,00	0,02	0,26	0,37	1,65	1,80	0,61

Figura 11: Investigação por citometria de fluxo do tipo de morte induzida pelo extrato metanólico de *B. orellana* (80 µg/mL) após 48 horas de tratamento em células do SNC. A, B, C, células GL-15. (A) Controle não tratado. (B) Controle tratado com DMSO a 0,5%. C. Tratamento com extrato. D, E, F, células C6. (D) Controle não tratado. (E) Controle tratado com DMSO a 0,5%. F. Tratamento com extrato. G, H, I, células astrocíticas (AST). (G) Controle não tratado. (H) Controle tratado com DMSO a 0,5%. (I) Tratamento com extrato. (ID) Quadrante inferior direito, células marcadas com Anexina V. (IE) Quadrante inferior esquerdo, células não marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio. (SE) Quadrante superior esquerdo, células marcadas com Iodeto de Propídio. (SD) Quadrante superior direito, células marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídio.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esse trabalho investigou a citotoxicidade induzida pelo extrato metanólico de *B. orellana* e buscou compreender os efeitos desta citotoxicidade. Os resultados permitem concluir que:

1 – O extrato estudado apresentou teores de bixina e compostos fenólicos com picos de absorção espectrofotométrica para *cis*-bixina, próximos dos valores descritos na literatura.

2 – O extrato estudado apresentou citotoxicidade do tipo dose-dependente nas linhagens de células neoplásicas – GL-15 e C6, não apresentando citotoxicidade, na mesma proporção, para células normais (astrócitos) .

3 – O extrato estudado apresentou capacidade de acumulação intracelular em células neoplásicas de glioblastoma humano, investigado por microscopia de fluorescência, ainda não descrito na literatura.

4 – A análise morfológica demonstrou aumento de espaços vazios entre as células e aparente diminuição da viabilidade celular, proporcional ao aumento das concentrações usadas; sugerindo um efeito citotóxico dose-dependente.

5 – A morte celular induzida pelo extrato provavelmente não está relacionada com depleção de glutatión.

6 – O extrato não induziu alterações nas fases do ciclo celular.

7 – O extrato induziu morte por necrose de células da linhagem GL-15, e apoptose tardia e necrose em (C6), sem demonstrar morte para astrócitos nas mesmas proporções.

O conjunto de conclusões acima listado indicaram - um maior efeito citotóxico e capacidade de induzir morte em células neoplásicas, comparando-se com o controle de células normais. Mais estudos são necessários para investigar os mecanismos de citotoxicidade das substâncias presentes no extrato metanólico estudado, e suas possíveis aplicações nas próximas fases de estudo clínico. Alguns trabalhos utilizando substâncias presentes nas sementes ou folhas de *B. orellana* já foram realizados em humanos, sem causar efeitos colaterais (Arcanjo *et al.*, 2010; Zegarra *et al.*, 2007). Outros trabalhos para investigar o potencial antitumoral do extrato metanólico de *B. orellana* estão previstos: investigação das alterações morfológicas na membrana citoplasmática (por microscopia eletrônica, em andamento), isolamento das substâncias e testes das mesmas *in vitro* e *in vivo*, e investigação das vias de sinalização ativadas na indução de morte celular.

7. REFERÊNCIAS

Agner, A.R., Barbisan, L.F., Scolastici, C., Salvadori, D.M.F. **Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the liver medium-term assay.** Food and Chemical Toxicology, 42, 1687-1693, 2004.

Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., López, R.C., Gómez-Gómez, L. **The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors.** Journal of Experimental Botany, 61, 105-119, 2010.

Akinloye, A.J., Illoh, H.C., Olagoke, A.O. **Screening of some indigenous herbal dyes for use in plant histological staining.** Journal of Forestry Research, 21, 81-84, 2010.

Alberts, B., Johnson, A. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. **Biologia molecular da célula.** 4ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2004.

Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A. **Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies.** Journal of Ethnopharmacology, 133, 945 - 972, 2011.

Anderson, J.C., McFarland, B., Gladson, L. **New Molecular Targets in the Angiogenic Vessels of Glioblastoma Tumors.** Expert Reviews in Molecular Medicine, 10, doi:10.1017/S1462399408000768, 2009.

Antunes, L.M.G., Pascoal, L.M., Bianchi M. L. P., Dias, F. L. **Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures.** Mutation Research, 585, 113–119, 2005.

Amaya, R.D.B. **Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review.** Journal of Food Composition and Analysis, 23, 726-740, 2010.

Arcanjo, A.P.N., Amancio, O.M.S., Braga, J.A.P. Pinto, V.P.T. **Randomized controlled trial of iron-fortified drinking water in preschool children.** Journal of the American College of Nutrition, 29, 122-29, 2010.

Bardi, M.A.G., Gutiérrez-Oppe, E., Politano, R. **Traditional knowledge products in Latin America and their misappropriation.** Journal of Intellectual Property Law & Practice, 6, 34-42, 2011.

Berenguer, M., Zhang, J., Bruce, M.C., Martinez, L., Gonzalez, T., Gurtovenko, A.A., Xuc, T., Marchand-Brustel, Y.L., Govers, R. **Dimethyl sulfoxide enhances GLUT4 translocation through a reduction in GLUT4 endocytosis in insulin-stimulated 3T3-L1 adipocytes.** Biochimie, 30, 1 - 13, 2011.

Bocchini, V., Beccari, T., Arcuri, C., Bruyere, L., Fages, C., Tardy, M. **Glial fibrillary acidic protein and its encoding mRNA exhibit mosaic expression in a glioblastoma multiform cell line of clonal origin.** International Journal of Developmental Neuroscience 11, 485-492, 1993.

Bouvier, F., Dogbo, O., Camara, B. **Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto).** Science, 300, 2089-2091, 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS [on line], Informações em Saúde: Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM. Mortalidade-Brasil: óbitos p/ ocorrência segundo causa - CID-BR-10, 047 Neopl malig mening,encéf e out partes SNC 2008. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 28 de janeiro de 2011.

Cardarelli, C.R., Benassi, M.T., Mercadante, A.Z. **Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties.** Food Science and Technology, 41, 1689-1693, 2008.

Cartaxo, S.L., Souza, M.M.A., de Albuquerque, U.P. **Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, 131, 326-342, 2010.

Cavalieri, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., de Prati, A.C., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L.V., Lauro, G.M., Ciampa, A.R., Suzuki, H., 2004. **α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells.** Biochemical and Biophysical Research Communications 315, 589-594.

Castro, W.F., Mariutti, L.R.B., Bragagnolo, N. **The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage.** Food Chemistry, 124, 126-131, 2011.

Cavalieri, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., de Prati, A.C., Gottardo, R., Leone, S., Berra, L.V., Lauro, G.M., Ciampa, A.R., Suzuki, H. **α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly, induces a apoptosis in glioma cells.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 315, 589-594, 2004.

Chábera, P., Fuciman, M., Naqvi, K.R., Polívka, T. **Ultrafast dynamics of hydrophilic carbonyl carotenoids – Relation between structure and excited-state properties in polar solvents.** Chemical Physics, 373, 56-64, 2010.

Chen, D., Landis-Piwowar, K. R., Chen, M. S., Dou, Q. P. **Inhibition of proteasome activity by the dietary flavonoid apigenin is associated with growth inhibition in cultured breast cancer cells and xenografts.** Breast Cancer Research, 9, doi:10.1186/bcr1797, 2007.

Chisté, R.C., Yamashita, F., Gozzo, F.C., Mercadante, A.Z. **Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds.** Journal of Chromatography A 1218, 57-63, 2011a.

Chisté, R. C., Mercadante, A. Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F.C., Bragagnolo, N. **In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species.** Food Chemistry, 127, 419 – 426, 2011b.

de Oliveira, V.E., Castro, H.V., Edwards, H.G.M., de Oliveira, L.F.C. **Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis.** Journal of Raman Spectroscopy, 41, 642-50, 2010.

Dias, V.M., Pilla, V., Alves, L.P., Oliveira, H.P.M., Munin, E. **Optical characterization in Annatto and commercial colorific.** Journal of Fluorescence 21, 415-421, 2011.

Dutheil, F., Dauchy, S., Diry, M., Sazdovitch, V., Cloarec, O., Mellotée, L., Bièche, I., Ingelman-Sundberg, M., Flinois, J.P., de Waziers, I., Beaune, P., Declèves, X., Duyckaerts, C., Lorient, M.-A. **Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function.** Drug Metabolism and Disposition, 37, 1528-1538, 2009.

El-Bachá, R.S., de Lima Filho, J.L., Guedes, R.C.A. **Dietary antioxidant deficiency facilitates spreading cortical depression induced by photoactivated riboflavin.** Nutritional Neuroscience, 1, 205-212, 1998.

Falk, J., Munné-Bosch, S. **Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond.** Journal of Experimental Botany, 61, 1549-1566, 2010.

Faria, M.H.G., Patrocínio, R.M.S.V., Rabenhorst, S.H.B. **Astrocitomas: uma revisão abrangente.** Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia, 25, 23-33, 2006.

Felicíssimo, M.P., Bittencourt, C., Houssiau, L., Pireaux, J.J. **Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy analyses of *Bixa orellana* seeds.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, 52, 1810-1804, 2004.

Fonseca, C.O., Santos, T.O., Fernandes, J., Carvalho, M.G.C., Gatass, C.R. **Biologia molecular dos glioblastomas: perspectivas terapêuticas do monoterpeno álcool perílico.** *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, 14, 46-54, 2003.

Garen, E.J., Saltonstall, K., Ashton, M.S., Slusser, J.L., Mathias, S., Hall, J.S., 2011. **The tree planting and protecting culture of cattle ranchers and small-scale agriculturalists in rural Panama: Opportunities for reforestation and land restoration.** *Forest Ecology and Management* 261, 1684-1695.

Gerhardt, D., Horn, A.P., Gaelzer, M.M., Frozza, R.L., Delgado-Cañedo A., Pelegrini, A.L., Henriques, A.T., Lenz, G., Salbego, C. **Boldine: a potencial new antiproliferative drug against glioma cell lines.** *Investigational New Drugs*, 27, 517 - 525, 2009.

Gómez-Ortíz, N.M., Vázquez-Maldonado, I.A., Pérez-Espadas, A.R., Mena-Rejón, G.J., Azamar-Barrios, J.A., Oskam, G. **Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds.** *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 94, 40-44, 2010.

Hagiwara, A., Imai, N., Doi, Y., Nabaie, K., Hirota, T., Yoshino, H., Kawabe, M., Tsushima, Y., Aoki, H., Yasuhara, K., Koda, T., Nakamura, M., Shirai, T. **Absence of liver tumor promoting effects of annatto extract (norbixin), a natural carotenoid food color, in a medium-term liver carcinogenesis bioassay using male F344 rats.** *Cancer Letters*, 199, 09-17, 2003.

Hand, C.M., Vender, J.R., Black, P. **Chemotherapy in experimental brain tumor, part 1: In vitro colorimetric MTT assay.** *Journal of Neuro-Oncology*, 36, 1-6, 1988.

He, X., Liu, R.H. **Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 9905–9910, 2008.

Jaganathan, S.K., Mandal, M. **Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review.** Journal of Biomedicine and Biotechnology, doi:10.1155/2009/830616, 2009.

Júnior, A.C.T.S. Asad, L.M.B.O., de Oliveira, E. B., Kovary, K., Asad, N. R., Felzenszwalb, I. **Antigenotoxic and antimutagenic potential of and annatto pigment (norbixin) against oxidative stress.** Genetics and Molecular Research, 4, 94 - 99, 2005.

King Jr., J.G., Khalili, K. **Inhibition of human brain tumor cell growth by the anti-inflammatory drug, flurbiprofen.** Oncogene, 20, 6864 – 6870, 2001.

Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C. and Cavenee, W.K. **The WHO classification of tumors of the nervous system.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 61, 215 – 225, 2002.

Kohn, K.W., Jackman, J., O'Connor, P.M. **Cell cycle control and cancer chemotherapy.** Journal of Cellular Biochemistry, 54, 440 – 452, 1994.

Kuete, V., Mbaveng, A.T., Tsaffack, M., Beng, V.P., Etoa, F.-X., Nkengfack, A.E., Meyer, J.J.M., Lall, N. **Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama engleriana* (Melianthaceae).** Journal of Ethnopharmacology, 115, 494-501, 2008.

Lent, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência.** 2ª ed., Rio de Janeiro: Ateneu, 2010.

Lomonte, B., León, G., Angulo, Y., Rucavado, A., Núñez, V. **Corrigendum to “Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products**

and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment” published in *Toxicon*, 54,(7), (2009), 1012-1028. *Toxicon*, 55, 1412-1413, 2010.

Lomonte, B, León, G, Angulo, Y, Rucavado, A, Núñez, V. **Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment.** *Toxicon*, 54, 1012-1028, 2009.

López, S., Sierra, R. **A resource demand model of indigenous production: the Jivaroan cultivation systems of Western Amazonia.** *Agricultural Systems*, 104, 246 - 257, 2011.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P. **The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system.** *Acta Neuropathologica*, 114, 97-109, 2007.

MacVicar, B.A. **Voltage-dependent calcium channels in glial cells.** *Science*, 226, 1345-1347, 1984.

Magassouba, F.B., Diallo, A., Kouyaté, M., Mara, F., Mara, O., Bangoura, O., Camara, A., Traoré, S., Diallo, A.K., Zaoro, M., Lamah, K., Diallo, S., Camara, G., Traoré, S., Kéita, A., Camara, M.K., Barry, R., Kéita, S., Oularé, K., Barry, M.S. Donzo, M., Camara, K., Toté, K., Berghe, D.V., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Baldé, A.M. **Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine.** *Journal of Ethnopharmacology*, 114, 44-53, 2007.

Marston, A., 2011. **Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry.** *Journal of Chromatography A* 1218, 2676-2683.

Mazzio, E. A., Soliman, K. F. A. **In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs.** *Phytoterapy Research*, 23, 385–398, 2009.

Nakada, M., Nakada, S., Demutha, T., Tran, N.L., Hoelzinger, D.B. Berensa, M.E. **Molecular targets of glioma invasion.** Cellular and Molecular Life Sciences, 64, 458 – 478, 2007.

Natsume, A., Kinjo, S., Yuki, K., Kato, T., Ohno, M., Motomura, K., Iwami, K., Wakabayashi, T. **Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy.** Brain Tumor Pathology, 28, 1-12, 2011.

Natsume, A., Yoshida, J. **Gene therapy for high-grade glioma.** Cell Adhesion & Migration, 2, 186-191, 2008.

Nesbitt, M., McBurney, R., Broin, M., Beentje, H. **Linking biodiversity, food and nutrition: The importance of plant identification and nomenclature.** Journal of Food Composition and Analysis, 23, 486-498, 2010.

Oboh, G., Akomolafe, T.L., Adefegha, A.S., Adetuyi, A.O. **Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of Annatto (*Bixa orellana*) seeds.** Experimental Toxicology and Pathology, 63, 257 - 262, 2011.

Oliveira, M.S., Cechim, G., Braganhol, E., Santos, D.G., Meurer, L., de Castro Jr., C.G., Brunetto, A.L., Schwarstmann, G., Battastini, A.M., Lenz, G., Roester, R. **Antiproliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC – 3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models.** Journal of Neuro-oncology, 93, 191-201, 2009.

Pan, M.H. & Ho, C.T. **Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development.** Chemical Society Reviews, 37, 2558–2574, 2008.

Pontes, S.P. 1981. **Noções da gramática Tupi.** Belo Horizonte, Brazil: Imprensa Oficial, 138 p.

Prasanna, P., Thibault, A., Liu, L., Samid, D. **Lipid metabolism as a target for brain cancer therapy: Synergistic activity of lovastatin and sodium phenylacetate against human glioma cells.** *Journal Neurochemistry*, 66, 710–716, 1996.

Pehar, M., Martinez-Palma, L., Peluffo, H., Kamaid, A., Cassina, P., Barbeito, L. **Peroxynitrite-induced cytotoxicity in cultured astrocytes is associated with morphological changes and increased nitrotyrosine immunoreactivity.** *Neurotoxicity Research*, 4, 87-93, 2002.

Ramamoorthy, S., Doss, F.B., Kundu, K., Satyanarayana, V.S.V., Kumar, V. **Molecular characterization of bixin—An important industrial product.** *Industrial Crops and Products*, 32, 48-53, 2010.

Reddy, M. K., Lindo-Alexandre, R. L., Nair, M. G. **Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural.** *Food Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 9268 - 9273, 2005.

Rodríguez-Ávila, N.L., Narváez-Zapata, J.A., Aguilar-Espinosa, M., Rivera-Madrid, R. **Regulation of pigment-related genes during flower and fruit development of *Bixa orellana*.** *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 43-50, 2011.

Rojas, J.J., Ochoa, V.J., Ocampo, S.A., Muñoz, J.F. **Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections.** *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, doi:10.1186/1472-6882-6-2, 2006.

Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H. **Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants.** *Toxicology*, 177, 67–80, 2002.

Satyanarayana, A., Rao, P.P., Rao, D.G. **Influence of source and quality on the color characteristics of annatto dyes and formulations.** LWT – Food Science and Technology, 43, 1456 - 1460, 2010.

Scotter, M. **The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review.** Food Additives and Contaminants 26, 8,1123–1145, 2009.

Scotter, M.J., Castle, L., Honeybone, C.A., Nelson, C. **Method development and analysis of retail foods for annatto food colouring material.** Food Additives and Contaminants, 19, 205-522, 2002.

Schmitt-Schillig, S. , Schaffer, S., Weber, C.C., Eckert, G.P., Müller, W.E. **Flavanoids and the aging brain.** Journal of Physiology and Pharmacology, 56, 23-36, 2005.

Senft, C., Polacin, M., Priester, M., Seifert, V., Kögel, D., Weissenberger, J. **The nontoxic natural compound curcumin exerts anti-proliferative, anti-migratory, and anti-invasive properties against malignant gliomas.** BioMed Central Cancer,10, doi:10.1186/1471-2407-10-491, 2010.

Senthilkumar, S., Yogerta, S.K., Subashini, R., Deraki, T. **Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats.** Chemico-Biological Interactions ,160, 252–260, 2006.

Skaper, S.D., Seegmiller, J.E. **Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase mutant glioma cells: diminished monoamine oxidase activity.** Science 194, 1171-1173, 1976.

Silva, C. R., Antunes, L. M. G., & Bianchi, M. L. P. **Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats.** Pharmacological Research, 43, 561–566, 2001.

Simons, K., Toomre, D. **Lipid rafts and signal transduction.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, 1, 31–39, 2000.

Singleton, V.L., Orthofer, R, Lamuela-Raventós, R.M. **Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Follin-Ciocalteu reagent.** Methods in Enzymology, 299, 152-178, 1999.

Soares, V.L.F., Rodrigues, S.M., de Oliveira, T.M., de Queiroz, T.O., Lima, L.S., Hora-Júnior, B.T., Gramacho, K.P., Micheli, F., Cascardo, J.C.M., Otoni, W.C., Gesteira, A.S., Costa, M.G.C. **Unraveling new genes associated with seed development and metabolism in *Bixa orellana* L. by expressed sequence tag (EST) analysis.** Molecular Biology Reports, 38, 1329-1340, 2011.

Souza, A.A., da Silva, G.S.S., Velez, B.S., Santoro, A.B.M., Montero-Lomelí, M. **Glycogen synthesis in brain and astrocytes is inhibited by chronic lithium treatment.** Neuroscience Letters, 482, 128-132, 2010.

Stupp, R., Tonn, J.C., Brada, M., Pentheroudakis, G. **High-grade malignant glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** Annals of Oncology, 21 (Supplement 5), 190–193, 2010.

Tabatabai, G., Weller, M. **Glioblastoma stem cells.** Cell Tissue Research, 343, 459-465, 2011.

Takanaga, H., Yoshitake, T., Hara, S., Yamasaki, C., Kunimoto, M. **cAMP-induced astrocytic differentiation of C6 glioma cells is mediated by autocrine interleukin-6.** Journal of Biological Chemistry, 279, 15441 – 15447, 2004.

Takahashi, N., Goto, T., Taimatsu, A., Egawa, K., Katoh, S., Kusudo, T., Sakamoto, T., Ohyan, C., Lee, J., Kim, Y., Uemura, T., Hirai, S., Kawada, T. **Bixin regulates mRNA expression involved in lipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR α activation.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 390, 1372–1376, 2009.

Tibodeau, J.D., Isham, C.R., Bible, K.C. **Annatto constituent *cis*-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase.** *Antioxidants & Redox Signaling*, 13, 987-997, 2010.

Vallabhaneni, R., Bradbury, L.M.T., Wurtzel, E.T. **The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504, 104-111, 2010.

Van de Bent, M.J. **Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective.** *Acta Neuropathologica*, 120, 297-304, 2010.

Van Gijn, R., Hirtzel, V., Gipper, S. **Updating and loss of color terminology in Yurakaré: An interdisciplinary point of view.** *Language & Communication* 30: 240-64, 2010.

Vandebroek, I., Balick, M.J., Ososki, A., Kronenberg, F., Yukes, J., Wade, C., Jiménez, F., Peguero, B., Castillo, D. **The importance of botellas and other plant mixtures in Dominican traditional medicine.** *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 20-41, 2010.

Verkhatsky, A., Parpura, V., Rodríguez, J.J. **Where the thoughts dwell: The physiology of neuronal–glial “diffuse neural net”.** *Brain Research Reviews*, 66, 133-151, 2011.

Verkhatsky, A.N and Butt, A. **Glial neurobiology: a textbook.** West Sussex PO198SQ, England. 2007.

Wen, P.Y., Kesari, S. **Malignant gliomas in adults.** *The New England Journal of Medicine*, 359, 17:492-507, 2008.

Wright, L.E., Valdés, J.E., Burton, J.H., Price, T.D., Schwarcz, H.P. **The children of Kaminaljuyu: Isotopic insight into diet and long distance**

interaction in Mesoamerica. Journal of Anthropological Archaeology, 29, 155–178, 2010.

Wu, H., Jiang, H., Lu, D., Xiong, Y., Qu, C., Zhou, D., Mahmood, A., Chopp, M. **Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis.** Neurosurgery, 65, 1087–1097, 2009.

Yuliana, N.D., Iqbal, M., Jahangir, M., Wijaya, C.H., Korthout, H., Kottenhage, M., Kim, H.K., Verpoorte, R. **Screening of selected Asian spices for anti obesity-related bioactivities.** Food Chemistry, 126, 1724 - 1729, 2011.

Zanatta, C.F., Mitjans, M., Urgatondo, V., Rocha-Filho, P.A., Vinardell, M.P. **Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines.** Food and Chemistry Toxicology, 48, 70-75, 2010.

Zegarra, L. Vaisberg, A., Loza, C., Aguirre, R.L., Campos, M., Fernandez, I., Talla, O., Villegas, L. **Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Study of Bixa Orellana in Patients with Lower Urinary Tract Symptoms Associated To Benign Prostatic Hyperplasia.** International Brazilian Journal Urology, 33, 493-501, 2007.