

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Alice Hoffmann de Quadros

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO MESILATO DE DOXAZOSINA
NA LINHAGEM CELULAR DE GLIOMA DE RATO (C6), ATRAVÉS DA TÉCNICA
DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DA CITOCINESE CELULAR (CBMN)**

Porto Alegre
Janeiro de 2018

Alice Hoffmann de Quadros

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO MESILATO DE DOXAZOSINA
NA LINHAGEM CELULAR DE GLIOMA DE RATO (C6), ATRAVÉS DA TÉCNICA
DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DA CITOCINESE CELULAR (CBMN)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª Dr.^a Christianne Gazzana Salbego

Co-orientadora: Dr.^a Mariana Maier Gaelzer

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Dihl

Porto Alegre

Janeiro de 2018

*Dedico este trabalho ao meu pai,
com todo meu amor e saudade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente as instituições de fomento, Capes e CNPq pelo apoio financeiro ao longo da minha graduação, à UFRGS, em especial ao Depto. de Bioquímica, pela formação e conhecimento passado e à ULBRA, em especial ao laboratório TOXIGEN, por proporcionar a infra-estrutura na realização desse estudo.

À banca, Prof^a Dr^a Juliana da Silva e Dr. Fabrício Figueiró por aceitarem corrigir e avaliar meu trabalho.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Christianne Gazzana Salbego, por me proporcionar a experiência de fazer parte de seu grupo de pesquisa nos últimos 6 anos, onde aprendi a maior parte dos conhecimentos práticos laboratoriais que sei hoje.

Ao Prof. Dr. Rafael Rodrigues Dihl por aceitar a colaboração feita nesse trabalho e me proporcionar o aprendizado desta técnica.

Aos colegas ICs do laboratório TOXIGEN pela amizade e companheirismo ao longo do semestre. Saibam que fizeram a minha vida mais feliz durante a tensão da elaboração do TCC e que tenho muito carinho por todos!

Aos pós-graduandos, Raíne e Jonas, pela ajuda no esclarecimento de dúvidas sobre o teste SMART e estatística. À Patrícia, nossa querida técnica!

E em especial a duas pós-graduandas lindas que proporcionaram a realização desse trabalho.

Ana Paula muito obrigada por toda a ajuda e carinho durante esse semestre, por responder todas as minhas mil mensagens (inclusive aos fins de semana), por toda a paciência e disponibilidade. Te sou muito grata por tudo, saibas que gosto muito de ti e te desejo muito sucesso na vida!!

Mari, te agradeço por esses seis anos de trabalho e companheirismo. Tu és a melhor professora que eu já tive, me ensinou os prazeres e as dificuldades de tentar se fazer ciência no nosso país. Adorei trabalhar contigo, sou apaixonada pela pesquisa muito por tua influência e espero um dia poder fazer por um aluno de graduação o que tu fizeste por mim.

Te adoro muito, fico muito feliz a cada conquista tua, muito obrigada pela amizade!!!

E por fim agradeço à minha mãe e irmã, e aos meus amigos por todo o amor, carinho e paciência ao longo da minha graduação!!!

Muito obrigada a todos!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
I. INTRODUÇÃO.....	6
I.1. Ensaio de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN).....	6
I.1.1. Micronúcleos.....	7
I.1.2. Pontes Nucleoplasmáticas.....	7
I.1.3. Brotos Nucleares.....	7
I.2. Mesilato de doxazosina.....	7
I.3. Linhagem de glioma de rato (C6).....	11
II. JUSTIFICATIVA.....	12
III. OBJETIVOS.....	13
III.1. Objetivos gerais.....	13
III.2. Objetivos específicos.....	13
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
IV.1. Reagentes.....	14
IV.2. Cultura Celular.....	14
IV.3. Técnica de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN).....	14
IV.4. Análise Estatística.....	15
V. RESULTADOS.....	16
VI. DISCUSSÃO.....	20
VII. CONCLUSÃO.....	24
VIII. PERSPECTIVAS.....	25
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMO

O mesilato de doxazosina é utilizado na clínica para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e hiperplasia benigna de próstata (BPH). Porém, muitos estudos demonstram seu potencial antineoplásico, principalmente para tratamento de glioblastomas. O teste de CBMN (*Cytokinesis-block micronucleus*) é extensivamente utilizado na epidemiologia celular e citogenética para determinar a presença e a extensão de dano cromossômico. Este teste detecta agentes genotóxicos clastogênicos e aneugênicos através da análise de alterações gênicas como micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PN) e brotos nucleares (BrN). Considerando que poucos trabalhos relatam a capacidade genotóxica da doxazosina e visando suas novas aplicações terapêuticas, se torna importante que haja uma avaliação do seu potencial mutagênico. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o potencial citotóxico e mutagênico do mesilato de doxazosina, através da técnica de CBMN *in vitro*, na linhagem de glioma de rato (C6). Para isso as células foram submetidas ao tratamento com mesilato de doxazosina em concentrações de 3 μ M a 250 μ M em conjunto com citocalasina (2,5 μ l/mL), um bloqueador da citocinese celular, durante um período de 24 horas. Após isso, foi realizada a coleta das células em lâminas através do uso de citocentrífuga e posterior coloração. Essas lâminas foram analisadas em microscópio óptico, onde, pelo menos mil células por cultura foram analisadas quanto a presença de células mono, bi, tri e multinucleadas para análise do CBPI (*Cytokinesis-Block Proliferation Index*), e duas mil células por cultura foram analisadas quanto a frequência de MN, PN e BrN, para todas as concentrações. Na análise do CBPI encontramos resultados significativos para ambos os testes nas células tratadas com doxazosina nas concentrações acima de 50 μ M. Para análises de marcadores de instabilidade genômica, notamos uma significativa diminuição no número de micronúcleos das células tratadas com as concentrações de 3 μ M, 6 μ M e 12 μ M de doxazosina, se comparados às células do controle negativo. Sendo assim, concluímos que a doxazosina é capaz de induzir citostase de 50% em células C6 quando aplicada na concentrações de 100 μ M e 150 μ M quando analisadas pelo CBPI. Nas concentrações de mesilato de doxazosina testadas no presente estudo (3 μ M a 50 μ M) em célula de glioma de ratos (C6) pelo teste de CBMN, não há evidências significativas de que esse fármaco apresente potencial mutagênico.

I. INTRODUÇÃO:

A análise de genotoxicidade estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química, o DNA (ácido desoxirribonucléico), processo este classificado de mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético ao nível celular ou orgânico, identificado respectivamente como carcinogênese e teratogênese (Erdtmann, 2003, p.26).

A avaliação da frequência de micronúcleo (MNs) é extensivamente utilizada na epidemiologia celular e citogenética para determinar a presença e a extensão de dano cromossômico em populações humanas expostas a agentes genotóxicos, ou em perfis genéticos de suscetibilidade. Esse ensaio é aplicado também com sucesso na identificação de dietas e fatores genéticos com impacto significativo sobre a estabilidade genômica. O teste detecta agentes genotóxicos clastogênicos, que causam alterações na estrutura cromossômica e aneugênicos, que são interferentes da formação do fuso mitótico, os quais afetam a distribuição equitativa dos cromossomos na divisão celular (Maluf e Palazzo, 2011, p.180).

I.1. Ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular (CBMN):

Fenech e Morley em 1985 utilizaram citocalasina B (Cyt-B) para bloquear a citocinese celular e diferenciar as células que passaram por um ciclo de divisão. A Cyt-B é um inibidor da polimerização da proteína actina, a qual participa da formação do anel de microfilamentos que induzem a contração do citoplasma e a clivagem da célula-mãe em duas células-filhas. O ensaio ficou conhecido como técnica de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN, de *cytokinesis-block micronucleus*). A restrição da análise às células binucleadas previne interferências causadas por problemas na cinética da divisão celular, o que corresponde à maior variável do ensaio. Desta maneira apenas as células que passam por um ciclo de divisão (células binucleadas) são consideradas na análise de frequência de micronúcleos (Maluf e Palazzo, 2011, p.180).

É possível analisar através da técnica de CBMN, além de morte celular (necrose e apoptose), também a formação de anomalias nucleares, como: formação de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares.

I.1.1. Micronúcleos (MN): Formados a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que foram perdidos na anáfase, durante a divisão celular. Os MNs originados pela perda de cromossomos inteiros são primeiramente formados por falha no fuso acromático, no cinetócoro, e em outras partes do aparato mitótico, ou por dano às subestruturas cromossômicas, alterações na fisiologia celular e alterações mecânicas. Alguns MNs podem derivar de quebras de pontes nucleoplasmáticas durante a anáfase. A frequência de MNs é aumentada pela exposição a agentes clastogênicos e aneugênicos e em células que demonstram instabilidade genômica (Maluf e Palazzo, 2011, p.180).

I.1.2. Pontes Nucleoplasmáticas (PN): Ocorrem quando os centrômeros dos cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para pólos opostos da célula durante a anáfase. Uma das vantagens da análise de PNPs é a possibilidade de avaliar eventos de quebra/translocação sem a necessidade de utilizar marcadores de cinetócoro ou centrômero, permitindo uma visão mais completa do possível dano cromossômico. O valor de PNPs é positivamente correlacionado com a frequência de MNs, sendo que a relação PNP/MN confere uma importante ferramenta na distinção de efeitos tóxicos de diferentes agentes (Maluf e Palazzo, 2011, p.180).

I.1.3. Brotos Nucleares (BrN): São morfologicamente similares aos MNs, com a exceção da conexão nucleoplasmática que os liga ao núcleo. A formação de Buds foi primeiramente observada em culturas celulares com condições seletivas de crescimento, o que induz a amplificação gênica. Acredita-se que a amplificação gênica corresponda a um evento importante na resistência celular a drogas e na progressão tumoral (Maluf e Palazzo, 2011, p.180).

I.2. Mesilato de doxazosina

A Doxazosina [4 - (4-amino-6,7-dimetoxiquinazolina-2-il)-piperazina] 1-il - (2,3 diidro-1,4-benzodioxina-3-il) metanona é um derivado quinazolínico que compreende a classe terapêutica dos alfa-bloqueadores adrenérgicos (Kirby, 1995).

É utilizada na clínica como mesilato de doxazosina (Cardura®) para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e hiperplasia benigna de próstata (BPH) (Wykretowicz, 2008 *apud* Gaelzer et al. 2016).

Os estudos de Kirby em 1995 confirmam que a doxazosina produz uma redução clínica e estatisticamente significativa na pressão sanguínea de homens hipertensos e que também apresentam o quadro de BPH tendo apenas um pequeno efeito clínico e estatisticamente insignificante em pacientes normotensos.

Em 1999, Chon e colaboradores demonstraram em seus experimentos uma indução significativa de apoptose em células epiteliais e estromais de próstata de pacientes após tratamento com doxazosina. Enquanto que, a proliferação celular permaneceu a mesma após o bloqueio do tratamento, sem afetar a taxa de divisão celular.

A doxazosina também exerce efeitos pró-apoptóticos em células de adenoma pituitário; segundo estudos de Fernando et al. (2005), foi demonstrado que seus efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos não são dependentes da expressão do receptor alfa-1 adrenérgico, como é o caso da sua ação anti-hipertensiva, e que supostamente envolvem uma regulação negativa na via de sinalização do fator nuclear B (NFB). Isso foi comprovado através de um co-tratamento com doxazosina e com phenadoxibenzamina, um antagonista irreversível de receptores adrenérgicos, em células LT2 e T3 de tumores pituitários gonadotróficos que expressavam os receptores alfa-1 e beta-1 adrenérgicos, no qual se provou não anular os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos da doxazosina, mostrando que sua ação nesse tipo de célula não é mediada através desses tipos de receptores. Além disso, o tratamento com doxazosina induziu um aumento de enzimas relacionadas com a via apoptótica, como a caspase-3, em células de tumor pituitário de ratos e das linhagens LT2 e T3 de tumores gonadotróficos. Estes resultados indicam um potencial terapêutico da doxazosina no tratamento de tumores pituitários, não somente como inibidor do crescimento tumoral e indutor de regressão tumoral, mas também inibindo a secreção de hormônios corticotróficos pelas células tumorais.

Outro estudo, realizado em 2008 por Hui e colaboradores, mostrou que o tratamento com doxazosina inibe proliferação e induz apoptose em células de câncer de mama, tanto em células que expressam receptores de estrogênio (ER-positivas) promovendo maior crescimento, quanto em células que não apresentam essa característica (ER-negativas). Suas análises de ciclo celular mostraram um aumento de células nas fases G0-G1 que receberam

tratamento nas doses mais altas que 25 μ M, ao passo que resultou numa diminuição de 40-80% dose-dependente na população de células durante a fase S do ciclo celular. Em conjunto, análise da ação da doxazosina em células da linhagem MCF-7 revelaram uma diminuição da expressão da proteína pRB-fosforilada, demonstrando um potencial mecanismo pelo qual a doxazosina media a parada nas fases G0-G1 do ciclo celular. Em adição a isso, suas análises demonstraram um aumento na expressão de caspase-3 clivada, resultando em indução de apoptose mediados pela ação da doxazosina nas células de câncer de mama. Em contraste, não houve aumento significativo de apoptose na linhagem MCF12A de células epiteliais normais de mama, que foram tratadas com doxazosina.

Atualmente já está comprovada que sua ação anti-hipertensiva é devido à sua capacidade de se ligar a receptores alfa-1 adrenérgicos, mas segundo Hui et al. (2008), os mecanismos de suas ações antiproliferativas e pró-apoptóticas em células tumorais ainda não são bem compreendidos. Porém, uma de suas hipóteses é que a doxazosina tenha uma potencial interação com receptores EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), já que apresenta em sua estrutura química um anel quinazolinico, similar aos atuais inibidores de receptores tirosina-cinase. Onde, em seus experimentos apresentou resultados positivos na redução da fosforilação de EGFR e inibição de sinais de transdução causados por estímulo de EGF em células de câncer de mama. O gene que transcreve esse tipo de receptor está amplificado em 40-50% nos glioblastomas e usualmente resulta num elevado nível de expressão (Wechsler-Reya et al., 2001).

Por outro lado, sua interação com resíduos de tirosina-cinase podem induzir apoptose através da superexpressão do gene hERG (*the human Ether-à-go-go-Related Gene*) que codifica uma proteína conhecida como Kv11.1, a subunidade alfa de um canal de íons potássio. É o que mostra os estudos de Staudacher et al. (2014), onde a redução da proteína hERG, dependente da concentração, foi observada nas células expostas à doxazosina, induzindo apoptose celular da mesma forma que a desipramina, uma droga inibidora da proteína hERG.

Gaelzer e colaboradores em 2016, avaliando as características da doxazosina e sua ação em tumores do sistema nervoso, demonstraram que além de ser um promissor agente antitumoral em linhagens de células de glioblastoma humano (U138-MG) e glioma de rato (C6), a doxazosina apresenta também a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica devido à suas características físico-químicas e apresenta tempo de meia vida longo o que permite uma dosagem diária única, a qual representa uma vantagem terapêutica. Além disso, tem a

capacidade de induzir morte celular principalmente por apoptose em ambas as linhagens, o que poderia apresentar um potencial uso clínico no tratamento de tumores do sistema nervoso central.

Gaelzer et al. (2016), assim como Hui et al. (2008), apoiam a hipótese de que o mecanismo de ação da doxazosina esteja relacionado a receptores EGFR. Seus estudos mostram que a doxazosina foi capaz de diminuir níveis de EGFR-p e induzir morte celular em células C6, nas concentrações de 100, 150 e 180 μ M, tendo um efeito similar ao AG1478 (um inibidor de EGFR), tanto em células que foram previamente sensibilizadas a superexpressar esse receptor (com adição do substrato EGF), quanto nas células que não passaram por essa sensibilização anterior ao tratamento (Gaelzer et al. 2016).

A doxazosina age sobre a via PI3K/Akt similarmente ao LY294002 (inibidor específico de PI3K). Em células de glioblastoma tratadas com doxazosina, os níveis de Akt mostraram uma grande redução, e após exame de sua atividade protéica observou-se um “upregulation” de GSK-3 beta e p53, levando as células a inibição de proliferação e indução de morte celular via ativação de caspase-3 e parada do ciclo celular nas fases G0/G1 (Gaelzer et al. 2016).

A doxazosina apresenta baixa neurotoxicidade, mostrando aumento de morte celular significativo na população total de células de cultura primária de astrócitos apenas nas concentrações acima de 250 μ M, e nas concentrações acima de 180 μ M para culturas organotípicas de hipocampo de rato (Gaelzer et al. 2016).

Porém poucos trabalhos relatam a capacidade genotóxica desse fármaco. Segundo estudos de Dexiang et al. (1999), discute-se a inabilidade da doxazosina para induzir mutações de reversão em cepas TA97, TA98, TA100 e TA102, com ou sem ativação metabólica por S9, no teste de Ames. Da mesma forma, o tratamento com doxazosina não apresentou indução de aumento na frequência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos e nenhuma resposta significativa no teste de aberrações cromossômicas em células pulmonares de hãmsster chinês (Dexiang et al. 1999).

Por outro lado, Gabriel e colaboradores em 2011, mostraram um significativo efeito genotóxico de doxazosina nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg/mL⁻¹, no teste SMART, um ensaio *in vivo* utilizando o organismo modelo *Drosophila melanogaster*, que detecta simultaneamente eventos de mutação e recombinação mitótica e também é capaz de quantificar a atividade recombinogênica de substâncias químicas e/ou misturas complexas.

Sendo assim, torna-se bastante interessante analisar o potencial mutagênico desse fármaco em uma linhagem, que em trabalhos anteriores (Gaelzer et al. 2016), já se mostrou proliferativamente sensível.

I.3. Linhagem de glioma de rato (C6)

A linhagem de glioma de rato C6 foi originalmente induzida em ratos Wistar pela administração repetitiva de N-nitroso-N-metiluréia e os tumores formados foram retirados e cultivados *in vitro* (Benda et al., 1968 *apud* Pereira, 2011).

Esta linhagem tem sido amplamente usada como modelo para investigar vários aspectos da biologia celular, apresentando características morfológicas e fisiológicas de acordo com o número de passagens em cultivo (Pereira, 2011).

As passagens recentes das culturas da linhagem C6 são morfológicamente distintas quando comparadas com as passagens tardias. As passagens tardias são semelhantes à astroglia madura, enquanto as recentes assemelham-se à glioblastomas (Pereira, 2011), como é o caso das células que utilizamos no presente estudo.

Usando coloração de Giemsa as passagens recentes da linhagem C6 apresentam núcleo escuro, pericário escasso e processos citoplasmáticos finos (Parker et al., 1960 *apud* Pereira, 2011). Além disso, muitos estudos têm relatado que C6 de passagens recentes são menos diferenciadas e mais glioblásticas do que as passagens tardias (Parker et al., 1960; Mangoura et al., 1989; Lee et al. 1992; Goya et al., 1996 *apud* Pereira, 2011). Devido a essas características, as passagens recentes da linhagem C6 têm sido amplamente usadas como modelo de glioblastomas para uma variedade de estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados a vias de sinalização, metabolismo de gliomas, invasão e crescimento tumoral, migração, rompimento da barreira hemato-encefálica, neovascularização, produção e regulação de fatores de crescimento e terapia de drogas (Braganhof et al., 2009; Eloqayli et al., 2011; Zhai et al., 2011; Chen et al., 2011; Weyerbrock et al., 2011; Kostourou et al 2011; Lu et al, 2010; El Sayed et al., 2011 *apud* Pereira, 2011).

II. JUSTIFICATIVA

O uso clínico do mesilato de doxazosina para tratamentos de hipertensão e hiperplasia benigna de próstata é bem estabelecido e estudado, assim como seu mecanismo de ação. Porém, pesquisas recentes demonstram seu potencial antineoplásico para tratamento de glioblastomas, entre outros tipos tumorais.

Muitos quimioterápicos ativam vias de sinalização que levam ao bloqueio ou retardo no ciclo celular, ativação ou desativação de mecanismos de reparo do DNA e apoptose (Camargo, et al. 2010). Os fármacos antineoplásicos, embora comumente utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, não têm suas atividades restritas às células tumorais, e dessa forma, podem causar danos genotóxicos em células saudáveis (Sanches-Suárez et al., 2008 *apud* Camargo, 2010), e também em células tumorais remanescentes do tratamento.

Apesar de a doxazosina ser um fármaco já estabelecido na clínica, não se encontram muitos estudos bibliográficos acerca de avaliações genotóxicas o envolvendo. Sendo assim, visando essas novas aplicações terapêuticas, se torna importante que haja uma avaliação do seu potencial mutagênico.

III. OBJETIVO

III.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial citotóxico e mutagênico do mesilato de doxazosina, através da técnica de CBMN *in vitro*, na linhagem de glioma de rato (C6).

III.2. Objetivos Específicos

II.2.1. Estabelecer qual concentração de citocalasina B seria mais eficaz em bloquear a citocinese celular, assim como, a escolha do composto usado como controle positivo e sua melhor concentração na geração de alterações mutagênicas nas células da linhagem C6;

II.2.2. Avaliar os efeitos citostáticos do mesilato de doxazosina em células da linhagem C6, através do índice de proliferação por bloqueio de citocinese (CBPI);

II.2.3. Avaliar a frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares após exposição de células da linhagem C6 a diferentes concentrações do mesilato de doxazosina.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Reagentes

O meio de cultivo celular *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos a partir da Gibco® Invitrogen (Grand Island, NY, USA). O mesilato de doxazosina e tripsina EDTA 1:250 foram obtidos a partir da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A citocalasina B, CAS no. 14930-96-2, 5mg/mL foi adquirida a partir da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil) diluído em DMSO (Sigma). A bleomicina (Blenoxane®), foi utilizada para induzir dano cromossômico (controle positivo) para os testes de mutagenicidade, diluída em DMEM incompleto.

IV.2. Cultura Celular

A linhagem celular de glioma de rato (C6) - passagens 20-25, foi obtida junto à ATCC CCL-107 BCRJ número de catálogo 0057 (Rockville, MD, USA). As células foram mantidas e expandidas em DMEM (Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado com 5% (v/v) soro fetal bovino (SFB, Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY, USA), contendo 2,5 mg/mL de Fungizona® e 100 U/L de antibiótico, combinado de estreptomicina e penicilina a 1% e gentamicina a 0,1% (Shering do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As células foram mantidas a uma temperatura de 37°C e com umidade relativa de 5% de CO₂ atmosférico em uma incubadora (Thermo Scientific).

IV.3. Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese (CBMN)

Para realização dos experimentos, aproximadamente 60.000 células da linhagem C6 foram semeadas em placas de 24 poços (TPP), utilizando a exclusão de morte celular pelo uso do corante Tripán Blue. Após 48 horas de crescimento celular realizou-se a troca de meio de cultivo por meio DMEM incompleto (sem suplementação com SFB, e sem adição de antibiótico e antifúngico), incluindo ao meio Cyt B (Sigma Aldrich) na concentração final de 2,5 µg/mL. Por conseguinte, essas células foram submetidas a tratamento com mesilato de doxazosina nas seguintes concentrações: 3µM, 6µM, 12µM, 25µM, 50µM, 100µM, 150µM,

200 μ M e 250 μ M. Como controle positivo utilizou-se a concentração de 3 μ g/mL de bleomicina e como controle negativo utilizou-se a concentração de 8 μ l/mL de etanol, solvente utilizado para diluição da doxazosina.

Após 24 horas de tratamento as células foram lavadas duas vezes com solução salina fosfato modificada por Dulbeco (DPBS) e incubada em meio DMEM completo (suplementado com SFB e com adição de antibiótico e antifúngico) durante uma hora. Seguidamente as células foram tripsinizadas, neutralizadas e coletadas em citocentrífuga (Cientec), durante 5 minutos à 700rpm. Foram coradas (Instant-Prov/Newprov®) e levadas para análise por microscopia óptica.

O critério de seleção, assim como o de contagem de células binucleadas com presença de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares foi definido de acordo com o guia da OECD TG 487 adotado em 26 de setembro de 2014 .

Para avaliação da cinética celular foi utilizado o índice de proliferação com bloqueio da citocinese (CBPI). Para isso, pelo menos mil células por cultura foram analisadas quanto a presença de células mono, bi, tri e multinucleadas, sendo calculado de acordo com as fórmulas: $CBPI = [M1 + 2(M2) + 3(M3 + M4)]/NT$. Onde, M1 a M4 representam células com 1 a 4 núcleos e NT representa o número total de células analisadas.

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a fórmula:

$\% \text{ de inibição da proliferação celular} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) / (CBPI_c - 1)\}$. Onde, $CBPI_T$ representa o CBPI das células que receberam diferentes concentrações do tratamento com doxazosina e $CBPI_c$ representa o CBPI das células do controle negativo.

IV.4. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA de uma via, seguida do teste post hoc de Dunnet para comparações dos grupos de tratamento em relação ao controle negativo. Todas as análises são referentes a pelo menos dois experimentos independentes, com $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$. Para todas as análises utilizou-se o programa IBM SPSS Statistic.

V. RESULTADOS

No Quadro 1, estão apresentados as características das células analisadas no CBPI.



Os resultados referentes ao Índice de Proliferação com Bloqueio da Citocinese (CBPI) e do percentual de inibição celular associados aos tratamentos com doxazosina em células da linhagem C6 estão representados no Gráfico 1.

O mesilato de doxazosina foi capaz de reduzir, significativamente, os valores de CBPI das células dos grupos tratados nas concentrações de 25 μ M a 250 μ M em relação ao grupo controle negativo.

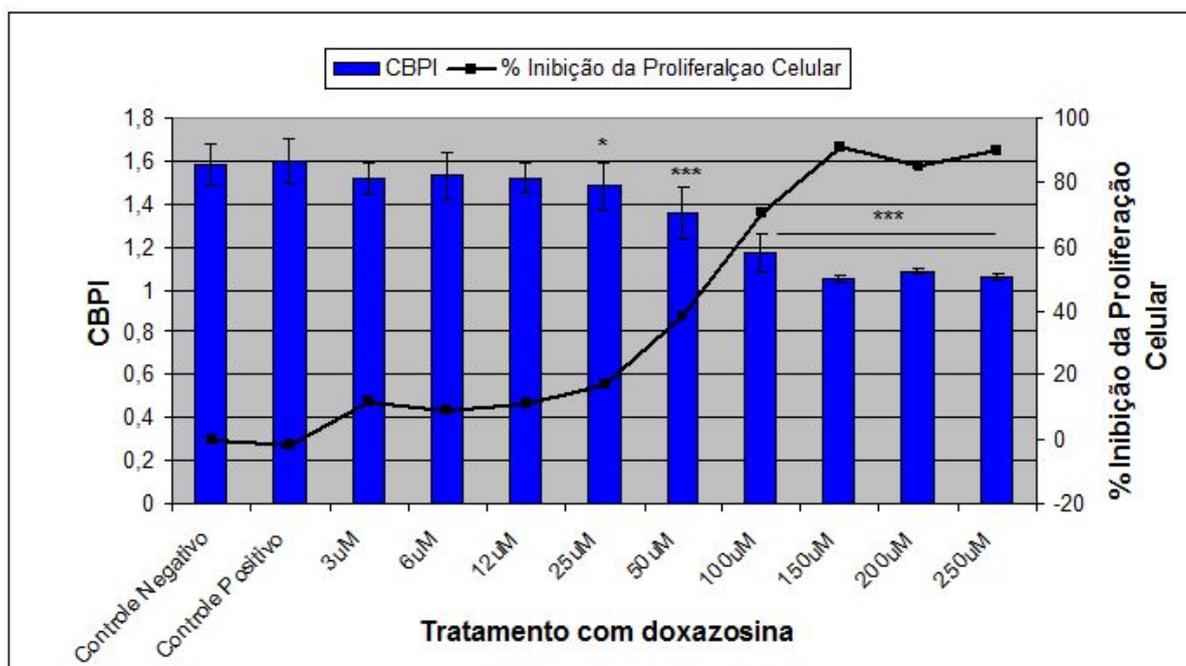


Gráfico 1. CBPI e efeito citostático em células C6 expostas a diferentes concentrações (μM) de doxazosina. O CBPI é expresso como média \pm desvio padrão. As médias do CBPI dos tratamentos foram comparadas com a média do controle negativo. O efeito citostático é expresso como % de inibição da proliferação celular em relação ao controle negativo (CN). $P < 0,05^*$ e $P < 0,001^{***}$.

A partir da análise do CBPI e do percentual de inibição da proliferação celular pode-se verificar que o efeito citostático aumenta em função da dose, com um nível de significância de 0,05 para a concentração de $25\mu\text{M}$ e nível de significância de 0,001 para as concentrações de $50\mu\text{M}$ a $250\mu\text{M}$, atingindo 50% de citostase entre as concentrações de $50\mu\text{M}$ a $100\mu\text{M}$ de doxazosina.

Em relação aos marcadores de instabilidade genômica analisados (Quadro 2), foi possível observar uma significância negativa na frequência de micronúcleos de células C6 tratadas com doxazosina quando comparadas ao controle negativo, com um nível de significância de 0,05 para as concentrações de $3\mu\text{M}$ e $12\mu\text{M}$ e nível de significância de 0,001 para a concentração de $6\mu\text{M}$.

O controle positivo (bleomicina $3\mu\text{g/mL}$) mostrou-se eficaz em induzir aumento na frequência de micronúcleos quando comparado ao controle negativo num nível de significância de 0,001.

Com relação à frequência de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, nossos resultados não mostram diferença significativa nos grupos tratados com doxazosina quando comparados ao controle negativo. Todos os dados referentes às informações acima estão representados na Tabela 2.

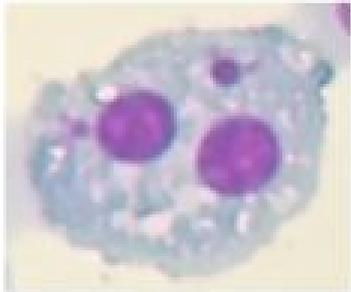
QUADRO 2 Marcadores de instabilidade genômica analisados para o CBMN		
Anomalias Nucleares	Características	Fotomicrografia
MICRONÚCLEO	Formados a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros.	
PONTE NUCLEOPLASMÁTICA	Ligação entre núcleos da célula binucleada. Ocorrem quando os centrômeros dos cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para pólos opostos da célula durante a anáfase.	
BROTO NUCLEAR	Morfologicamente similares aos MNs, com a exceção da conexão nucleoplasmática.	

TABELA 1**Frequência de dano cromossômico após exposição (24h) de células C6 à doxazosina**

Tratamentos	Média de MN ± DP	Média de PN ± DP	Média de BrN ± DP
Controle Negativo	10,875 ± 4,16	3,75 ± 2,92	3,625 ± 2,5600
Controle Positivo	22,20 ± 15,87***	6,9 ± 4,65	5,8 ± 5,85
3µM	5,889 ± 5,01 *	2,111 ± 1,45	5,00 ± 2,50
6µM	3,778 ± 1,56 **	2,556 ± 1,94	3,00 ± 1,41
12µM	6,111 ± 2,42*	3,333 ± 2,24	4,111 ± 2,71
25µM	8,625 ± 4,24	3,500 ± 2,00	5,625 ± 3,46
50µM	7,429 ± 3,5	3,429 ± 2,64	3,857 ± 3,58

Média ± desvio padrão do número de MN: micronúcleos; PN: pontes nucleoplasmáticas; BrN: brotos nucleares após tratamento com doxazosina. CP: Bleomicina (3µg/mL); CN: Etanol (0,8%).
P < 0,05*, 0,01** e P < 0,001***.

VI. DISCUSSÃO

As similaridades entre células tumorais e embriogênicas é grande, ambos os tipos são morfológicamente simples, ambas podem se diferenciar em células de várias formas e tamanhos, e mais importante, ambas tem a capacidade de crescer extensivamente. Baseado nessas observações, Cohnheim propôs que células tumorais podem ser originadas de células embriogênicas. Durante o desenvolvimento ele sugeriu que mais células do que o necessário para a construção de um tecido em particular podem ter sido produzidas. Esse excesso de células poderia persistir nesse tecido até a vida adulta, e por serem embriogênicas na origem, poderiam reter a capacidade de crescer. Tumorigênese, então, poderia resultar da ativação anormal no programa de crescimento dessas células (Rather, 1978 *apud* Welchsler-Reya e Scott, 2001).

Glioblastomas multiforme (GBM) são os tumores cerebrais mais comuns em adultos (Collins 1998 e Salcman 1995 *apud* Welchsler-Reya e Scott, 2001). São os tumores mais malignos que podem surgir a partir de células neurais já diferenciadas ou precursores de células-tronco neurais, mas sua morfologia e comportamento heterogêneos tornam extremamente difíceis conclusões sobre suas origens (Lopes et al 1995 *apud* Welchsler-Reya e Scott, 2001).

Os pacientes com GBM exibem uma sobrevida média de apenas 14,6 meses após ressecção cirúrgica e tratamentos de rádio e quimioterapia adjuvantes (Ostrom, 2015 *apud* Galzer, 2016). A quimioterapia com temozolamida (TMZ), fármaco utilizado como terapia padrão para esse tipo tumoral, aumenta a sobrevivência dos pacientes em cerca de seis meses a um ano, dependendo do estadiamento do tumor (Stupp, 2005 *apud* Galzer, 2016).

A etiologia dos GBMs é complexa, e quase sempre envolvem mutações e superexpressões de múltiplos genes. Citogeneticamente, glioblastomas exibem perdas de porções dos cromossomos 6, 9, 10, 13, 17, 22 e Y e ampliações ou ganho de material nos cromossomos 7,12 e 19 (Collins, 1998 e Rasheed, 1999 *apud* Welchsler-Reya e Scott, 2001). Alguns genes relevantes em GBMs tem sido identificados, e entre eles se incluem os genes de receptores de fator de crescimento (p. ex. EGFR), componentes na maquinaria celular (Rb, CDK4 e CDK inibidor de P16) e reguladores de apoptose (P53, MDM2, ARF e PTEN) (Welchsler-Reya e Scott, 2001).

Maher et al. (2001) especula que um estado de diferenciação imaturo poderia ser permissivo para os efeitos de transformação de uma mutação relevante para o câncer, embora também

seja possível que uma mutação genética possa alterar o estado de diferenciação no processo de transformação.

Muitos quimioterápicos ativam vias de sinalização que levam ao bloqueio ou retardo no ciclo celular, ativação ou desativação de mecanismos de reparo do DNA e apoptose (Camargo, et al. 2010). Os fármacos antineoplásicos, embora comumente utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, não têm suas atividades restritas às células tumorais, e dessa forma, podem causar danos genotóxicos em células saudáveis (Sanches-Suárez et al., 2008 *apud* Camargo, 2010), e também em células tumorais remanescentes do tratamento.

Essa ação antineoplásica direcionada a mecanismos relacionados com ciclo celular pode vir a causar influência na estabilidade gênica das células, ainda mais em células tumorais, onde há presença de vários tipos de mutações e alterações genéticas que levam a uma maior instabilidade gênica. Quanto mais mutações houver, mais instabilidade e propensão a sofrerem novas mutações, e como cita Maher et al. (2001), podendo alterar o processo de diferenciação e conduzir essa célula para um fenótipo de maior malignidade.

Visando essas possíveis alterações malignas, torna-se necessário avaliar o potencial mutagênico de fármacos que estão sendo utilizados como antineoplásicos.

Apesar do mesilato de doxazosina ser atualmente utilizado na clínica para o tratamento de hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e hiperplasia benigna de próstata (BPH) (Wykretowicz, 2008 *apud* Gaelzer et al. 2016), cada vez mais, estudos mostram seu potencial antineoplásico para vários tipos de tumores, dentre eles adenoma pituitário (Fernando, 2005), câncer de mama (Hui, 2008) e glioblastoma (Staudacher, 2014 e Gaelzer, 2016).

Atualmente já está comprovada que sua ação anti-hipertensiva é devido à sua capacidade de se ligar a receptores alfa-1 adrenérgicos, mas segundo Hui et.al (2008), os mecanismos de suas ações antiproliferativas e pró-apoptóticas em células tumorais ainda não são bem compreendidos. Porém, uma de suas hipóteses é que a doxazosina tenha uma potencial interação com receptores EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), já que apresenta em sua estrutura química um anel quinazolínico, similar aos atuais inibidores de receptores tirosina-cinase.

Por outro lado, a redução da proteína hERG, dependente da concentração, foi observada nas células expostas à doxazosina, induzindo apoptose celular da mesma forma que a desipramina, uma droga inibidora da proteína hERG (Staudacher et al. 2014).

Segundo Staudacher (2014), em pacientes tratados com doxazosina para hipertensão ou hiperplasia prostática benigna, foram relatados níveis plasmáticos entre 42 nM e 244 nM do fármaco, com 98,3% de ligação protéica. Esses dados indicam que a apoptose nas células de GBMs não serão induzidas usando doses que são atualmente aplicadas para doenças não-malignas. Em vez disso, seria necessário aumentar as doses de doxazosina para o uso como fármaco antineoplásico, o que ainda não foi determinado. Uma solução a isso seria o uso desse fármaco na sua forma nanoencapsulada, aumentando a vetorização do fármaco no local de ação, o que foi mostrado pelo trabalho *in vivo* de Gaelzer (2016), não apresentando toxicidade sistêmica e sendo eficiente contra células tumorais.

Porém, mesmo na sua forma livre em solução, a doxazosina apresenta baixa neurotoxicidade, mostrando aumento de morte celular significativo na população total de células de cultura primária de astrócitos, apenas nas concentrações acima de 250 μ M, e nas concentrações acima de 180 μ M para culturas organotípicas de hipocampo de rato (Gaelzer et al. 2016).

Para este trabalho analisamos o índice de CBPI (*Cytokinesis-Block Proliferation Index*), e o percentual de inibição da proliferação celular, onde achamos resultados significativos para ambos os testes nas células tratadas com doxazosina nas concentrações de 25 μ M ($P < 0,05^*$) e 50 μ M a 250 μ M ($P < 0,01^{**}$) num tratamento de 24 horas. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, onde Gaelzer (2016) já havia testado o potencial antineoplásico da doxazosina nesta mesma linhagem, apresentando parada do ciclo celular a partir da concentração de 50 μ M através da técnica de citometria de fluxo.

Entretanto, poucos trabalhos relatam a capacidade genotóxica desse fármaco. Por esse motivo, realizamos em nossos experimentos o teste de CBMN (*cytokinesis-block micronucleus*).

Em nossos estudos a doxazosina não apresentou mutagenicidade significativa para nenhuma das alterações gênicas analisadas nas concentrações testadas. Para análise de brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas o tratamento com doxazosina não gerou nenhuma diferença entre os grupos no teste de hipóteses da ANOVA, mostrando que o tratamento com doxazosina não influencia no aumento ou diminuição de suas frequências.

Porém, é possível notar uma significativa diminuição no número de micronúcleos das células tratadas com as concentrações de 3 μ M, 6 μ M e 12 μ M de doxazosina, se comparados às células do controle negativo.

Se buscarmos na literatura trabalhos similares, encontramos corroboração para nosso estudo nos trabalhos de Dexiang (1999), onde os autores testaram o potencial mutagênico da doxazosina através do teste de Ames (com e sem ativação metabólica por S9), teste de aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês (CHO) e pelo teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos. Ambos os testes foram testados com concentrações bem mais altas que em nosso trabalho (513, 1025 e 2050 mg/kg), não apresentando resposta significativa.

Além disso, se levarmos em conta testes mutagênicos realizados em fármacos com estrutura análoga à doxazosina, como é o caso do Lapatinib e do cloridrato de prazosina, não se encontram evidências de mutagenicidade.

O Lapatinibe é um duplo inibidor de resíduos tirosina cinase do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) e do Receptor do Fator de Crescimento Humano 2 (Herb-2). É indicado para tratamento de pacientes com câncer de mama avançado ou metastático com superexpressão de Herb-2 (Balansky et al. 2014). Ao testar a frequência de micronúcleos em medula óssea de ratos Wistars fêmeas tratados com Lapatinib, estes autores não obtiveram resposta significativa na concentração testada (1600mg/kg de dieta).

O cloridrato de prazosina é um medicamento comercializado pela Pfizer, sob nome comercial de Minipress® SR. É indicado para o tratamento de hipertensão arterial primária e secundária. Estudos com animais sugerem que o efeito vasodilatador do cloridrato de prazosina está relacionado ao bloqueio dos receptores alfa-1 adrenérgicos pós-sinápticos. Segundo dados de segurança pré-clínicos encontrados na bula do medicamento comercializado, o cloridrato de prazosina não se mostrou mutagênico em testes de toxicologia genética, e não foi carcinogênico em um estudo de 18 meses realizado em ratos (Bula do cloridrato de prazosina).

Gabriel et al. (2011), apresentaram resultados significativos de efeitos genotóxicos da doxazosina na avaliação pelo teste SMART, expressando um aumento significativo na frequência total de spots em moscas trans-heterogêneas para as duas concentrações mais altas (2 e 4 mg.ml⁻¹). A avaliação do balanço de moscas heterozigotas mostrou que a doxazosina produziu dano primário no DNA, que é processado posteriormente por recombinação

homóloga pela via de reparo. Porém, as concentrações de doxazosina utilizadas nesse estudo foram muito superiores do que as concentrações utilizadas na clínica.

Segundo nossos resultados e com base em nossa pesquisa bibliográfica, observamos que nas concentrações utilizadas em nosso trabalho a doxazosina não mostra evidências significativas de apresentar potencial mutagênico.

VII. CONCLUSÃO

A doxazosina é capaz de induzir citostase de 50% em células C6 quando aplicada na concentrações de 100 μ M e 150 μ M quando analisadas pelo CBPI.

Nas concentrações de mesilato de doxazosina testadas no presente estudo (3 μ M a 50 μ M) em célula de glioma de ratos (C6) pelo teste de CBMN, não há evidências significativas de que esse fármaco apresente potencial mutagênico.

VIII. PERSPECTIVAS

Como perspectivas poderíamos realizar um teste de antimutagenicidade através da técnica de CBMN, já que nossos dados nos indicam uma diminuição significativa na frequência de micronúcleos em células tratadas nas concentrações de 3 μ M, 6 μ M e 12 μ M de doxazosina quando comparadas as células do controle negativo.

Esse teste de antimutagenicidade poderia ser realizado, não necessariamente com o intuito de usar esse fármaco como antimutagênico, e sim de avaliar, se além de ter potencial antineoplásico contra glioblastomas de alto grau, ele também teria uma ação antimutagênica para aquelas células que ainda estão iniciando o processo de tumorigênese, corrigindo algumas anomalias nas células que tem uma maior instabilidade gênica e propensão a sofrer transformação tumoral.

Com o intuito de futuro uso clínico do mesilato de doxazosina como antineoplásico seria aconselhável a realização de mais testes genotóxicos em linhagens de glioblastoma humano, células neurais não-tumorais e também testes *in vivo*.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALANSKY, R. et al. Assay of lapatinib in murine models of cigarette smoke carcinogenesis. **Carcinogenesis**, vol.35, no.10, p.2300–2307, doi:10.1093/carcin/bgu154, 2014.

BLENDÁ, P. et al. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, 161, 370-371, 1968.

BRAGANHOL, E. et al. A comparative study of ectonucleotidase and P2 receptor mRNA profiles in C6 cell line cultures and C6 ex vivo glioma model. **Cell Tissue**, 2009. Res, 335, 331- 340.

Bula do cloridrato de prazosina, sob nome comercial de Minipress® SR. Disponível em: <
http://www.pfizer.com.br/sites/g/files/g10010996/f/product_attachments/MinipressSR_PS.pdf
> Acesso em: 30 de dezembro de 2017.

CAMARGO, E. A. **Efeitos genotóxicos e mutagênicos dos agentes antineoplásicos cisplatina e gencitabina em células de carcinoma de bexiga**. 2010. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CHEN, J. H.; et al. Ghrelin induces cell migration through GHS-R, CaMKII, AMPK, and NF- κ B signaling pathway in glioma cells. **J Cell Biochem**, 112, 2931-2941, 2011.

CHON, J.K.; et al. Alpha 1 adrenoceptor antagonists terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia. **J Urol**, v. 161, p. 2002–2008, 1999.

COLLINS, V. P. Gliomas. **Cancer Surv**, v. 32, p. 37–51, 1998.

DEXIANG, X.; et al. Study on the Mutagenicity of Doxazosin. **Carcinogenesis, teratogenesis e mutagenesis**, vol.11. p. 46-048, 1999.

ELOQAYI,, H.; MELO, T.M.; HAUKVIK, A. e SONNEWALD, U. β -hydroxybutyrate metabolism in astrocytes and C6 glioblastoma cells. **Neurochem Res**, v. 36, p. 1566-1573, 2011.

EL SAYED, M. L. et al. D-amino acid oxidase gene therapy sensitizes glioma cells to the antiglycolytic effect of 3-bromopyruvate. **Cancer Gene Ther**, 2011.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. et al. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.23-46.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.

FERNANDO, M.A.; HEANEY, A.P. Alpha1-adrenergic receptor antagonists: novel therapy for pituitary adenomas. **Mol Endocrinol**, v. 19, p. 3085-96, 2005.

GABRIEL, K.C.; et al. Homologous recombination induced by doxazosin mesylate and saw palmetto in the *Drosophila* wing-spot test. **Journal of Applied Toxicology**, DOI 10.1002/jat.1740, 2011.

GAELZER, M.M.; et al. Phosphatidyl inositol 3-Kinase/AKT Pathway Inhibition by Doxazosin Promotes Glioblastoma Cells Death, Upregulation of p53 and Triggers Low Neurotoxicity. **PLoS ONE**,11(4):e0154612, DOI:10.1371/journal, 2016.

GAELZER, M.M.; et al. **Investigação do potencial terapêutico da doxazosina em modelos de gliomas *in vitro* e *in vivo***. 2016. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HUI, H, FERNANDO, M.A, HEANEY, A.P. The alpha1-adrenergic receptor antagonist doxazosin inhibits EGFR and NF-kB signalling to induce breast cancer cell apoptosis. *Eur J Cancer*, v. 44, p. 160–166, 2008.

In vitro mammalian cell micronucleus test. **OECD Guideline for the testing of chemicals.** Adotado em 26 de setembro de 2014. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced-tg487-2014-508.pdf>>. Acesso em: 31 de dezembro de 2017.

KIRBY, R.S. Doxazosin in benign prostatic hyperplasia: effects on blood pressure and urinary flow in normotensive and hypertensive men. *Urology*, v. 46, p. 182–186, 1995.

KOSTOUROU, V.; et al. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *BrJCancer*, v. 104, p. 83-90, 2011.

LOPES, M. B. S., VANDENBERG, S.R.; SCHEITHUER, B. W. Histopathology, immunochemistry and ultrastructure of brain tumors. **Brain Tumors: An Encyclopedic Approach**. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, ed. AH Kaye, ER Laws, 1995. p. 125–162.

LU, D.Y. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration and matrix metalloproteinase-13 expression in glioma cells. *Biochem Pharmacol*, v. 80, p. 1201-1209, 2010.

MAHER, E.A.; et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes e Development*, v. 15, p. 1311–1333, ISSN 0890-9369/01, 2010.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*, v. 17, n. suppl 4, p. iv1-iv62, ISSN 1522-8517, 2015.

PALAZZO, R.P.; MALUF, S.W. Técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular. In: MALUF, S.W.; RIEGEL, M. et al. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Arned, 2011. p.180-193.

PARKER, K. K.; NOREMBER, M. D. e VEMADAKIS, A. Transdifferentiation of C6 glial cells in culture. **Science**, v. 20s., p. 179-181, 1960.

PEREIRA, M. S. L.; **Comparação de parâmetros do sistema glutamatérgico entre passagens recentes e tardias da linhagem de glioma C6**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SALCMAN, M. Glioblastoma and malignant astrocytoma. **Brain Tumors: An Encyclopedic Approach**.Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, ed.AHKaye, ERLaws, 1995.

SANCHEZ-SUAREZ, P. et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. **Mutat Res.**, v. 640(1-2), p. 8-15, 2008.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987-996, INSS 0028-4793, 2005.

RATHER, L. J. The Genesis of Cancer: **A Study in the History of Ideas**. Baltimore, MD: Johns Hopkins Univ. Press, 1978.

STAUDACHER, I.; et al. Herg K⁺ channel-dependent apoptosis and cell cycle arrest in human glioblastomas cells. **Plos One**, v.9, Issue 2, e881, 2014.

WECHSLER-REYA, R. ; SCOTT, M.P. **The developmental biology of brain tumors**. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 385–428, 2001.

WEYERBROCK, A. et al. Differential effects of nitric oxide on blood-brain barrier integrity and cerebral blood flow in intracerebral c6 gliomas. **Neuro Oncol**, v.13, p. 203, 2011.

WYKRETOWICZ, A.; GUZIK, P.; WYSOCKI, H.; Doxazosin in the current treatment of hypertension. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 9, n. 4, p. 625-633, INSS 1465-6566, 2008.

ZHAI, A. et al. Annexin A2 promotes glioma cell invasion and tumor progression. **JNeurosci**, v. 31, p. 14346-14360, 2011.