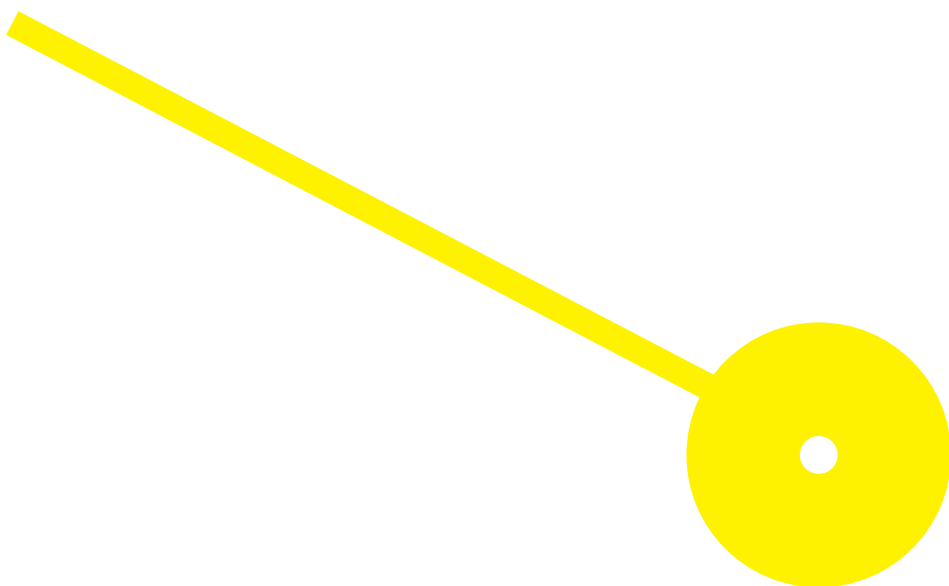




The influence of phytochemicals on glioma: the role of cinnamic acid and silymarin

Maria Inês Silva Martins Parreira

09/2024





The influence of phytochemicals on glioma: the role of cinnamic acid and silymarin

Autor

Maria Inês Silva Martins Parreira

Orientadores

Prof. Doutora Joana Filipa Correia de Almeida ESS-IPP, TBIO-RISE

Prof. Doutor Ricardo Ferraz, ESS-IPP, LAQV-REQUIMTE

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo em **Bioquímica Clínica e Metabólica** em pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação não teria sido possível sem a orientação e o apoio de várias pessoas e instituições.

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer profundamente à minha orientadora do TBIO, a Professora Doutora Joana Filipa Correia de Almeida, que sempre esteve lá para me ajudar, qualquer que fosse o obstáculo que tivesse no meu caminho, estando sempre disposta a explicar-me e dar-me ao conhecimento das diferentes técnicas e métodos que foram utilizados na elaboração deste estudo científico.

Para além disso, gostaria também de agradecer ao meu supervisor institucional, o Professor Doutor Ricardo Ferraz, pelas dicas e conselhos que me deu ao longo deste caminho difícil, de modo que a minha escrita estivesse o mais correta e científica possível.

Resumo

Os gliomas são dos tumores mais predominantes e frequentes do sistema nervoso central (SNC). Este tipo de tumores são malignos e possuem uma etiologia muito heterogênea e um caráter muito agressivo, com um prognóstico muito mau e altas taxas de mortalidade e de morbidade. Um dos principais responsáveis por estas características, anteriormente mencionadas, são as células-estaminais do glioma (GSC), que possuem a capacidade de evoluir para células tumorais funcionais que, seguidamente, vão conseguir invadir os tecidos adjacentes, aumentando, assim, o grau de agressividade dos gliomas. Devido ao facto de os gliomas terem um caráter altamente heterogêneo e, da barreira hematoencefálica (BHE) ter uma permeabilidade muito seletiva (apenas determinadas moléculas a conseguem atravessar), as terapias que existem atualmente como cirurgia de ressecção, quimioterapia e radioterapia, não conseguem melhorar o prognóstico dos pacientes, ocorrendo de novo o glioma. Deste modo, é necessário encontrar novas formas e novas terapias que consigam melhorar o prognóstico dos pacientes que sofram deste tipo de patologias, com o mínimo de efeitos secundários possível. A silimarina e o ácido cinâmico são substâncias com propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e com potencial anti-metastático. No estudo presente, os efeitos do ácido cinâmico e da silimarina no metabolismo, na proliferação e na apoptose foram examinados nas células da linha celular GL261. A toxicidade celular provocada por estes dois biocompostos foi avaliada com recurso ao método do MTT. A migração das células GL261 foi avaliada através da realização de um riscado único e vertical no meio de cada poço da placa. Os tratamentos com silimarina revelaram que existiu uma oscilação entre a % de toxicidade celular e o aumento da concentração do tratamento, e que existiu um incremento na migração das células. Em relação aos tratamentos com o ácido cinâmico, os mesmos revelaram que uma ligeira diminuição da % de toxicidade celular, à medida que se aumentava a concentração do tratamento, e que, no ensaio de migração celular, não existiu uma evidente relação de dependência entre % de migração celular e a concentração do ácido cinâmico. Os resultados obtidos demonstraram que a silimarina e o ácido cinâmico revelam ter potencial para, no futuro, se assumirem com uma das terapêuticas a ter conta no tratamento do glioma, devido aos seus efeitos inibitórios e indutores da apoptose das células GL261.

Palavras-chave: glioma, fitoquímicos, silimarina, ácido cinâmico, terapias co-adjuvantes

Abstract

Gliomas are one of the most predominant and frequent tumors of the central nervous system (CNS). These types of tumors are malignant and have a very heterogeneous etiology and a very aggressive nature, with a very poor prognosis and high mortality and morbidity rates. One of the main responsible for these previously mentioned characteristics are glioma stem cells (GSC), which have the ability to evolve into functional tumor cells that will then be able to invade adjacent tissues, thus increasing the degree of aggressiveness of gliomas. Due to the fact that gliomas have a highly heterogeneous character and the blood-brain barrier (BBB) has a very selective permeability (only certain molecules can cross it), currently existing therapies such as resection surgery, chemotherapy and radiotherapy are unable to improve the prognosis of patients, glioma occurring again. Therefore, it is necessary to find new ways and new therapies that can improve the prognosis of patients suffering from this type of pathology, with as few side effects as possible. Silymarin and cinnamic acid are substances with anti-inflammatory, antioxidant properties and antimetastatic potential. In the present study, the effects of cinnamic acid and silymarin on metabolism, proliferation and apoptosis were examined in cells of the GL261 cell line. The cellular toxicity caused by these two biocompounds was evaluated using the MTT method. Migration of GL261 cells was assessed by making a single, vertical streak in the middle of each well of the plate. Treatments with silymarin revealed that there was an oscillation between the % of cellular toxicity and the increase in treatment concentration, and that there was an increase in cell migration. In relation to treatments with cinnamic acid, they revealed a slight decrease in the % of cellular toxicity, as the treatment concentration increased, and that, in the cell migration assay, there was no evident relationship of dependence between % cell migration and cinnamic acid concentration. The results obtained demonstrated that silymarin and cinnamic acid have the potential to, in the future, become one of the therapies to be considered in the treatment of glioma, due to their inhibitory and inducing effects on the apoptosis of GL261 cells.

Keywords: glioma, phytochemicals, silymarin, cinnamic acid, co-adjuvant therapies

Índice

Lista de abreviaturas.....	VI
Lista de figuras.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1. Glioma e classificação dos gliomas.....	2
1.2. Etiologia e fatores de risco.....	4
1.3. Formas de tratamento de gliomas	8
1.4. Silimarina	9
1.5. Ácido cinâmico.....	11
2. Materiais e métodos.....	13
2.1. Modelo celular de glioma, sob ação de fitoquímicos.....	13
2.1.1. Condições de cultura	13
2.2. Efeitos da silimarina e do ácido cinâmico na viabilidade celular das células GL261.....	13
2.2.1. Ensaio da toxicidade celular: MTT	14
2.3. Efeitos da silimarina e do ácido cinâmico na migração das células GL261	15
2.4. Análise Estatística.....	16
3. Resultados.....	17
3.1. Efeitos da silimarina e do ácido cinâmico na toxicidade das células GL261	17
3.2. Efeitos da silimarina e do ácido cinâmico na migração das células GL261	19
4. Discussão.....	21
5. Conclusão.....	24
Referências Bibliográficas.....	25

Lista de abreviaturas

SNC – Sistema Nervoso Central

GSC – Células-estaminais do glioma

BHE – Barreira hematoencefálica

CNS – *Central Nervous System*

BBB – *Blood Brain Barrier*

CSC – Células estaminais cancerígenas

OMS – Organização Mundial de Saúde

GBM – Glioblastoma

IDH – Isocitrato desidrogenase

TC – Tomografia Computadorizada

TERT – Transcriptase reversa da telomerase

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico

pHGG – Gliomas pediátricos de alto grau

DIPG – Gliomas pontinos intrínsecos difusos

PLNTY – Tumores neuroepiteliais polimórficos de baixo grau

ncRNA – RNA não codificante

RNA – Ácido ribonucleico

METTL3 – Metiltransferase 3

METTL14 – Metiltransferase 14

WTAP – Proteína associada ao tumor de Wilm's 1

FTO – Proteína relacionada com a obesidade e massa corporal

ALKBH5 – Homólogo 5 da ALKB, RNA demetilase

ALKBH3 – Homólogo 3 da ALKB, RNA demetilase

YTHDF – Proteína 1 de ligação ao RNA YTH N6-metiladenosina

YTHDC – *YTH domain containing family*

IGF2BP – *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein*

PTEN – *Phosphatase and tensin homolog gene*

EMT – Transição epitelial-mesenquimal

LTL – *Leukocyte telomere length*

RTL – *Relative telomere length*

TMZ – Temozolomido

RM – Ressonância magnética
IDO – Indoleamina 2,3-desoxigenase
CTLA-4 – Linfócito T citotóxico associado à proteína 4
PD-L1 – Ligando 1 de morte programada
PARP – Polimerase 1 poli (ADP-ribose)
NO – Óxido nítrico
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial
DNA – Ácido desoxirribonucleico
NGM – Linha celular de melanócitos humanos derivada do nevo azul
HT-144 – Células do melanoma humano
FBS – Sêrum bovino fetal
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
PEG – *Polyethylene Glycol*
DMSO – *Dimethyl sulfoxide*
MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
GL261 – Linha de células do glioma 261

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura química da silimarina.

Figura 2 – Estruturas químicas da *drupanin* (a) e da *baccharin* (b).

Figura 3 – Estrutura química do ácido cinâmico.

Figura 4 – Esquema que exemplifica o modo como as células da linha celular GL261 foram semeadas numa placa de 96 poços. As colunas 1, 2 e 3 correspondem aos poços que contêm as várias concentrações de ácido cinâmico. As colunas 5, 6 e 7 correspondem aos poços com o tratamento com silimarina. As colunas 9, 10 e 11 correspondem aos controlos. As linhas A a H correspondem às diferentes concentrações dos compostos utilizados no tratamento das células da linha celular GL261, sendo a c1 a concentração mais baixa e a c4 a concentração mais alta, para ambas as substâncias. [Created with BioRender.com]

Figura 5 – Esquema das placas de 24 poços com os tratamentos de silimarina e de ácido cinâmico, a diferentes concentrações, para a realização do ensaio de migração celular. [Created with BioRender.com]

Figura 6 – Avaliação da toxicidade do ácido cinâmico em células GL261, pelo método MTT, em duas fases de teste de concentrações, sendo que o gráfico (a) é relativo à primeira fase e o gráfico (b) à segunda fase. Análise estatística realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis*, para um valor de $p < 0,05$, sendo os resultados apresentados pela média \pm SEM (erro padrão da média). Os níveis de significância foram calculados com o uso do teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*, sendo a significância considerada para valores de $p < 0,05$.

Figura 7 – Avaliação da toxicidade da silimarina em células GL261, pelo método MTT, em duas fases de teste de concentrações, sendo que o gráfico (a) é relativo à primeira fase e o gráfico (b) à segunda fase. Análise estatística com recurso ao teste de *Kruskal-Wallis*, para um valor de $p < 0,05$, sendo os resultados apresentados pela média \pm SEM (erro padrão da média). Os níveis de significância foram calculados com o uso do teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*, sendo a significância considerada para valores de $p < 0,05$.

Figura 8 – Efeitos que as diferentes concentrações de ácido cinâmico tiveram na % de migração das células da linha celular GL261 (a). Exemplo das imagens que foram obtidas, quando as células foram observadas ao microscópio, com a objetiva de 10x (b), juntamente com o controlo positivo (c). Efeito do ácido cinâmico a 2×10^{-2} mol/L ao longo de 24h, sendo as fotografias foram tiradas às 0h, 12h e 24h. [Created with BioRender.com].

Figura 9 - Efeitos que as diferentes concentrações de silimarina tiveram na % de migração das células da linha celular GL261 (a). Exemplo das imagens que foram obtidas, quando as células foram observadas ao microscópio, com a objetiva de 10x, juntamente com o controlo positivo (c). Efeito da silimarina a 2×10^{-5} mol/L ao longo de 24h, sendo as fotografias foram tiradas às 0h, 12h e 24h (b).

1. Introdução

Um tumor cerebral consiste num crescimento anormal excessivo de células tumores no cérebro, sendo que este crescimento pode ocorrer em qualquer parte do mesmo, indo desde o tronco cerebral, aos diferentes lobos que constituem o cérebro. Existem diferentes tipos de tumores cerebrais, destacando-se aqueles que são mais frequentes, tais como os gliomas, os meningiomas, os neuromas, que, na sua génese, diferem no seu grau de malignidade, mas que todos possuem altas taxas de mortalidade e de morbilidade, devido também à dificuldade que os fármacos têm em passar a BHE [11,12]. Esta barreira é muito seletiva e impermeável a certas substâncias que possam ser nocivas para o corpo humano.

Os tumores cerebrais podem ser divididos em tumores malignos e tumores benignos. Os tumores malignos têm como principais origens o tecido cerebral e metástases de outros tumores cerebrais que, por sua vez, podem extravasar o local de origem e migrar para outros pontos, podendo provocar o desenvolvimento de outro tipo de tumores e patologias [13]. São exemplos deste tipo de tumores o linfoma do sistema nervoso central (SNC), epidemomas malignos e meduloblastomas. Relativamente aos tumores benignos, estes não possuem a capacidade de metastisar, podendo, contudo, contribuir para efeitos adversos nos pacientes, tais como a compressão de tecidos adjacentes, impactando negativamente a vida do paciente[11].

Estas patologias da etiologia cerebral possuem um carácter altamente heterogéneo, ou seja, os tumores cerebrais são constituídos por uma variedade de células, o que faz com que as respostas aos tratamentos já existentes sejam pouco eficazes [13]. Segundo Lin et al, esta heterogeneidade é devido à existência de um conjunto de células chamadas de células-tronco cancerígenas (CSC), sendo que estas células são responsáveis pelas principais particularidades dos tumores cerebrais, isto é, auto-renovação, iniciação tumoral, marcadores tumorais, agressividade, entre outros.

1.1. Glioma e classificação dos gliomas

O glioma é um tumor maligno muito comum que afeta o SNC, tendo como principal origem os astrócitos [1,2]. Desta forma, um dos principais responsáveis pelo caráter agressivo do glioma é a existência de células-estaminais do glioma (GSC) que, por sua vez, possuem a capacidade de promover o desenvolvimento e a prevalência do tumor, podendo também levar à sua recorrência [1]. Este tipo de células são, do mesmo modo, responsáveis pela resistência a determinadas terapêuticas, devido a exercerem um efeito inibitório sobre as células que, normalmente, teriam a função de combater este tipo de patologias [1].

Segundo Garcia-Fabiani, em 2021, os gliomas podem ser classificados, de acordo com o seu poder de malignidade, em tumores de grau I a IV [14]. Em adultos, os gliomas podem ser separados em duas categorias distintas, ou seja, estes tumores podem ser denominados de gliomas difusos e de gliomas não difusos [14]. Estes últimos compreendem ependimomas, astrocitomas e outro tipo de tumores malignos com origem nos astrócitos. Os gliomas difusos são conhecidos pela sua gênese e desenvolvimento no parênquima do SNC, sendo histologicamente classificados em oligodendroglioma, astrocitoma e oligoastrocitoma[14]. Desta forma, associando os estudos histológicos de cada tumor e o seu grau de anaplasia, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os gliomas podem ser agrupados em quatro categorias diferentes, sendo que os gliomas de grau I possuem um crescimento muito lento e têm um prognóstico menos danoso para o paciente. Contudo, o mesmo não acontece com os gliomas de grau IV, onde se pode inserir o glioblastoma (GBM), o qual apresenta desenvolvimento mais acelerado, bem como elevado grau de mortalidade, contribuindo para um mau prognóstico [15]. Em 2023, Fernandes et al contrapõe com uma classificação em três categorias diferentes. Este tipo de patologias apenas se dividem em três categorias diferentes: astrocitoma com mutação na isocitrato desidrogenase (IDH); oligodendroglioma codificado em 1p/19q, também com mutação na IDH; e glioblastoma IDH *wild-type*. A primeira categoria de gliomas é caracterizada por tumores com limites pouco definidos e sem grande capacidade de afetação a outras estruturas, sendo que estes incluem-se na sub-categoria de grau 2. Adicionalmente, ainda existem astrocitomas de grau 3/4, que são conhecidos e identificáveis pela presença de zonas em necrose celular[15].

Os oligodendrogliomas com mutação em 1p/19q são conhecidos por deleções no braço curto do cromossoma 1 e no braço longo do cromossoma 19 [15], bem como por uma mutação no gene da IDH. Das características específicas destes gliomas, as mais importantes são o facto de estas

lesões possuem um carácter altamente infiltrativo, ou seja, elas têm uma capacidade muito forte de se alastrarem para outras estruturas circundantes ou até mesmo para outros órgãos diferentes, e a outra é a possível existência de pequenas calcificações, identificadas a partir da realização de exames de tomografia computadorizada (TC) [15].

Por fim, os glioblastomas IDH *wild-type* são gliomas astrocíticos, isto é, parte deles pode ter origem ou resultarem da progressão de astrocitomas difusos de baixo grau ou de astrocitomas anaplásicos [16]. Desta forma, aquilo que, por exemplo, distingue os glioblastomas primários e secundários é o facto de, nos primeiros, não existir a presença de mutações IDH1, estando interligados através de um fenótipo hipermetilado [16]. No entanto, existem outras idiosincrasias que permitem a identificação e a deteção deste tipo de patologias: mutação no promotor da transcriptase reversa da telomerase (TERT), amplificação do gene do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), necrose, entre outros [15].

No que diz respeito às crianças e adolescentes, existem duas principais categorias de gliomas, ou seja, gliomas pediátricos de alto grau (pHGG) e gliomas pontinos intrínsecos difusos (DIPG) que, por sua vez, possuem um carácter altamente agressivo e atingem, principalmente, a integridade da anatomia do SNC [14]. De modo a compreender a distinção entre gliomas pediátricos de gliomas em adultos, foram realizados imensos estudos no campo da genética e da epigenética, sendo que os resultados mostraram a existência de mutações em variantes de certas histonas (H3F3A e Hist1H3B/C), que se mostraram recorrentes ao longo dos anos de estudo [14], isto em conjunto e em associação com certas faixas etárias, distribuição anatómica, prognóstico, etc [17]. Este tipo de mutações fez com que houvesse o desenvolvimento de zonas hipometiladas de pontos de regulação pós-tradução de histonas [14]. Adicionalmente, este tipo de patologias possui traços histológicos muito particulares [14]: atividade mitótica hiperativada, altas taxas de angiogénese e de necrose, hiper celularidade, entre outros. Segundo a classificação de 2021 da OMS, os gliomas pediátricos apenas são divididos em duas grandes categorias, isto é, em tumores de baixo e de alto grau [15]. Assim, dentro do primeiro grupo encontram-se tipos de gliomas como, por exemplo, glioma angiocêntrico, tumores neuroepiteliais polimórficos de baixo grau (PLNTY), glioma difuso de baixo grau alterado pela via da proteína quinase ativada pelo mitogénio [15]. Estes tumores apresentam limites muito pouco definidos e assumem um carácter muito infiltrativo [15]. No entanto, os PLNTY podem exibir limites com uma definição mais acentuada, sendo capaz de formar cistos intratumorais com distribuição periférica [15]. Desta

maneira, os gliomas pediátricos de alto grau são caracterizados por um comportamento muito mais agressivo, fazendo com que os pacientes com esta patologia tenham mau prognóstico.

1.2. Etiologia e fatores de risco

A etiologia de um tumor é um conceito muito complexo, devido ao facto de este tipo de patologias possuir um carácter heterogéneo, contemplando uma associação entre alterações no código genético e fatores de risco provenientes do próprio ambiente, o que poderá contribuir para a proliferação descontrolada das células da glia e consequente transformação maligna[24].

Existem muitos fatores de risco que propiciam a ocorrência e o desenvolvimento deste tipo de patologias. Um deles diz respeito à metilação RNA m6A, que, por sua vez, constitui-se como um acontecimento alterável e passível de reversão, sendo que a componente m6A se encontra intimamente interligada ao aparecimento de doenças malignas como o glioma [18]. Apesar de ainda não estar completamente esclarecida a etiologia deste tipo de tumores, pensa-se que fatores genéticos, em conjunto com radiação ionizante, sejam peças-chaves na ocorrência deste tipo de patologias. Diferentes estudos demonstraram que a metilação e consequente inibição da sobreexpressão de determinados genes e proteínas contribuem para funções fundamentais ao nível da regulação do ciclo celular, proliferação, metabolismo e biogénese deste tumores [18,19,21]. O conhecimento deste processo poderá ser essencial na descoberta de novos tratamentos e de novos biomarcadores, de forma a existir um melhor prognóstico deste tipo de patologias [19]. Por conseguinte, também se conseguiu descobrir que certos fatores regulatórios da m6A, quando expressos em elevadas quantidades, exerciam uma certa influência no aparecimento de gliomas [19]. Tendo em consideração a existência destes resultados altamente opostos, os estudos ainda carecem de algum esclarecimento, de modo a conhecer o papel concreto que as diferentes enzimas e proteínas modificadas possuem no processo de desenvolvimento de gliomas e se as mesmas poderão ser alvo de novas terapias inovadoras, tendo como principal finalidade melhorar o prognóstico dos pacientes e elevar a sua esperança média de vida. Um dos fatores mais influentes são os *writers*, que, por sua vez, abrangem enzimas como, por exemplo, a metiltransferase 3 (METTL3), a metiltransferase 14 (METTL14) e a proteína associada ao tumor 1 (WTAP). Desta forma, tendo em consideração que as GSC são células que promovem o crescimento do tumor e a sua capacidade de invasão, quando se eliminou a expressão da METTL3, houve uma certa inibição do crescimento das GSC [19]. No entanto, num outro estudo realizado, veio-se a descobrir que o *knockout* da METTL3 ou da

METTL14 ou de ambas tinha um efeito contrário àquele verificado no estudo anteriormente mencionado, ou seja, a sua eliminação levaria a um aumento expressivo de alguns oncogenes e de proteínas a jusante [19,23], fazendo com que os pacientes com esta patologia tenham uma esperança média de vida muito mais baixa. Em relação à WTAP, esta proteína encontra-se sobreexpressa em situações de glioma, tendo como principais efeitos o aumento da capacidade de proliferação, de invasão e de migração de células de glioma [19].

Para finalizar, a última categoria daqueles que mais influenciam o aparecimento de gliomas é a categoria de *readers*. Tal como o nome indica, estas proteínas têm como principal função biológica identificar e estabelecer ligações com determinadas bases de DNA [18]. Deste modo, aquelas que mais se destacam são da família da YTHDF e da YTHDC, sendo que ambas possuem importantes funcionalidades no que diz respeito ao processo de passagem de uma sequência de RNA para uma proteína propriamente dita. Consequentemente, quando se induz o *knockout* da YTHDC1, em células do glioblastoma humano (GBM), descobriu-se que a proliferação desta linha celular sofria uma diminuição drástica [18]. No que se refere à família da YTHDF, constatou-se que a YTHDF2 se encontrava em níveis muito elevados em situações de presença da patologia de glioma [18], o que fez com que houvesse uma certa mudança na capacidade de proliferação, propagação e tumorigénese das células precursoras do GBM.

De entre as diferentes famílias de genes alterados destacam-se a IGF2BP (IGF2BP 1/2/3). Este tipo de proteínas tem como principal função mediar o desenvolvimento e regular o grau de gravidade da doença, por intermédio do fortalecimento das ligações do mRNA com alguns daqueles que poderão ser os seus principais alvos biológicos, como, por exemplo, o c-Myc, Ki-67, PTEN e CD44 [19,25]. Ao longo do nosso desenvolvimento embrionário, estas proteínas vão sofrer algumas mudanças naquilo que se refere aos seus níveis no plasma, sendo que apenas a IGF2BP2 se continua a manifestar ao longo da nossa vida adulta. Assim sendo, se houver níveis de IGF2BP2 que não sejam compatíveis com aquilo que é esperado, isso poderá repercutir-se em patologia oncológica [25]. Se alguma destas proteínas for inibida, quer seja geneticamente ou quimicamente, isso contribuirá para a diminuição da capacidade proliferativa e invasiva do glioma [25]. Aliás, no que diz respeito à IGF2BP2, esta é uma interveniente que se encontra em quantidades elevadas em situações de GBM, tendo grande influência naquela que é chamada de transição epitelial-mesenquimal (EMT) das células de GBM, por intermédio da ativação das cascatas de sinalização PI3K/Akt, com recurso ao uso do IGF2 [19]. Para finalizar, a IGF2BP3 atua, principalmente, na linha de atuação PI3K/Akt, promovendo a proliferação celular, a capacidade

de invasão das células e a sua habilidade de resistir às terapias já em vigor para este tipo de patologias [19].

No entanto, existem ainda outros tipos de fatores de risco que poderão exercer alguma influência na probabilidade de desenvolvimento de glioma, nomeadamente, o comprimento do telómero dos cromossomas, que, por sua vez, tem duas funções essenciais: manter a integridade da informação genética existente e realizar a reparação de sequências de DNA que tenham sido replicadas incorretamente [22,23]. Assim, em determinado momento as células já se dividiram tantas vezes que o telómero acabará por desaparecer, levando a que já não haja uma reparação genómica, o que implica o início do processo de apoptose dessas mesmas células [23]. Em casos de doenças oncológicas, por exemplo, as células conseguem arranjar mecanismos para ultrapassar este processo de morte programada, podendo isto ser possível através da reativação da enzima telomerase, o que vai permitir uma continuação da divisão celular, contribuindo para o aumento da probabilidade de ocorrerem mutações no genoma, propiciando, desta maneira, o desenvolvimento de patologias do foro oncológico, como, por exemplo, os gliomas [22,23].

Assim, o LTL poderá ser usado, num futuro próximo, como um fator de risco que possa ajudar na prevenção e na previsão de novos casos de gliomas que possam vir a surgir [22]. Segundo Wang et al, já foi demonstrada a associação entre o aumento e a diminuição dos telómeros e o surgimento de patologias oncológicas [23]. Por conseguinte, foram obtidos resultados que afirmaram que o comprimento relativo do telómero (RTL), em casos de pessoas portadoras de gliomas, apresentava um valor relativamente maior, quando o mesmo era comparado com o grupo de controlo [22]. No entanto, com o recurso a uma regressão analítica, os autores, do estudo anteriormente referenciado, conseguiram demonstrar que, qualquer que seja a alteração no comprimento do telómero, a mesma irá provocar um aumento daquela que é a probabilidade do aparecimento de gliomas, devido ao facto de que, se houver um encurtamento no telómero, isso poderá levar a uma instabilidade do genoma, o que será capaz de levar ao desenvolvimento de um glioma [22]. Por outro lado, se houver uma reativação da enzima telomerase e consequente contínua replicação e divisão das células, isso poderá provocar um acumular das mesmas, o que potencia o surgimento dos gliomas, sendo que estes casos são mais prováveis de acontecer em pessoas com mais idade [22].

Tabela 1 – Conjunto de fatores de risco e as suas consequências

Fatores de risco	Consequências
Metilação RNA M6A	<ul style="list-style-type: none"> Em conjunto com a radiação ionizante, constituem-se como peças fundamentais no desenvolvimento e ocorrência de patologias como o glioma;
<i>Writers</i>	<ul style="list-style-type: none"> São a METTL3, METTL14 e WTAP; Segundo diferentes estudos, estas proteínas exerciam efeitos contrários, ou seja, no momento que se eliminava a METTL3, houve uma inibição das GSC, e que, quando se procedia ao knockout da METTL3 e da METTL14, isso levou a que houvesse um grande aumento de certos oncogenes; WTAP – possui capacidade de aumentar a proliferação, invasão e migração das células do glioma;
<i>Readers</i>	<ul style="list-style-type: none"> Identificar e estabelecer ligações com determinadas bases de DNA; YTHDF e YTHDC; <i>Knockout</i> provoca diminuição drástica da proliferação das células do GBM; YTHDF – níveis elevados em quadros clínicos de gliomas;
IGF2BP	<ul style="list-style-type: none"> Mediar o desenvolvimento e regular o grau de gravidade da doença; Alvos principais – c-Myc, Ki-67, PTEN e CD44; IGF2BP2/3 – níveis elevados em situações de GBM, que, por sua vez, vai promover a EMT, por intermédio da via PI3K/Akt;
Comprimento do telómero	<ul style="list-style-type: none"> Manutenção da integridade da informação genética e reparação de sequências de DNA; Telomerase – a sua reativação permite a continuação da divisão celular, aumentando a probabilidade de ocorrências de mutações no genoma, o que, por sua vez, propiciam o desenvolvimento de gliomas;

Em relação àqueles que podem ser os fatores ambientais/exteriores que consigam aumentar ou diminuir o risco de desenvolvimento de gliomas, destacando-se os seguintes:

- Suplementos vitamínicos, ou seja, já ficou demonstrado que o nível de agressividade com que os gliomas se apresentam está altamente relacionado, em parte, com certas vitaminas que a pessoa possa ou não ingerir [24], isto é, determinados tipos de suplementos vitamínicos ou o uso de substâncias fotoquímicas, com propriedades antioxidantes, podem exercer papéis protetores em relação à ocorrência deste tipo de situações, enquanto que, a existência de reações proinflamatórias e de infeções possuem um efeito completamente contrário, isto é, a sua presença vai fazer com que haja uma maior probabilidade de a pessoa vir a desenvolver um glioma, ou uma patologia deste género, podendo, ainda, este tipo de situação aumentar a força de agressividade do

mesmo. Um exemplo de uma vitamina que tem um efeito protetor em relação ao glioma é o retinol, relacionado com vitamina A, devido ao efeito inibitório da divisão, proliferação e migração das GSC [24].

- Estilo de vida e alterações na dieta são também fatores que alteram os riscos de desenvolvimento de gliomas, ou seja, a probabilidade de aparecerem situações desta patologia aumenta, se o paciente for consumidor de grandes quantidades de carne processada, fontes de sulfitos e nitritos[24].

1.3. Formas de tratamento de gliomas

O glioma é dos tumores malignos com maior incidência no SNC e, devido ao seu caráter muito agressivo, apresenta capacidade de metastização, dificultando e diminuindo a eficácia do tratamento, sendo que a média de sobrevivência é de, aproximadamente, 15 meses, devido à sua alta taxa de crescimento e de resistência às diversas quimioradioterapias [1, 30].

A diminuição da eficácia dos tratamentos deve-se principalmente à permeabilidade seletiva da BHE e a heterogeneidade deste tipo de patologias. A BHE é constituída, principalmente, por células endoteliais, vasos sanguíneos e células da glia, nomeadamente, astrócitos [26]. Devido ao facto da BHE possuir um vasto conjunto de “tight junctions”, isso irá contribuir para a razão de que a mesma seja uma estrutura altamente seletiva, o que faz com que apenas pequenas moléculas, como, por exemplo, iões e nutrientes, consigam atravessar. Ao mesmo tempo, esta seletividade da BHE vai assumir um papel crucial naquilo que diz respeito ao bloqueio à entrada de moléculas de maiores dimensões, de substâncias tóxicas, metabolitos e de resíduos resultantes de atividades metabólicas [26]. É com este mecanismo de entradas e de saídas de determinadas substâncias, que uma normal e íntegra BHE mantém uma funcionalidade ótima dos neurónios e das células em seu redor [26].

Segundo Xu et al, as terapias ou os tratamentos atualmente disponíveis, e que estão aprovados pela comunidade científica, são as seguintes: cirurgia máxima de ressecção, seguida de um conjunto de sessões de radioterapia e de quimioterapia, com recurso ao temozolomido (TMZ), num intervalo de tempo não superior a 30 dias após a realização da cirurgia [27]. Deste modo, o objetivo final da cirurgia de ressecção é retirar, dentro dos parâmetros de segurança, o máximo de tecido tumoral possível, sem prejudicar e manter as funções neurológicas normais e sem danos [28]. No entanto, existem alguns exames que devem ser feitos antes da realização da

cirurgia propriamente dita, como, por exemplo, ressonância magnética (RM), ultrassonografias, monitorização funcional e visualização, com recurso a moléculas fluorescentes, do tecido tumoral. Este conjunto de exames irá fazer com que haja uma maior compreensão daquilo que se passa e qual a melhor estratégia a adotar, o que, por sua vez, vai culminar numa redução de pós-operatório do tecido tumoral que possa ou não ter ficado [28].

Focando mais na radioterapia, a sua principal finalidade é diminuir a destruição dos neurónios ao máximo, sem que isso implique um aumento dos níveis de toxicidade no cérebro, já que, tal como o nome indica, a radioterapia implica o uso de radiação no combate contra o tumor (glioma). A recomendação é que os tratamentos de radioterapia sejam iniciados 3 a 5 semanas após a realização da cirurgia [28].

Adicionalmente, observa-se ainda a utilização de outros fármacos como, por exemplo, agentes alquilantes, cujo objetivo consiste na inibição da replicação. No entanto, estes agentes possuem alguns efeitos adversos, com diminuição da eficácia [28].

Estudos mais recentes referem terapias coadjuvantes, incluindo anticorpos monoclonais (CTLA-4 e PD-L1), inibição enzimática (indoleamina 2,3-desoxigenase) e terapia com recursos a células CAR-T, com as quais se observou um aumento da esperança média de vida e uma diminuição da capacidade proliferativa e metastática [29].

Neste sentido, este projeto tem por objetivo explorar o efeito de compostos baseados em plantas, com atividade anticancerígena previamente reportada, – silimarina e ácido cinâmico –, no metabolismo, proliferação e apoptose do glioma..

1.4. Silimarina

A silimarina, com origem na planta *Silybum marianum*, contém alguns flavonoides (silibinina, silidianina, entre outros), os quais já demonstraram influenciar a regulação do ciclo celular e na apoptose, chegando mesmo a desempenhar funções anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-metastáticas [5].

Em 2019, um estudo realizado por Kim et al conclui que a silimarina exercia um efeito inibitório nas células cancerígenas gástricas humanas, ou seja, diminuía a sua viabilidade, impedindo a sua migração para outros locais e influenciava os níveis de expressão de proteínas pró (Bax, PARP clivada) e anti-apoptóticas (Bcl-2, β -actina), aumentando e diminuindo, respetivamente [5].

Num outro estudo realizado no Irão por Gharagozloo et al em 2013, conseguiu-se chegar à conclusão de que a silimarina inibia a produção da proteína ribossomal S6 e da mTOR, sendo esta última um dos principais alvos da IL-2 que, por sua vez, está envolvida em processos de crescimento de células, após tratamentos de 72 horas com a mesma [10]. Adicionalmente, observou-se que esta substância natural exerce um papel essencial na inibição da proliferação celular, por intermédio do “congelamento” das células na fase G0/G1 do ciclo celular (após tratamento de 96 horas). O mesmo estudo permitiu comprovar a forma como este composto exercia um efeito inibitório na progressão e na proliferação das células T, em conjunto com a silibinina, através da sua indução pela estimulação de anticorpos monoclonais anti-CD3 ou mitogénicos (PHA e Con-A) [10].

A silibinina é um dos principais biocomponentes dos flavonoides da silimarina, sendo o que mais se destaca por exercer uma certa influência no tratamento de inúmeros tipos de tumores [34].

No que diz respeito ao cancro da pele, sob o tratamento com silibinina, as células de cancro epidermoide, mais especificamente da linha celular A431, viram aumentada a sua retenção em fase G2, o que, por sua vez, diminui os níveis de expressão do fator de crescimento da epiderme (EGF) [34]. Assim, concluiu-se que a silibinina, por intermédio da via de sinalização da AMPK e da eNOS, aumentou a concentração de óxido nítrico (NO), resultando na perda de função mitocondrial e, conseqüente apoptose celular [34]. Adicionalmente, a silibinina também mostrou capacidade de promover a ativação de vias pré-apoptóticas (caspases 3, 7 e 9), e induzir a produção da p53 e do citocromo c [34].

No cancro do pulmão, a silibina exerce um papel de inibição da progressão no crescimento e desenvolvimento da linha celular A549, através da supressão das vias de sinalização PI3K-Akt e MAPK, com uma conseqüente “destruição” das metaloproteinases [34]. Por outro lado, este potente biocomponente também consegue bloquear o efeito do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), no processo angiogénico tumoral [34].

No que diz respeito ao cancro dos ovários, também se observou o aumento dos níveis de expressão dos genes p53 e p21, induzidos por ação inibitória da silimarina [35].

Alguns dos mecanismos através dos quais a silimarina influencia a carcinogénese estão relacionados com o bloqueio da migração das células tumorais. Alguns exemplos deste tipo de mecanismos são os seguintes: elevação dos níveis de expressão da E-caderina, o que vai fazer com que haja uma melhor adesão célula-célula, implicando, desta maneira, uma homeostasia do

epitélio e o restabelecimento da disposição normal das células, impedindo a sua migração/metastização [38].

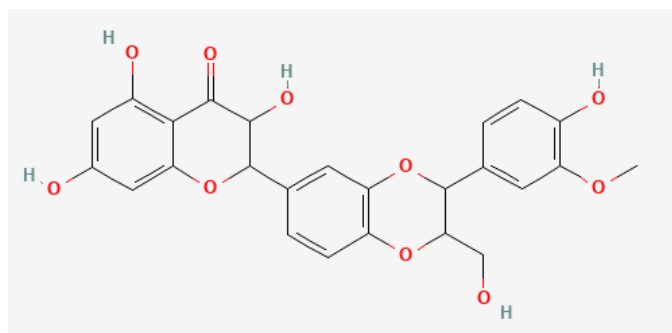


Figura 1 - Estrutura química da silimarina

1.5. Ácido cinâmico

O ácido cinâmico é um composto natural proveniente, principalmente, da planta *Cinnamomum cassia*, podendo ser encontrado em produtos como, por exemplo, café, maçãs e vinho [6].

Este ácido fenólico apresenta comprovadas propriedades farmacológicas, destacando-se a sua elevada atividade antioxidante [7]. Além disso, revela citotoxicidade, inibindo a síntese de DNA e suprimindo a ativação da via de sinalização da NF- κ B, promovendo a produção da citocina IL-8 e inibindo a histona desacetilase [31].

Segundo Akao et al, dois derivados do ácido cinâmico, o *baccharin* e a *drupanin*, conseguiram exercer uma certa atividade inibitória *in vitro*, apenas a partir de valores superiores a 30 μ M, por indução da apoptose nas linhas de células tumorais [8].

Niero et al demonstrou que o ácido cinâmico, na concentração de 3.2mM, teve a capacidade de diminuir o número de células HT-144 (células de melanoma humano) e células NGM (linha celular de melanócitos humanos derivada do nevo azul), através de mecanismos de controlo de ciclo celular e processos apoptóticos [6].

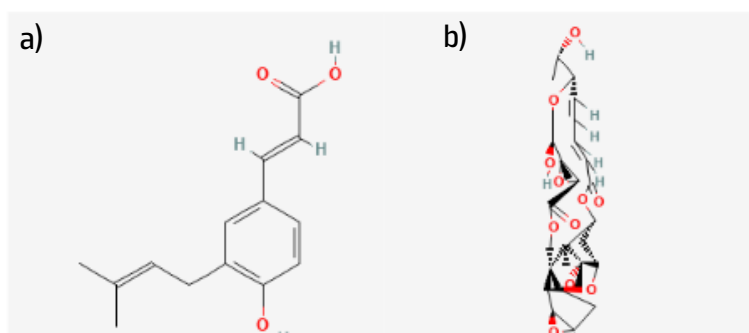


Figura 2 - Estruturas químicas da drupanin (a) e da baccharin (b)

Além disso, foi observada alteração da organização nuclear, do citoesqueleto (desorganização dos microtúbulos), em função da concentração de ácido cinâmico.

No que diz respeito ao papel do ácido cinâmico no cancro do ovário, e segundo Fan et al [33], o ácido cinâmico tem capacidade de bloquear a proliferação das células H08910 e A2780, sendo que, a concentrações de 4,6 e 8 mmol/L, houve uma diminuição do seu crescimento entre 40 a 80%. Quando tratadas com ácido cinâmico numa concentração de 12mmol/L, observou-se inibição do seu desenvolvimento e crescimento, após um período de 48h [33].

O ácido cinâmico demonstrou ainda exercer efeitos anti tumorais, quando contacto com células de melanoma, GBM, cancro do pulmão e adenocarcinoma da próstata, através da inibição e bloqueio do crescimento e desenvolvimento das células cancerígenas, bem como através da diminuição das CSC do adenocarcinoma pulmonar [32].

Deste modo, e de acordo com a literatura o ácido cinâmico interfere de algum modo nos níveis de expressão de determinadas proteínas presentes no microambiente tumoral, tais como a inibição de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e, aumento dos níveis de expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax) [32].

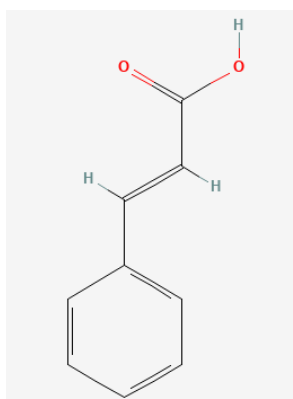


Figura 3 - Estrutura química do ácido cinâmico

Considerando a informação bibliográfica apresentada no que diz respeito à função que o ácido cinâmico e silimarina desempenham no processo de crescimento e de desenvolvimento de células tumorais, revela-se pertinente estudar a influência que as mesmas possuem em patologias ainda não estudadas, tal como é o caso dos gliomas, contribuindo para melhor compreender a sua função e mecanismos alterados, estabelecendo linhas orientadores para futuros estudos. Assim, o presente estudo pretende avaliar o efeito citotóxico e a capacidade proliferativa das células GL261 após tratamento com o ácido cinâmico e a silimarina.

2. Materiais e métodos

2.1. Modelo celular de glioma, sob ação de fitoquímicos

2.1.1. Condições de cultura

Um vial de células GL261, gentilmente cedidas pelo Doutor Bruno Costa (Faculdade de Medicina da Universidade do Minho), foi descongelado e, posteriormente, cultivadas em meio de DMEM (*high glucose*, 20% de FBS e 1% de antibiótico e antifúngico), numa incubadora PHCbi COM-170AICUVL-PA, a 37°C e a 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído aproximadamente a cada 1/2 dias, de acordo com a quantidade de detritos em suspensão.

Quando as células atingiram confluência, ou seja, ocupação de aproximadamente 90% do volume total da placa, as mesmas foram alvo de um processo de *split*, utilizando-se aproximadamente 1mL de tripsina-EDTA (Gibco™) a 0,25mmol/L, por cada 10cm³.

De acordo com o protocolo de *split* seguido, em primeiro lugar, no momento em que as células atingiram um certo grau de confluência (80-90%), às mesmas foi-lhes retirado o meio existente, sendo, de seguida, adicionado cerca de 1mL de tripsina a cada placa, de modo a que as mesmas se descolassem do fundo das mesmas, durante dois minutos. Num segundo momento, foi retirada a tripsina e introduzido mais ou menos 1mL de meio com soro em cada placa, sendo depois o conteúdo transferido para um tubo de 15mL. Tendo em conta uma razão de 1:2, as células GL261 foram divididas no dobro do número das placas inicial, de modo a que houvesse um aumento da quantidade de células em cultura, para posteriores testes. Para terminar, foram adicionados mais 4mL de meio com soro e as células foram novamente incubadas.

2.2. Efeitos da silimarina e do ácido cinâmico na viabilidade celular das células GL261

As células de glioma da linha celular GL261 foram cultivadas numa placa de 96 poços, de acordo com o esquema apresentado na figura 3, sendo que, o controlo 1 tem células e solvente dos compostos, ou seja, tem células em meio DMEM completo e polietilenoglicol 400 (PEG 400), de modo a avaliar o efeito do solvente dos compostos nas células. O controlo 2 contém apenas células em meio DMEM completo, para se verificar o crescimento normal das células. Por fim, o controlo 3 possui meio DMEM completo e PEG 400, apenas para perceber se não há nenhuma contaminação de ambos. Desta maneira, elas foram postas em contacto com 90 µL de meio DMEM sem soro e 10 µL do tratamento correspondente. As células foram, desta forma, tratadas

com ácido cinâmico a concentrações de 2×10^{-3} , 4×10^{-3} , 6×10^{-3} e 8×10^{-3} mol/L, nas linhas (horizontais) A e B, C e D, E e F, G e H, respetivamente. As concentrações dos tratamentos de silimarina foram 2×10^{-6} , 4×10^{-6} , 6×10^{-6} e 8×10^{-6} mol/L, sendo que as mesmas foram aplicadas nas linhas A e B, C e D, E e F, G e H, respetivamente.

De seguida, as células foram incubadas durante, aproximadamente, 24 horas. Após este período, as células foram observadas com recurso a um microscópio Evos XL Core.

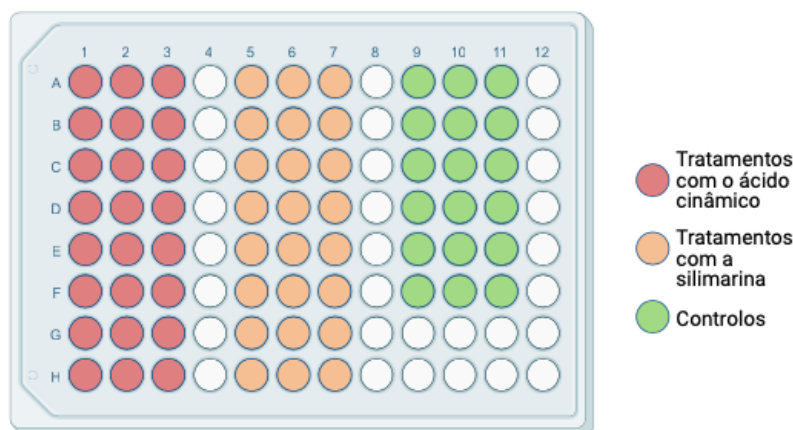


Figura 4 – Esquema que exemplifica o modo como as células da linha celular GL261 foram semeadas numa placa de 96 poços. As colunas 1, 2 e 3 correspondem aos poços que contêm as várias concentrações de ácido cinâmico. As colunas 5, 6 e 7 correspondem aos poços com o tratamento com silimarina. As colunas 9, 10 e 11 correspondem aos controlos. As linhas A a H correspondem às diferentes concentrações dos compostos utilizados no tratamento das células da linha celular GL261, sendo a c1 a concentração mais alta e a c4 a concentração mais baixa, para ambas as substâncias.

2.2.1. Ensaio da toxicidade celular: MTT

Foram realizados vários ensaios de viabilidade celular pelo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), com o principal objetivo de dar a conhecer os efeitos dos vários tratamentos de ácido cinâmico e de silimarina nas células da linha celular GL261.

Numa placa de 96 poços, às células já semeadas e tratadas com as diferentes concentrações de ácido cinâmico e de silimarina, foram adicionados cerca de $90 \mu\text{L}$ de meio DMEM sem soro e cerca de $10 \mu\text{L}$ da solução de MTT. O controlo para o solvente – PEG 400 – consistiu numa concentração intermédia (das concentrações estudadas) de polietilenoglicol 20% em PBS. De seguida, a placa foi coberta com papel de alumínio, de modo que as células fossem protegidas da luz UV, e incubada na estufa, a 37°C e 5% de CO_2 , durante, aproximadamente, 3 horas. Após esse período de tempo, a solução de MTT foi removida de todos os poços com células. Seguidamente, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de DMSO e as absorvâncias foram medidas aos 550 e aos 650 nm, de

modo a aumentar a acuidade dos resultados, com o recurso a um leitor de placas ThermoScientific Multiskan SkyHigh.

2.3. Efeitos da silimarina e do ácido cinâmico na migração das células GL261

Foram semeadas as células da linha celular GL261, de acordo com o esquema previamente usado nos ensaio de MTT, numa concentração final de células por poço de 1×10^5 células/mL, num volume final de $500 \mu\text{L}$ de meio, em placas de 24 poços, sendo que uma placa ficou para os tratamentos de silimarina, outra placa ficou para os tratamentos com ácido cinâmico e uma outra placa para os controlos celulares. As concentrações usadas foram 2×10^{-2} , 6×10^{-2} e 8×10^{-2} mol/L para o ácido cinâmico, e 2×10^{-5} , 6×10^{-5} e 8×10^{-5} mol/L para a silimarina, tal como se pode ver pela figura 5. O controlo para o solvente – polietilenoglicol 400 – consistiu numa concentração intermédia (das concentrações apresentadas na literatura) de polietilenoglicol 20% em PBS. Aquando de uma situação de confluência das células, procedeu-se a um riscado único e vertical com uma ponta de $200 \mu\text{L}$, a meio de cada poço, induzindo a “agressão”. Imediatamente a seguir, foram aplicados os tratamentos respetivos a cada poço, de acordo com o esquema da figura 4. Depois, numa ampliação de $100\times$, foram fotografados cada um dos poços nos momentos 0h, 6h e 24h. De seguida, mediu-se a distância entre as margens de células em crescimento, utilizando o programa imagej. Por fim, fez-se uma análise estatística dos dados obtidos, recorrendo ao programa informático Imagej (NIH Image, Open Source). Por fim, procedeu-se à análise estatística dos dados obtidos, recorrendo ao programa GraphPad (GraphPad Software © 10.1.2), de modo a verificar se houve diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações na “recuperação” da agressão induzida nas células tumorais, através do reestabelecimento de conexões intercelulares.

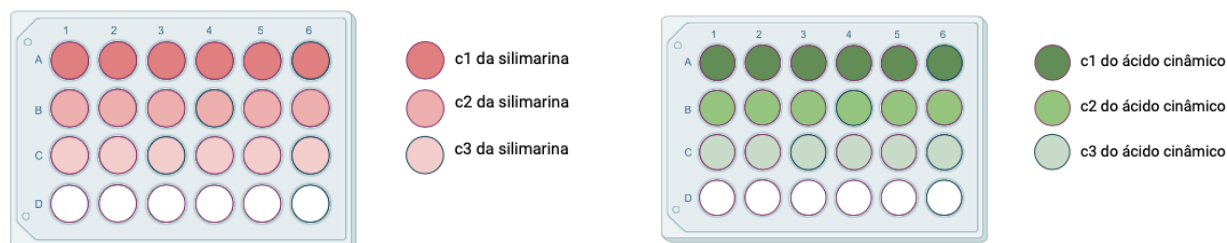


Figura 5 – Esquema das placas de 24 poços com os tratamentos de silimarina e de ácido cinâmico, a diferentes concentrações, para a realização do ensaio de migração celular

2.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos, neste estudo, são expressos e analisados segundo o seu valor médio, mais o seu erro padrão da média (SEM). As diferenças ocorridas entre os valores médios dos resultados obtidos foram alvo de testes para amostras independentes, ou seja, testes ANOVA, havendo, assim, uma análise da variância entre os valores.

Num primeiro momento, as médias das absorvâncias, resultantes da aplicação dos diferentes tratamentos e do subsequente ensaio de MTT, foram alvo de uma análise estatística, com recurso ao programa informático *SPSS Statistics*, com o objetivo de se conseguir perceber quais os resultados apresentavam diferenças significativas e passíveis de serem alvo de mais testes estatísticos. Esta análise estatística do ensaio foi efetuada por comparação entre as diferentes concentrações e os respetivos controlos, no que diz respeito aos dois compostos (ácido cinâmico e silimarina), com recurso ao teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Após a realização deste teste, verificou-se que a amostra não seguia uma normalidade, pelo que se seguiu o teste de *Kruskal-Wallis*, para amostras independentes não-paramétricas, com um $p < 0.05$, através do uso do programa *GraphPad Prism* (versão 10.2.2).

Os ensaios de migração celular foram analisados através dos valores obtidos a partir da análise das fotografias das células às 0, 12 e 24 horas, com recurso ao software *ImageJ*, sendo os mesmos apresentados em valores medianos, juntamente com os seus respetivos erro-padrão da média.

3. Resultados

3.1. Efeitos da silimarina e do ácido cinâmico na toxicidade das células GL261

De modo a avaliar os efeitos que estes compostos naturais têm nas células da linha celular GL261, foram aplicadas diferentes concentrações do ácido cinâmico e da silimarina. As células do glioma foram colocadas em placas de 96 poços, sendo que, em cada poço, foram semeadas numa concentração de 1×10^5 células/mL. De seguida, as células foram incubadas durante um período de tempo de 24 horas, juntamente com tratamentos dos compostos em estudo, em concentrações de 2×10^{-3} , 4×10^{-3} , 6×10^{-3} e 8×10^{-3} mol/L, para o ácido cinâmico, e em concentrações de 2×10^{-6} , 4×10^{-6} , 6×10^{-6} e 8×10^{-6} mol/L, para a silimarina, de acordo com o esquema da figura 4.

De forma a avaliar os efeitos do ácido cinâmico e da silimarina na toxicidade das células de glioma da linha celular GL261, diferentes concentrações destes dois compostos naturais, os resultados foram apurados, com recurso ao ensaio de MTT, através da leitura das absorvâncias e respetiva análise.

Para o ácido cinâmico, depois da realização do ensaio de MTT, a toxicidade das células GL261 foi de 55.58% para uma concentração de 2×10^{-3} mol/L, de 47.92% para 4×10^{-3} mol/L, de 49.71% para 6×10^{-3} mol/L e de 48.29% para uma concentração de 8×10^{-3} mol/L, de acordo com o gráfico apresentado na figura 6a. No que diz respeito ao ensaio, no qual se utilizaram concentrações maiores, houve um ligeiro aumento na percentagem da toxicidade celular, ou seja, a toxicidade das células foi de 64.86% para uma concentração de 2×10^{-2} mol/L, de 58.07% para 4×10^{-2} mol/L, de 56.61% para 6×10^{-2} mol/L e de 55.46% para uma concentração de 8×10^{-2} mol/L, tal como demonstra o gráfico (b) da figura 6.

Para os tratamentos com a silimarina, após a execução do ensaio de MTT, a toxicidade das células GL261 foi de 52.54% para uma concentração de 2×10^{-6} mol/L, de 56% para 4×10^{-6} mol/L, de 43.50% para 6×10^{-6} mol/L e de 49,96% para uma concentração de 8×10^{-6} mol/L. Tal como se fez para o ácido cinâmico, fez-se o mesmo para a silimarina, isto é, testou-se o efeito que concentrações superiores teriam na viabilidade celular. Deste modo, a toxicidade das células foi de 62.32% para uma concentração de 2×10^{-5} mol/L, de 52.79% para 4×10^{-5} mol/L, de 59,36% para 6×10^{-5} mol/L e de 61,54% para uma concentração de 8×10^{-5} mol/L.

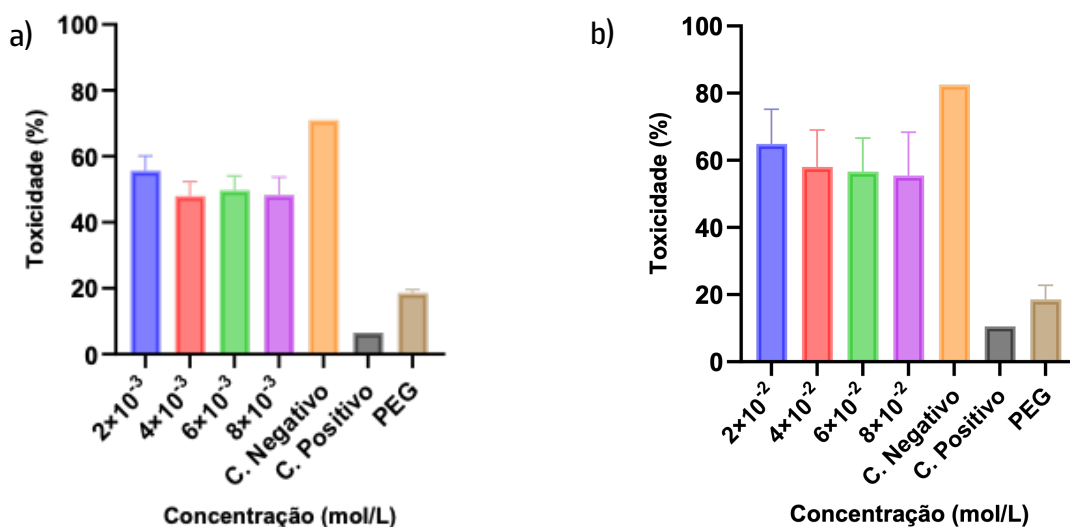


Figura 6 – Avaliação da toxicidade do ácido cinâmico em células GL261, pelo método MTT, em duas fases de teste de concentrações, sendo que o gráfico (a) é relativo à primeira fase e o gráfico (b) à segunda fase. Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, para um valor de $p < 0,05$, sendo os resultados apresentados pela média \pm SEM (erro padrão da média). Os níveis de significância foram calculados com o uso do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, sendo a significância considerada para valores de $p < 0,05$.

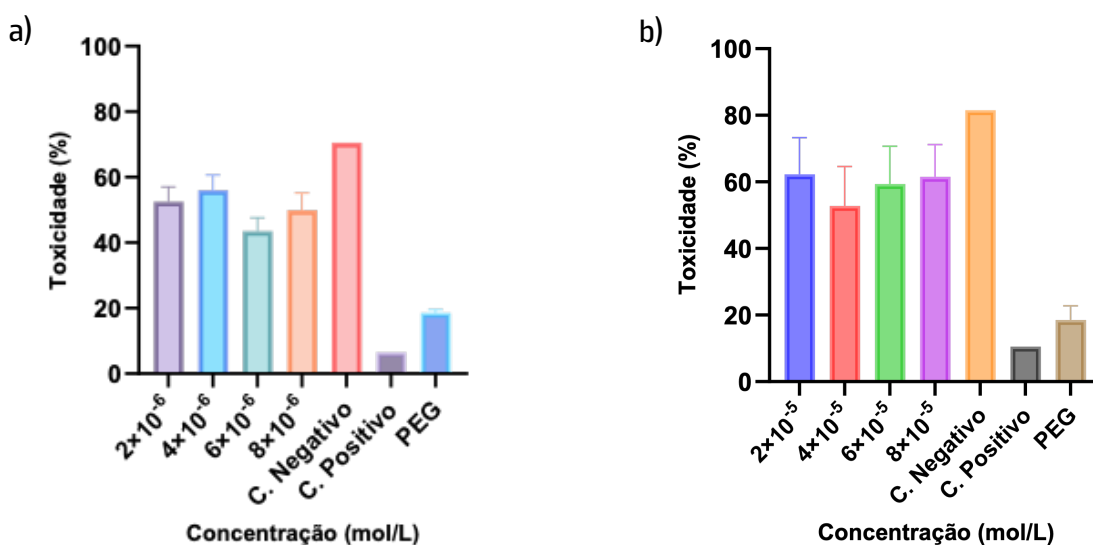


Figura 7 – Avaliação da toxicidade da silimarina em células GL261, pelo método MTT, em duas fases de teste de concentrações, sendo que o gráfico (a) é relativo à primeira fase e o gráfico (b) à segunda fase. Análise estatística com recurso ao teste de Kruskal-Wallis, para um valor de $p < 0,05$, sendo os resultados apresentados pela média \pm SEM (erro padrão da média). Os níveis de significância foram calculados com o uso do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, sendo a significância considerada para valores de $p < 0,05$.

3.2. Efeitos da silimarina e do ácido cinâmico na migração das células GL261

De modo a serem verificados os efeitos do ácido cinâmico e da silimarina na migração das células da linha celular GL261, procedeu-se a um riscado único e vertical nas células do glioma, através do uso de uma ponta da micropipeta de $200\mu\text{L}$, em cada poço da placa de 24 poços

As concentrações utilizadas foram selecionadas de acordo com as concentrações de compostos que apresentaram maiores diferenças estatísticas, ao nível do ensaio de MTT, assumindo que os tratamentos foram mais eficazes. Desta forma, as células de glioma da linha celular GL261, após a lesão, foram tratadas com ácido cinâmico a concentrações de 2×10^{-2} mol/L, 6×10^{-2} mol/L e 8×10^{-2} mol/L, sendo depois incubadas durante 24h. Durante estas 24h de incubação numa estufa, foram tiradas fotografias em intervalos de tempo muito específicos, ou seja, às 0h, 12h e 24h, de modo a ser possível estudar a evolução na migração das células do glioma até ao centro do poço. Como pode ser observado no gráfico da figura 8, a concentração 2×10^{-2} mol/L apresentou uma migração de 14.69%, a concentração 6×10^{-2} mol/L de 20.88% e a concentração 8×10^{-2} mol/L de 17.69%, permitindo considerar que a concentração de 2×10^{-2} mol/L apresenta maior eficácia do composto, diminuindo, assim, a proliferação celular após agressão física.

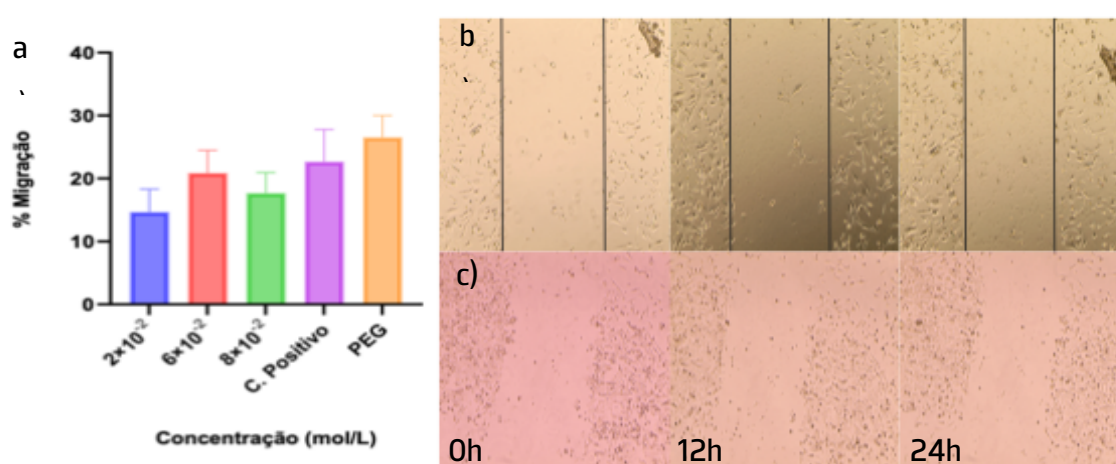


Figura 8 – Efeitos que as diferentes concentrações de ácido cinâmico tiveram na % de migração das células da linha celular GL261 (a). Exemplo das imagens que foram obtidas, quando as células foram observadas ao microscópio, com a objetiva de 10x (b), juntamente com o controlo positivo (c). Efeito do ácido cinâmico a 2×10^{-2} mol/L ao longo de 24h, sendo as fotografias tiradas às 0h, 12h e 24h.

No que diz respeito ao tratamento com a silimarina, seguiu-se o mesmo racional para a determinação das concentrações a utilizar. Desta forma, as células da linha celular GL261, após o riscado vertical, foram tratadas com a silimarina a concentrações de 2×10^{-5} mol/L, 6×10^{-5} mol/L e 8×10^{-5} mol/L, e incubadas, também, durante cerca de 24h. Também se procedeu à tiragem de fotografias nos mesmos intervalos de tempo anteriores, ou seja, às 0h, 12h e 24h. Como pode ser

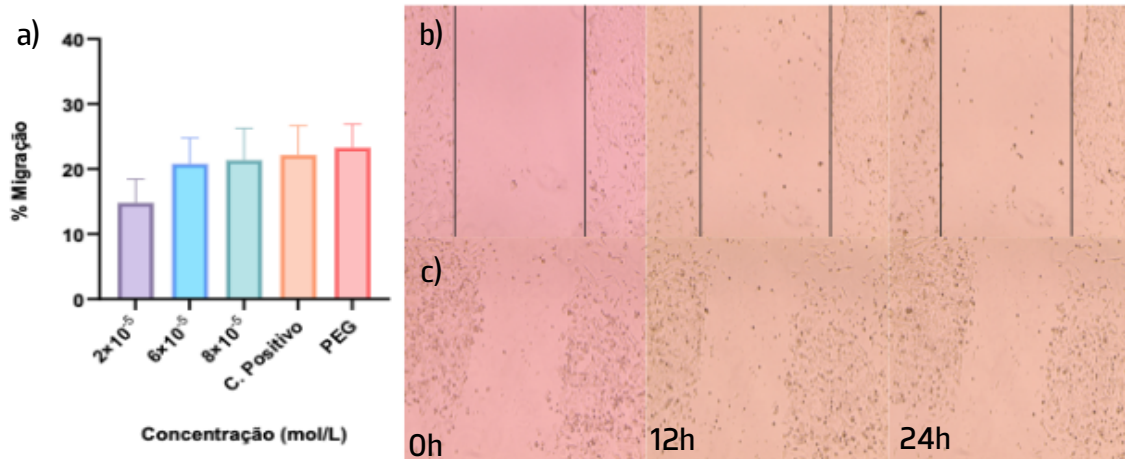


Figura 9 – Efeitos que as diferentes concentrações de silimarina tiveram na % de migração das células da linha celular GL261 (a). Exemplo das imagens que foram obtidas, quando as células foram observadas ao microscópio, com a objetiva de 10x, juntamente com o controlo positivo (c). Efeito da silimarina a 2×10^{-5} mol/L ao longo de 24h, sendo as fotografias foram tiradas às 0h, 12h e 24h (b).

observado no gráfico da figura 9, a concentração 2×10^{-5} mol/L apresentou uma migração de 14.81%, a concentração 6×10^{-5} mol/L de 20.81% e a concentração 8×10^{-5} mol/L de 21.38%, permitindo considerar que a concentração de 2×10^{-5} mol/L apresenta maior eficácia do composto, diminuindo a proliferação celular após a agressão física.

4. Discussão

O principal objetivo deste trabalho consistiu no estudo dos efeitos que os compostos naturais silimarina e ácido cinâmico desencadeiam no processo de desenvolvimento e proliferação do glioma. O estudo incidiu em ensaios *in vitro* suportado no modelo celular utilizando a linhagem GL261, permitindo uma avaliação da toxicidade dos compostos e da migração das células, mediante diferentes concentrações dos compostos, definidas com base na revisão bibliográfica de modo a esclarecer a problemática colocada. A abordagem à problemática em estudo seguiu uma metodologia fundamentada em literatura previamente publicada, considerando outro tipo de patologia oncológica.

Deste modo, e com o objetivo de avaliar a toxicidade de ambos os compostos sobre as células GL261, foram realizados, numa primeira fase, tratamentos com concentrações de ácido cinâmico de 2×10^{-3} , 4×10^{-3} , 6×10^{-3} e 8×10^{-3} mol/L e, de concentrações de silimarina de 2×10^{-6} , 4×10^{-6} , 6×10^{-6} e 8×10^{-6} mol/L, concretizando-se o ensaio 24h após o tratamento celular. Considerando que o controlo positivo, para estas primeiras concentrações testadas, ainda não manifestar efeitos de toxicidade acentuados, avançou-se para o estudo de novas concentrações superiores de cada composto utilizado. Assim, nesta segunda fase, foram realizados tratamentos de ácido cinâmico de 2×10^{-2} , 4×10^{-2} , 6×10^{-2} e 8×10^{-2} mol/L e, de concentrações de silimarina de 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 6×10^{-5} e 8×10^{-5} mol/L. Este incremento de concentração teve em consideração a sua viabilidade celular humana, considerando o equivalente de doses passíveis de serem ingeridas pelo ser humano, de modo a que seja possível transpor as concentrações celulares *in vitro* para doses *in vivo*/animal e humano em estudos futuros.

Considerando os resultados obtidos neste ensaio de toxicidade celular, os mesmos demonstraram que nem sempre se verificou uma relação linear entre o aumento das concentrações do tratamento com a silimarina e a diminuição da toxicidade celular (figura 7), isto é, nos primeiro e segundo painel de concentrações avaliadas, observou-se uma oscilação da percentagem de toxicidade, à medida que se aumentava a concentração de silimarina. Num estudo realizado por Kim et al, após tratamentos com diferentes concentrações de silimarina, verificou-se que existia um efeito inibitório dependente da concentração do tratamento na viabilidade das células AGS, isto é, a viabilidade das mesmas ia diminuindo à medida que se aumentava a concentração de silimarina [5]. Segundo o mesmo autor, este acontecimento poderia dever-se à silimarina ter tido a capacidade de bloquear a expressão de proteínas anti-

apoptóticas (Bcl-2) e promover a expressão de proteínas que estimulassem o início do processo de morte celular programada.

No que diz respeito aos tratamentos com o ácido cinâmico, e como é possível observar na figura 6b, verificou-se que, à medida que se aumentou a concentração do tratamento de ácido cinâmico, ocorreu, ainda que ligeiramente, uma diminuição dos níveis de toxicidade celular, tendo-se verificado-se uma maior percentagem de toxicidade na menor concentração de ácido cinâmico (2×10^{-2} mol/L). No entanto, Yao et al (2021) chegou à conclusão de que, à medida que se aumentava a concentração do ácido cinâmico, ocorria uma diminuição da viabilidade das células estromais primárias endometriais, ou seja, quanto maior fosse a concentração do tratamento de ácido cinâmico, maior seria a sua percentagem de toxicidade [41]. De acordo com Huang et al (2013), este biocomposto interfere em alguma extensão nos níveis de expressão de certas proteínas influentes no ciclo celular, isto é, esta substância natural consegue inibir a expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e promover a expressão de moléculas pró-apoptóticas (Bax) [32]. Niero et al refere também que este composto é capaz de provocar a desorganização dos microtúbulos presentes nas células que, por sua vez, leva à formação de aberrações nucleares e consequente morte celular [6]. Assim, a toxicidade irregular observada no modelo celular em estudo poderá dever-se a uma desorganização na matriz e citoesqueleto celulares, como também à ativação da cascata de apoptose celular, por intermédio do aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax), mitigando, assim, a proliferação celular nas concentrações menores, sendo que as concentrações superiores de composto poderão estar a beneficiar as células com as suas propriedades antioxidantes regenerativas, exercendo o efeito inverso ao expectável. Adicionalmente, sabe-se que a técnica de sementeira manual é passível de erro humano, causando diferente distribuição celular em cada poço.

O processo de migração é fundamental em vários processos biológicos e fisiológicos do corpo humano, tais como o desenvolvimento embrionário, a formação de tecidos e órgãos, processos de defesa imunitária ou de inflamação, bem como no processo de carcinogénese, tal como o presente objeto de estudo [39, 43]. Deste modo, numa segunda etapa do estudo, foram realizados ensaios de migração celular, através da utilização de tratamentos de ácido cinâmico em concentrações de 2×10^{-2} , 6×10^{-2} e 8×10^{-2} mol/L e, de concentrações de silimarina de 2×10^{-5} , 6×10^{-5} e 8×10^{-5} mol/L.

Considerando os ensaios com silimarina, verificou-se um incremento da migração das células da linha celular GL261, à medida que aumentaram os valores das concentrações, sendo

que a diferença maior foi entre 2×10^{-5} mol/L e 6×10^{-5} mol/L, como é possível observar pela análise da figura 9a. Segundo Singh et al (2016), em casos de patologias tumorais, existe alguma perda na integridade dos tecidos, devido a uma baixa expressão da E-caderina, o que provoca a transição epitelial-mesenquimal (EMT), sendo este acontecimento o principal responsável pela capacidade que os tumores possuem em migrar e invadir outros tecidos adjacentes [42]. Este estudo também reportou um restabelecimento dos níveis da E-caderina, o que, por sua vez, vai aumentar a adesão entre as células e impedir a sua migração/invasão para outros locais.

Os resultados obtidos demonstraram que, não houve uma evidente relação de dependência da migração celular em relação à concentração de ácido cinâmico, observando-se uma oscilação à medida que se ia aumentando a concentração do tratamento, ou seja, a concentração mais baixa (2×10^{-2} mol/L) apresentou uma migração de 14.69%, a de 6×10^{-2} mol/L uma migração de 20.88% e a concentração mais elevada resultou numa migração de cerca de 17.69% (figura 8a).

Por outro lado, uma das explicações que se pode atribuir ao facto de o ácido cinâmico conseguir, ainda que algo inconsistente, diminuir o processo de migração celular é que, segundo Vale et al (2022), o ácido cinâmico, através da criação de um derivado éster, provoca alterações na forma de disposição dos vários filamentos de actina, contribuindo para a diminuição considerável da migração, pois estes microfilamentos são fundamentais para o movimento das células sendo que interferem na mobilidade celular [44]. De acordo com Roger et al (2006), os principais efeitos provocados pela p53 na mobilidade das células pode ser coordenado via Rho, que, por sua vez, se encontra intimamente ligada à organização do citoesqueleto [43].

Deste modo, e tendo em conta os resultados que foram obtidos no presente estudo e aqueles que seriam esperados obter, as discrepâncias entre os mesmos podem ser justificadas pelo facto de, segundo os pressupostos das alterações da matriz, citoesqueleto e apoptose celulares, em casos de ocorrência de tumores, os mesmos não serem evidentes com tratamentos de concentrações tão baixas, o que faz com que seja possível às células tumorais contornarem estes mecanismos e o potencial efeito pró-apoptótico dos compostos, aumentando, assim, a sua atividade proliferativa e potenciando a sobrevivência e migração das células tumorais. Uma vez mais, reforça-se que, tal como nos ensaios de toxicidade, a sementeira manual em estudos de migração celular, dificultam a reprodutibilidade, impactando diretamente os resultados obtidos em ambos os tipos de ensaio.

5. Conclusão

O glioma apresenta um caráter altamente agressivo e tem a capacidade de recorrência, conseguindo metastizar, através da transição epitelial-mesenquimal. Os tratamentos para este tipo de patologias impactam significativamente a esperança média de vida para os pacientes, devido à sua elevada taxa de crescimento e de resistência aos diversos tratamentos. A cirurgia de ressecção, juntamente com radioterapias e quimioterapias encontram inúmeros obstáculos que, por sua vez, impedem o combate eficiente do glioma, tais como a impermeabilidade da barreira hematoencefálica e a heterogeneidade tumoral.

Deste modo, é imperativo explorar novas formas de tratamento que tenham a capacidade de ultrapassar estes obstáculos e potenciar melhores resultados para os pacientes. O presente estudo, no qual foram estudados os efeitos de compostos naturais como o ácido cinâmico e a silimarina, pretendeu elucidar um pouco melhor os efeitos já comprovados capacidades de regulação do ciclo celular, antioxidantes, anti-inflamatórias e opositoras à ocorrência de metástases, noutras patologias oncológicas.

Os resultados deste estudo demonstraram que o ácido cinâmico e a silimarina diminuem a viabilidade e a capacidade de migração das células da linha celular GL261, em algumas das concentrações avaliadas. Contudo, os resultados obtidos não revelaram a consistência científica desejada, carecendo de mais ensaios ao nível da expressão proteica, das cascatas de proliferação e de apoptose celulares envolvidas nestes mecanismos tumorais, e ensaios ao nível da expressão de determinados genes de interesse que estão envolvidos no processo de carcinogénese e angiogénese.

Futuramente, pretende-se explorar e aprofundar o conhecimento cujo desvelamento se iniciou com este estudo de caráter fundamental, estabelecendo um ponto de partida que, apesar das suas falhas, é essencial a próximas abordagens.

Referências Bibliográficas

- [1] Li, X., Liu, M., Zhao, J., Ren, T., Yan, X., Zhang, L., & Wang, X. (2021). Research Progress About Glioma Stem Cells in the Immune Microenvironment of Glioma. *Frontiers in pharmacology*, 12, 750857. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.750857>
- [2] Zhai, K., Siddiqui, M., Abdellatif, B., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2021). Natural Compounds in Glioblastoma Therapy: Preclinical Insights, Mechanistic Pathways, and Outlook. *Cancers*, 13(10), 2317. <https://doi.org/10.3390/cancers13102317>
- [3] Yool, A. J., & Ramesh, S. (2020). Molecular Targets for Combined Therapeutic Strategies to Limit Glioblastoma Cell Migration and Invasion. *Frontiers in pharmacology*, 11, 358. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00358>
- [4] Haar, C. P., Hebbar, P., Wallace, G. C., 4th, Das, A., Vandergrift, W. A., 3rd, Smith, J. A., Giglio, P., Patel, S. J., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2012). Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochemical research*, 37(6), 1192–1200. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0701-1>
- [5] Kim, S. H., Choo, G. S., Yoo, E. S., Woo, J. S., Han, S. H., Lee, J. H., & Jung, J. Y. (2019). Silymarin induces inhibition of growth and apoptosis through modulation of the MAPK signaling pathway in AGS human gastric cancer cells. *Oncology reports*, 42(5), 1904–1914. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7295>
- [6] Niero, E. L., & Machado-Santelli, G. M. (2013). Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 32(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-31>
- [7] Patra, K., Bose, S., Sarkar, S., Rakshit, J., Jana, S., Mukherjee, A., Roy, A., Mandal, D. P., & Bhattacharjee, S. (2012). Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. *Chemico-biological interactions*, 195(3), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.01.001>

- [8] Akao, Y., Maruyama, H., Matsumoto, K., Ohguchi, K., Nishizawa, K., Sakamoto, T., Araki, Y., Mishima, S., & Nozawa, Y. (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 26(7), 1057–1059. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1057>
- [9] Yu, L., Wei, J., & Liu, P. (2022). Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer. *Seminars in cancer biology*, 85, 69–94. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2021.06.019>
- [10] Gharagozloo, M., Javid, E. N., Rezaei, A., & Mousavizadeh, K. (2013). Silymarin inhibits cell cycle progression and mTOR activity in activated human T cells: therapeutic implications for autoimmune diseases. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 112(4), 251–256. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12032>
- [11] Wanner, M., Rohrmann, S., Korol, D., Shenglia, N., Gigineishvili, T., & Gigineishvili, D. (2020). Geographical variation in malignant and benign/borderline brain and CNS tumor incidence: a comparison between a high-income and a middle-income country. *Journal of neuro-oncology*, 149(2), 273–282. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03595-5>
- [12] Wen, J., Liu, F., Cheng, Q., Weygant, N., Liang, X., Fan, F., Li, C., Zhang, L., & Liu, Z. (2023). Applications of organoid technology to brain tumors. *CNS neuroscience & therapeutics*, 29(10), 2725–2743. <https://doi.org/10.1111/cns.14272>
- [13] Lin, S., Li, K., & Qi, L. (2023). Cancer stem cells in brain tumors: From origin to clinical implications. *MedComm*, 4(4), e341. <https://doi.org/10.1002/mco2.341>
- [14] Garcia-Fabiani, M. B., Haase, S., Comba, A., Carney, S., McClellan, B., Banerjee, K., Alghamri, M. S., Syed, F., Kadiyala, P., Nunez, F. J., Candolfi, M., Asad, A., Gonzalez, N., Aikins, M. E., Schwendeman, A., Moon, J. J., Lowenstein, P. R., & Castro, M. G. (2021). Genetic Alterations in Gliomas Remodel the Tumor Immune Microenvironment and Impact Immune-Mediated Therapies. *Frontiers in oncology*, 11, 631037. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.631037>

- [15] Fernandes, R. T., Teixeira, G. R., Mamere, E. C., Bandeira, G. A., & Mamere, A. E. (2023). The 2021 World Health Organization classification of gliomas: an imaging approach. *Radiologia brasileira*, 56(3), 157–161. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2022.0089-en>
- [16] Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(4), 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- [17] Mackay, A., Burford, A., Carvalho, D., Izquierdo, E., Fazal-Salom, J., Taylor, K. R., Bjerke, L., Clarke, M., Vinci, M., Nandhabalan, M., Temelso, S., Popov, S., Molinari, V., Raman, P., Waanders, A. J., Han, H. J., Gupta, S., Marshall, L., Zacharoulis, S., Vaidya, S., ... Jones, C. (2017). Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer cell*, 32(4), 520–537.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.017>
- [18] Tao, N., Wen, T., Li, T., Luan, L., Pan, H., & Wang, Y. (2022). Interaction between m6A methylation and noncoding RNA in glioma. *Cell death discovery*, 8(1), 283. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01075-5>
- [19] Zhang, Y., Geng, X., Li, Q., Xu, J., Tan, Y., Xiao, M., Song, J., Liu, F., Fang, C., & Wang, H. (2020). m6A modification in RNA: biogenesis, functions and roles in gliomas. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 39(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01706-8>
- [20] Liu, Z. X., Li, L. M., Sun, H. L., & Liu, S. M. (2018). Link Between m6A Modification and Cancers. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 89. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00089>
- [21] Cui, Q., Shi, H., Ye, P., Li, L., Qu, Q., Sun, G., Sun, G., Lu, Z., Huang, Y., Yang, C. G., Riggs, A. D., He, C., & Shi, Y. (2017). m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell reports*, 18(11), 2622–2634. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.059>

- [22] Wang, S., Chen, Y., Qu, F., He, S., Huang, X., Jiang, H., Jin, T., Wan, S., & Xing, J. (2014). Association between leukocyte telomere length and glioma risk: a case-control study. *Neuro-oncology*, 16(4), 505–512. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not240>
- [23] Walsh, K. M., Wiencke, J. K., Lachance, D. H., Wiemels, J. L., Molinaro, A. M., Eckel-Passow, J. E., Jenkins, R. B., & Wrensch, M. R. (2015). Telomere maintenance and the etiology of adult glioma. *Neuro-oncology*, 17(11), 1445–1452. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov082>
- [24] Kyritsis, A. P., Bondy, M. L., & Levin, V. A. (2011). Modulation of glioma risk and progression by dietary nutrients and antiinflammatory agents. *Nutrition and cancer*, 63(2), 174–184. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.523807>
- [25] Elcheva, I. A., Gowda, C. P., Bogush, D., Gornostaeva, S., Fakhardo, A., Sheth, N., Kokolus, K. M., Sharma, A., Dovat, S., Uzun, Y., Schell, T. D., & Spiegelman, V. S. (2023). IGF2BP family of RNA-binding proteins regulate innate and adaptive immune responses in cancer cells and tumor microenvironment. *Frontiers in immunology*, 14, 1224516. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1224516>
- [26] Qiu, Z., Yu, Z., Xu, T., Wang, L., Meng, N., Jin, H., & Xu, B. (2022). Novel Nano-Drug Delivery System for Brain Tumor Treatment. *Cells*, 11(23), 3761. <https://doi.org/10.3390/cells11233761>
- [27] Xu, S., Tang, L., Li, X., Fan, F., & Liu, Z. (2020). Immunotherapy for glioma: Current management and future application. *Cancer letters*, 476, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.02.002>
- [28] Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., Bendszus, M., Balana, C., Chinot, O., Dirven, L., French, P., Hegi, M. E., Jakola, A. S., Platten, M., Roth, P., Rudà, R., Short, S., Smits, M., Taphoorn, M. J. B., von Deimling, A., ... Wick, W. (2021). EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature reviews. Clinical oncology*, 18(3), 170–186. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>

[29] Zeng, J., See, A. P., Phallen, J., Jackson, C. M., Belcaid, Z., Ruzevick, J., Durham, N., Meyer, C., Harris, T. J., Albesiano, E., Pradilla, G., Ford, E., Wong, J., Hammers, H. J., Mathios, D., Tyler, B., Brem, H., Tran, P. T., Pardoll, D., Drake, C. G., ... Lim, M. (2013). Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 86(2), 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.12.025>

[30] Yasinjan, F., Xing, Y., Geng, H., Guo, R., Yang, L., Liu, Z., & Wang, H. (2023). Immunotherapy: a promising approach for glioma treatment. *Frontiers in immunology*, 14, 1255611. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1255611>

[31] HUNKE, M., MARTINEZ, W., KASHYAP, A., BOKOSKIE, T., PATTABIRAMAN, M., & CHANDRA, S. (2018). Antineoplastic Actions of Cinnamic Acids and Their Dimers in Breast Cancer Cells: A Comparative Study. *Anticancer Research*, 38(8), 4469–4474. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12749>

[32] Huang, Y., Zeng, F., Xu, L., Zhou, J., Liu, X., & Le, H. (2012). Anticancer Effects of Cinnamic Acid in Lung Adenocarcinoma Cell Line H1299-Derived Stem-Like Cells. *Oncology Research*, 20(11), 499–507. <https://doi.org/10.3727/096504013x13685487925095>

[33] Fan, R., Liang, Z., Wang, Q., Chen, S., Huang, S., Liu, J., Huang, R., Chen, J., Zhao, F., & Huang, W. (2023). Beneficial action of cinnamic acid against ovarian cancer via network pharmacology analysis and the pharmacological activity assessment. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02766-1>

[34] Akbar Boojar, M. M., Akbar Boojar, M. M., & Golmohammad, S. (2020). Overview of Silibinin anti-tumor effects. *Journal of Herbal Medicine*, 100375. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100375>

[35] Delmas, D., Xiao, J., Vejux, A., & Aires, V. (2020). Silymarin and Cancer: A Dual Strategy in Both in Chemoprevention and Chemosensitivity. *Molecules*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092009>

- [38] Koltai, T., & Fliegel, L. (2022). Role of Silymarin in Cancer Treatment: Facts, Hypotheses, and Questions. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, 27, 2515690X2110688. <https://doi.org/10.1177/2515690x211068826>
- [39] Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., Macià, A., & Panosa, A. (2019). In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(107). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00107>
- [40] Si, L., Fu, J., Liu, W., Hayashi, T., Nie, Y., Mizuno, K., Hattori, S., Fujisaki, H., Onodera, S., & Ikejima, T. (2019). Silibinin inhibits migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells through induction of mitochondrial fusion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 463(1-2), 189–201. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03640-6>
- [41] Yao, Q., Jing, G., Zhang, X., Li, M., Yao, Q., & Wang, L. (2021). Cinnamic acid inhibits cell viability, invasion, and glycolysis in primary endometrial stromal cells by suppressing NF- κ B-induced transcription of PKM2. *Bioscience Reports*. <https://doi.org/10.1042/bsr20211828>
- [42] Singh, T., Prasad, R., & Katiyar, S. K. (2016). Therapeutic intervention of silymarin on the migration of non-small cell lung cancer cells is associated with the axis of multiple molecular targets including class 1 HDACs, ZEB1 expression, and restoration of miR-203 and E-cadherin expression. *PubMed*, 6(6), 1287–1301.
- [43] Roger, L., Gadea, G., & Roux, P. (2006). Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biology of the Cell*, 98(3), 141–152. <https://doi.org/10.1042/bc20050058>
- [44] Cidrack, J., Rodrigues, M., Ferreira, M., Samira Soares Santiago, Domingues, G., Alisson Andrade Almeida, Licursi, L., Gustavo Costa Bressan, Róbson Ricardo Teixeira, & Machado-Neves, M. (2022). Synthesis of cinnamic acid ester derivatives with antiproliferative and antimetastatic activities on murine melanoma cells. 148, 112689–112689. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112689>