

**Avaliação do efeito citotóxico da nitensidina A em
células de glioblastoma multiforme e células não
tumoriais**

Luís Fernando Macedo Christovan

Araraquara/SP

2012

Avaliação do efeito citotóxico da nitensidina A em células de
glioblastoma multiforme e células não tumorais

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção
do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Aluno: Luís Fernando Macedo Christovan

Orientadora: Valeria Valente

Co-orientadora: Christiane Pienna Soares

Araraquara/SP

2012

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais José Carlos e Rita pelo apoio quanto as decisões que tomei na vida e aos meus irmãos Angelo e João pela amizade, companheirismo e pela contribuição que tiveram na minha formação.

Agradeço também as professoras Valeria e Christiane pela oportunidade e paciência que tiveram comigo, e a todos os companheiros de laboratório por toda a ajuda e boa vontade que tiveram comigo.

Agradeço ainda a República Caverna e a todos seus integrantes por todas as risadas, churrascos, pelo ano em que morei na casa, pela amizade que formamos e que continuará por toda a vida.

Sumário

1. Introdução	7
2. Desenvolvimento	10
2.1. Objetivos	10
2.2. Objetivos específicos	10
2.3. Material e Métodos	11
2.3.1. Linhagens Celulares e Cultivo Celular	11
2.3.2. Ensaio do metil-tiazol-tetrazólio (MTT)	11
2.3.3. Análise Estatística	13
2.4. Resultados e Discussão	13
3. Conclusão	21
4. Referências bibliográficas	22

Resumo

Astrocitomas difusos são o tipo de tumor cerebral primário mais comum em adultos. O glioblastoma multiforme (GBM) é o astrocitoma mais frequente e letal. Pacientes diagnosticados com GBM geralmente morrem em aproximadamente 14 meses apesar do tratamento normalmente adotado. O tratamento consiste em remoção cirúrgica do tumor, radioterapia e quimioterapia com o agente alquilante temozolomida (TMZ). Entretanto, devido a elevada resistência desse tumor à radioterapia e quimioterapia, na maioria dos casos ocorre recidiva do tumor algumas semanas após a cirurgia. Baseado nesse prognóstico pobre e na elevada resistência das células de GBM à quimioterapia, a busca por novos fármacos a fim de aumentar as chances de sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes, é de extrema importância. Nitensidina A é um alcaloide guanidínico isolado da planta típica do cerrado brasileiro *Pterogyne nitens*, que demonstrou notável efeito citotóxico em células de câncer cervical. A fim de analisar o potencial da nitensidina A como antineoplásico foram realizados ensaios de citotoxicidade desta substância e da TMZ. Os resultados mostraram que a nitensidina A apresenta efeito citotóxico em concentração muito inferior à TMZ. Os resultados também demonstram que dentre as células analisadas, a RO é a célula não tumoral mais resistente a ambas as substâncias e, dentre as células tumorais, a célula mais sensível e a mais resistente são, respectivamente, U87MG e U343MG. Estes resultados indicam que a nitensidina A tem um potencial terapêutico promissor para este tipo tumoral. Experimentos adicionais estão em andamento para investigar esta hipótese.

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura molecular da temozolomida.

Figura 2. Estrutura molecular da nitensidina A.

Figura 3. Percentual de células RO vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida.

Figura 4. Percentual de células MRC5 vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida.

Figura 5. Percentual de células T98G vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida.

Figura 6. Percentual de células U87MG vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida.

Figura 7. Percentual de células U138MG vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida.

Figura 8. Percentual de células U343MG vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida.

Lista de quadros

Quadro 1. IC₅₀ da nitensidina A e do TMZ para as diferentes linhagens celulares com leitura realizada imediatamente após 24h de tratamento.

Quadro 2. IC₅₀ da nitensidina A e do TMZ para as diferentes linhagens celulares com leitura realizada após 24h de recuperação sem nenhuma substância.

1. Introdução

O início do câncer está relacionado com o acúmulo de mutações em vias gênicas que são regidas principalmente por três classes de genes: proto-oncogenes, supressores tumorais e genes de manutenção da integridade genômica. Estes genes codificam proteínas que estão envolvidas principalmente nos mecanismos reguladores do ciclo celular, reparo de DNA e indução de morte celular por apoptose. Desse modo, essas mutações tornam as células não sensíveis a sinais de restrição de divisão celular e a estímulos que induzem a apoptose, o que favorece a atividade proliferativa das mesmas permitindo o desenvolvimento de tumores (LODISH, 2007). A estimativa de novos casos de câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para 2012 prevê que aproximadamente 2% dos novos casos de câncer no Brasil serão de sistema nervoso central (SNC). Embora seja pouco frequente, esse câncer contribui significativamente para a morbidade global (INCA, 2012).

Dentre os cânceres cerebrais, os mais frequentes são os gliomas, tumores que apresentam características histológicas que evidenciam diferenciação glial (BAI, 2011). A glia é composta por astrócitos, oligodendrócitos, células ependimais e micróglia. Estas células desempenham a função de nutrir, isolar e dar suporte aos neurônios localizados proximalmente. Dentre essas células a mais abundante no cérebro é o astrócito, que possui como principal função a regulação do conteúdo químico da matriz extracelular cerebral. Os astrócitos podem remover ativamente neurotransmissores da fenda sináptica e impedir o espalhamento desses

ao envolver a junção sináptica, além de regular a concentração iônica no ambiente extracelular (BEAR, 2007).

O glioma, quando originário de astrócitos, é chamado de astrocitoma. Os astrocitomas são classificados de I a IV quanto a agressividade – escala da “World Health Organization” (WHO). Dentre eles, o glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral mais comum e agressivo (astrocitoma de grau IV). A incidência de GBM equivale a aproximadamente 65% (WHO) de todos os casos de tumores no SNC e o prognóstico nesses casos raramente é superior a 15 meses (GRZMIL, 2010).

O tratamento de pacientes com GBM consiste em remoção cirúrgica do tumor, quando possível, associada a radioterapia e quimioterapia. Na quimioterapia, drogas intercalantes ou alquilantes de DNA e inibidores de topoisomerase1 ou 2 tem sido usadas na tentativa de tratamento do GBM, porém sem eficácia significativa (BAI, 2011). Dentre elas, a droga adotada no tratamento como fármaco de primeira escolha é a temozolomida (TMZ) (NAJMAN, 2002).

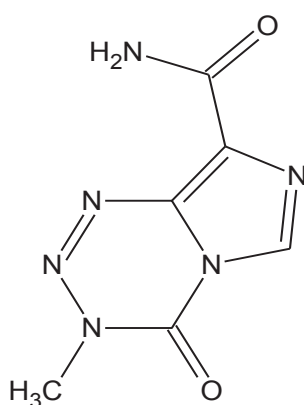


Figura 1. Estrutura química da temozolomida.

A TMZ é uma substância de baixo peso molecular derivada da imidazotetrazina, que apresenta atividade farmacológica quando é hidrolisada *in vivo* à 5-(3-metiltriazeno-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC), molécula que de fato apresenta atividade citotóxica, agindo como agente alquilante de DNA (NAJMAN, 2002).

Embora a TMZ seja o fármaco de primeira escolha no tratamento de gliomas de alto grau, a resposta dos pacientes tratados é inexpressiva, ocorrendo recorrência ou progressão do tumor e óbito de 6 a 12 meses após tratamento primário (NAJMAN, 2002). Tendo em vista a agressividade dos GBMs e a baixa eficiência dos tratamentos disponíveis, a busca por substâncias com potencial como quimioterápico que elevem a qualidade e a expectativa de vida do paciente é de grande interesse.

A qualidade de vida do paciente pode ser relacionada à seletividade do fármaco para células tumorais e ao tipo de morte por este induzida. Dentre os processos de morte celular a apoptose é o menos agressivo ao paciente (LODISH, 2007; HENRIKSSON, 2010). Uma substância com promissor efeito antineoplásico é a nitensidina A, um alcaloide guanidínico extraído da planta *Pterogyne nitens* (GUNATILAKA, 1998; REGASINI, 2008) que promove apoptose em células cancerosas.

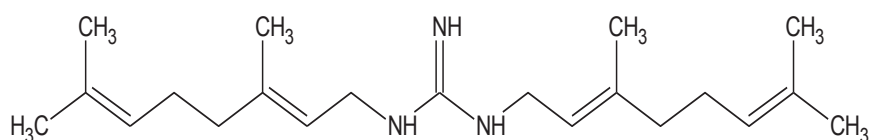


Figura 2. Estrutura química da nitensidina A.

A *Pterogyne nitens* é uma leguminosa nativa do cerrado brasileiro. A nitensidina A é encontrada nas folhas dessa planta, podendo ser extraída através do extrato de clorofórmio (GUNATILAKA, 1998) e também já foi extraída das flores da *Pterogyne nitens* (REGASINI, 2008).

Essa substância demonstrou atividade citotóxica significativa quando testada em linhagens celulares de carcinoma cervical (comunicação pessoal). Devido à morte celular causada preferencialmente por apoptose nas linhagens celulares de câncer de colo uterino foi verificada a atividade citotóxica dessa substância em linhagens celulares de GBM para investigar seu potencial como antineoplásico para esse tipo de câncer.

2. Desenvolvimento

2.1. Objetivos

Com a finalidade de avaliar o perfil citotóxico da nitensidina A, comparativamente à TMZ, foram cultivadas linhagens celulares tumorais e não tumorais para tratamento com estas substâncias e posterior realização do ensaio de brometo 3-(4,5-dimetilazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT).

2.2. Objetivo específico

Determinar o perfil citotóxico da nitensidina A e da TMZ nas linhagens RO, MRC-5, T98G, U87MG, U138MG e U343MG através do ensaio de MTT.

2.3. Material e Métodos

A nitensidina A utilizada nesse trabalho foi sintetizada no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” da cidade de Araraquara/SP pelo professor doutor Luís Octávio Regasini.

2.3.1. Linhagens Celulares e Cultivo Celular

As linhagens celulares de GBM que foram utilizadas são: T98G, U87MG, U138MG e U343MG; e as linhagens não tumorais são: os fibroblastos RO (prepúcio) e MRC-5 (pulmão). Todas foram cultivadas em DMEM e Ham's F10 1:1 (Sigma Co. St. Louis, USA) com os antibióticos: penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, 0,25µg/mL de anfotericina B, 0,2mg/mL de ciprofloxacina, 0,1 mg/mL de kanamicina (Sigma) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultlab, Campinas-SP, Brasil).

O crescimento celular foi realizado em garrafas na estufa 5% CO₂ a 37°C até que a monocamada celular estivesse confluenta. Após isso, as células foram lavadas com a solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH₂PO₄, 0,04 g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 1 g de glicose, H₂O q.s.p. 1000 mL) e posteriormente recolhidas utilizando tripsina (Solução de tripsina (0,05%) em PBS – GIBCO).

2.1.2. Ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetilazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT)

Foi realizado o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetilazo-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) que a atividade metabólica das mitocôndrias e correlacionar com a

quantidade células vivas (BUCH, 2012) após o tratamento com as substâncias nitensidina A nas concentrações de: 59,84 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 29,92 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 14,96 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 7,48 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 5,61 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 3,74 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 1,87 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 0,94 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ e 0,47 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, e a temozolomida nas concentrações de 1000 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 800 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 600 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 400 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Essas concentrações foram determinadas através de um ensaios prévios.

Foram utilizados dois tratamentos com essas substâncias: o primeiro expondo as células por 24 horas a essas substâncias e realizando a leitura imediata e o segundo expondo as células às substâncias da mesma forma por 24 horas com posterior substituição, por 24 horas, do tratamento por meio de cultura suplementado com 10% soro fetal bovino e por fim foi feita a leitura.

Para realizar a leitura o tratamento ou o meio de cultura foi removido e então foi adicionado 20 μl de uma solução de MTT 2,5 mg/ml em cada poço e posteriormente, a placa foi submetida, por 3h, às mesmas condições de cultura para que ocorresse a redução do sal. Em seguida a leitura foi feita em um leitor de placas ELISA no comprimento de onda de 540 nm.

Foram realizados três ensaios independentes para cada uma das linhagens celulares para obter dados estatisticamente significativos e a porcentagem de células vivas foi estimada pelas equações:

$$\text{Células Vivas (\%)} = [A_{540(\text{TMZ})} / A_{540(\text{CN})}] * 100$$

$$\text{Células Vivas (\%)} = [(A_{540(\text{Nit. A})} / A_{540(\text{CV})}] * 100$$

Onde $A_{540(\text{CN})}$ é a média da absorbância dos poços com células sem nenhum tratamento, $A_{540(\text{CV})}$ é a média da absorbância dos poços com células

tratadas com DMSO em concentração equivalente a quantidade presente na maior concentração de nitensidina A, e A_{540} (Nit. A) e A_{540} (TMZ) são as médias da absorbância dos poços tratados com o composto a ser analisado. Já a A_{540} (controle positivo) é a média da absorbância com a exposição das células à $1,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$ e a A_{540} (Branco) é a média da absorbância dos poços vazios. Assim, com o gráfico obtido das porcentagens de células vivas em relação às concentrações testadas foi feita a estimativa da concentração inibitória 50% (IC_{50}).

2.1.3. Análise Estatística

Os resultados obtidos do ensaio de MTT foram analisados utilizando o método *one-way ANOVA* com o pós-teste de *Tukey* com o programa *GraphPadPrism* versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). O programa fornece informações quanto a significância da diferença dos valores obtidos (“*” indica $p < 0,05$; “**” indica $p < 0,01$; “***” indica $p < 0,001$), quando comparados aos controles negativos ou de veículos (para TMZ e nitensidina A, respectivamente). Essa análise forneceu os gráficos de percentual de células vivas em função da concentração das substâncias analisadas e dos gráficos foi possível calcular o IC_{50} para as diferentes linhagens e tratamentos.

2.2. Resultados e Discussão

Na figura 3 temos os resultados de sobrevivência da linhagem não tumoral RO após tratamento com TMZ e nitensidina A, onde podemos observar que há níveis de morte significativamente maiores do que nas células controle em concentrações a partir de $800 \mu\text{M}$ e $14,96 \mu\text{M}$ para TMZ e nitensidina A,

respectivamente. Portanto, podemos notar uma menor sensibilidade das células RO às substâncias analisadas quando comparada às linhagens tumorais (Figuras 5, 6 e 7), com exceção da linhagem U437MG que apresentou níveis de sensibilidade similares ao das células RO (Figura 8).

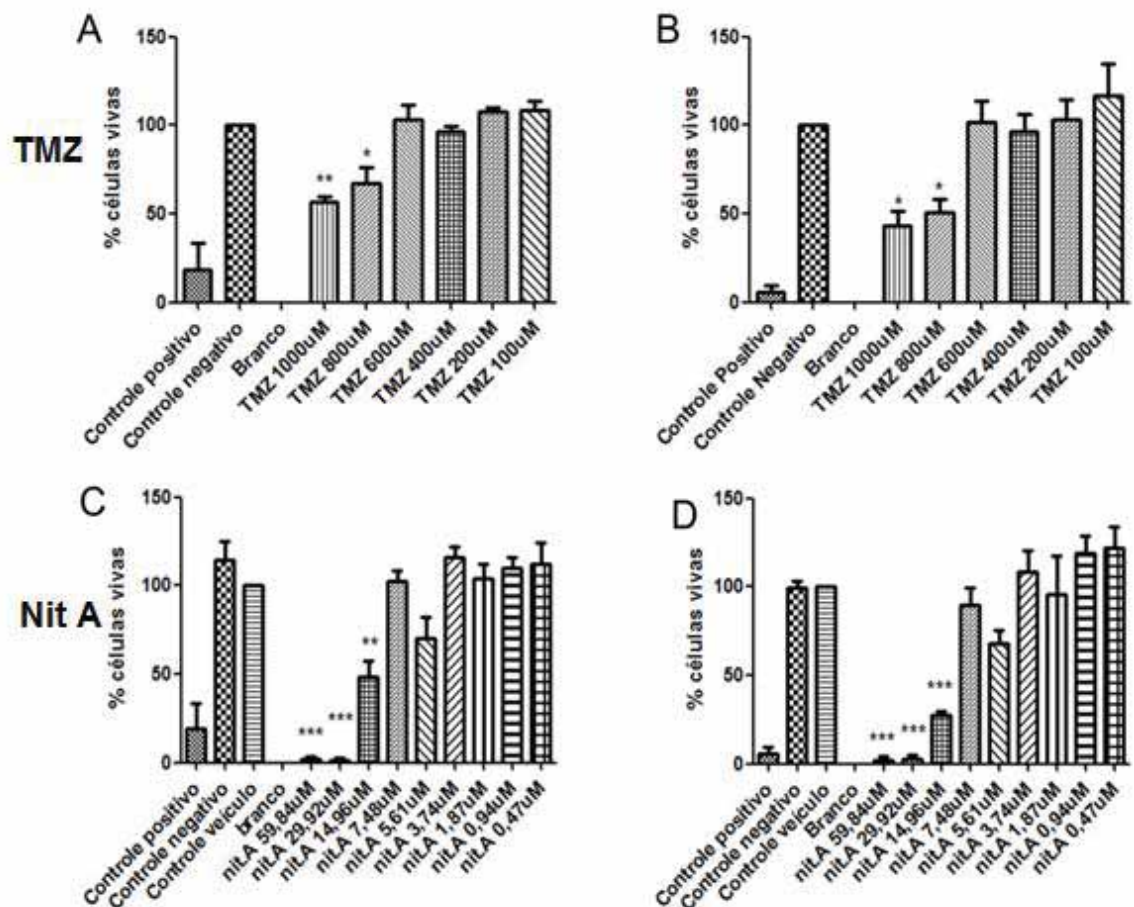


Figura 3. Percentual de células RO vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida. A linhagem RO foi tratada com TMZ e analisada imediatamente (A) ou após 24h de recuperação sem a substância (B). A linhagem RO também foi tratada com nitensidina A e analisada imediatamente (C) ou após 24h de recuperação.

Com relação as células não tumorais MRC5, observamos níveis de morte significativamente maiores do que nas células controle em concentrações a partir de

800 μM e 5,61 μM para TMZ e nitensidina A, respectivamente (Figura 4). Estas células mostram níveis de sensibilidade similares ao das células tumorais T98G, U87MG e U138MG à ambas substâncias (Figuras 5, 6 e 7). Apenas no caso das células T98G, observamos que TMZ não promove níveis significativos de morte imediatamente após 24h de tratamento, mas sim quando a leitura é realizada com 24h de recuperação (Figura 5).

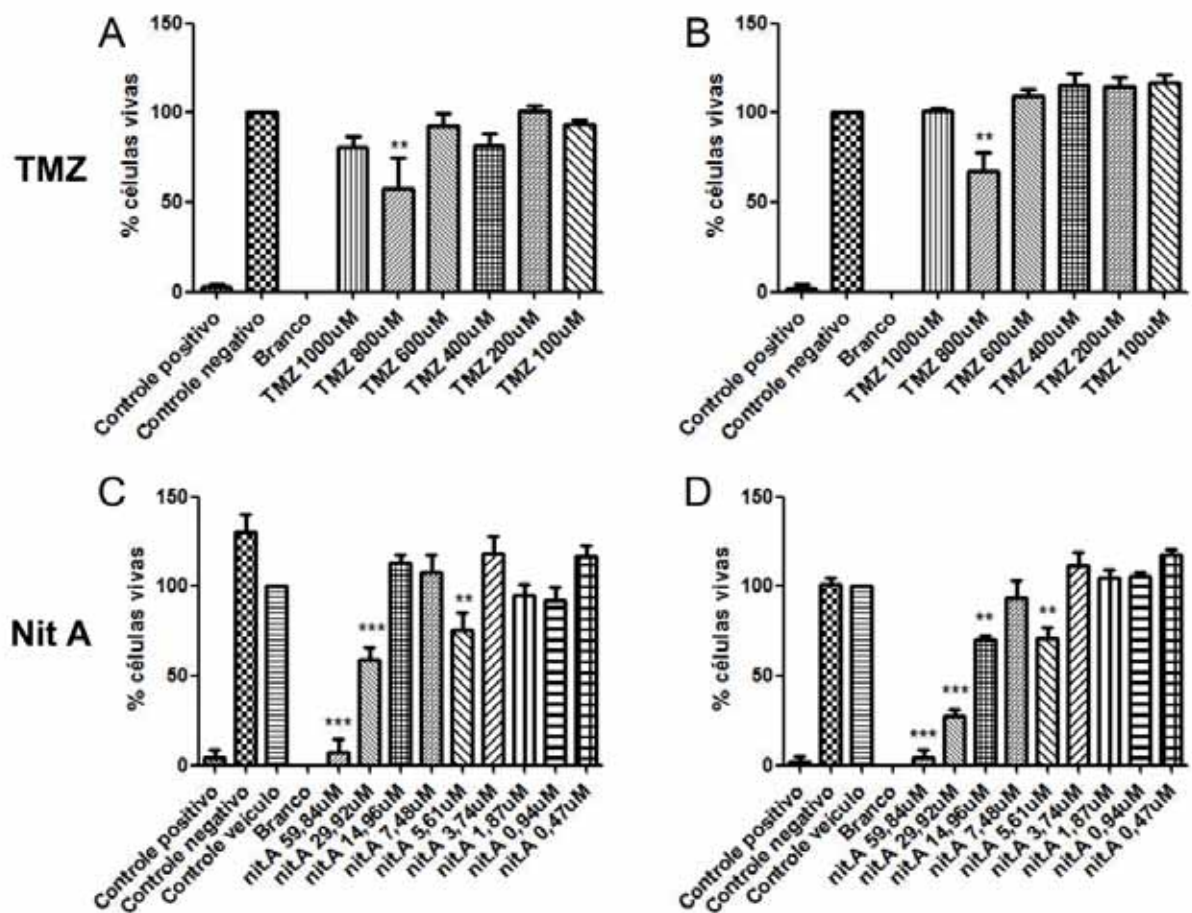


Figura 4. Percentual de células MRC5 vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida. A linhagem MRC5 foi tratada com TMZ e analisada imediatamente (A) ou após 24h de recuperação sem a substância (B). A linhagem MRC5 também foi tratada com nitensidina A e analisada imediatamente (C) ou após 24h de recuperação.

Observamos ainda que a linhagem U343MG apresentou maior resistência a ambas as substâncias testadas, pois para TMZ não foi detectada morte significativa em nenhuma concentração avaliada e para nitensidina A foi observado efeito citotóxico significativo apenas em concentrações maiores ou igual a 14,96 μM (Figura 8).

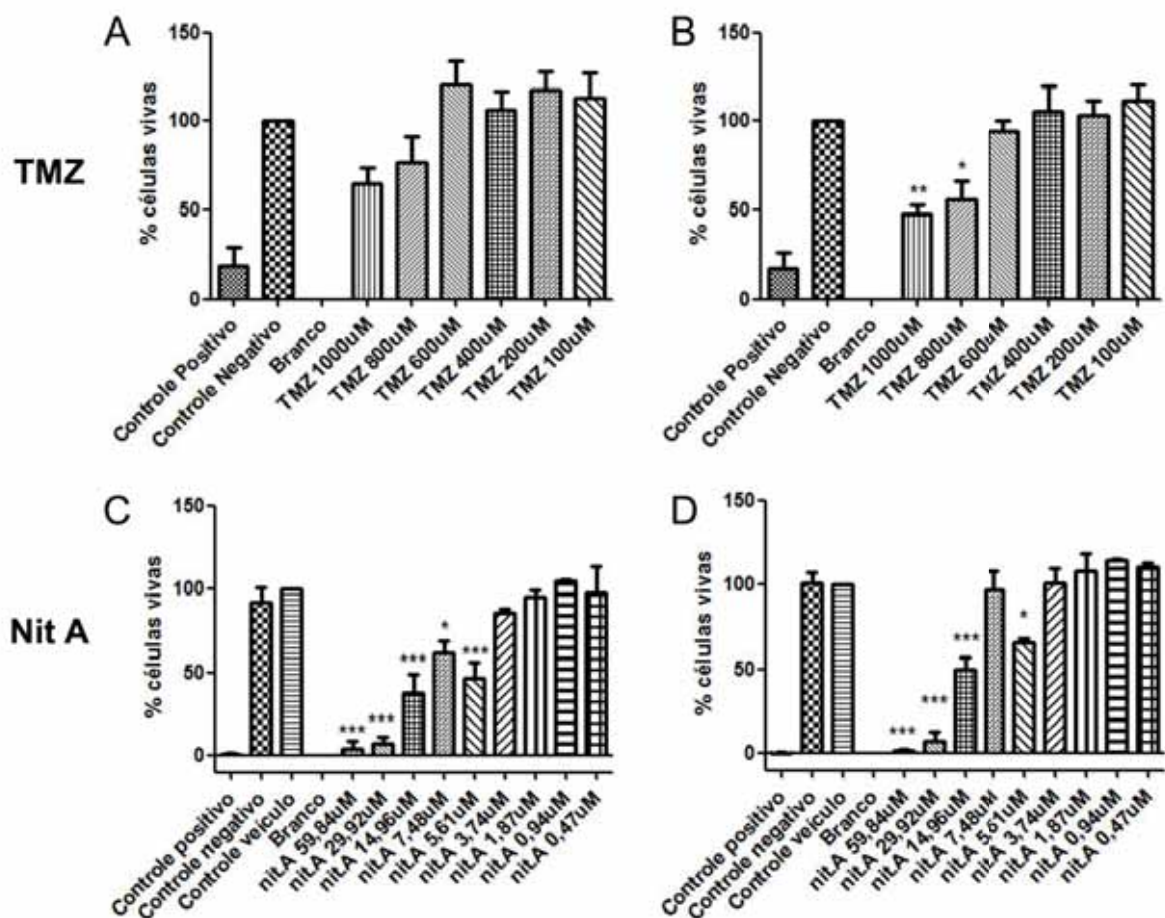


Figura 5. Percentual de células T98G vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida. A linhagem T98G foi tratada com TMZ e analisada imediatamente (A) ou após 24h de recuperação sem a substância (B). A linhagem T98G também foi tratada com nitensidina A e analisada imediatamente (C) ou após 24h de recuperação.

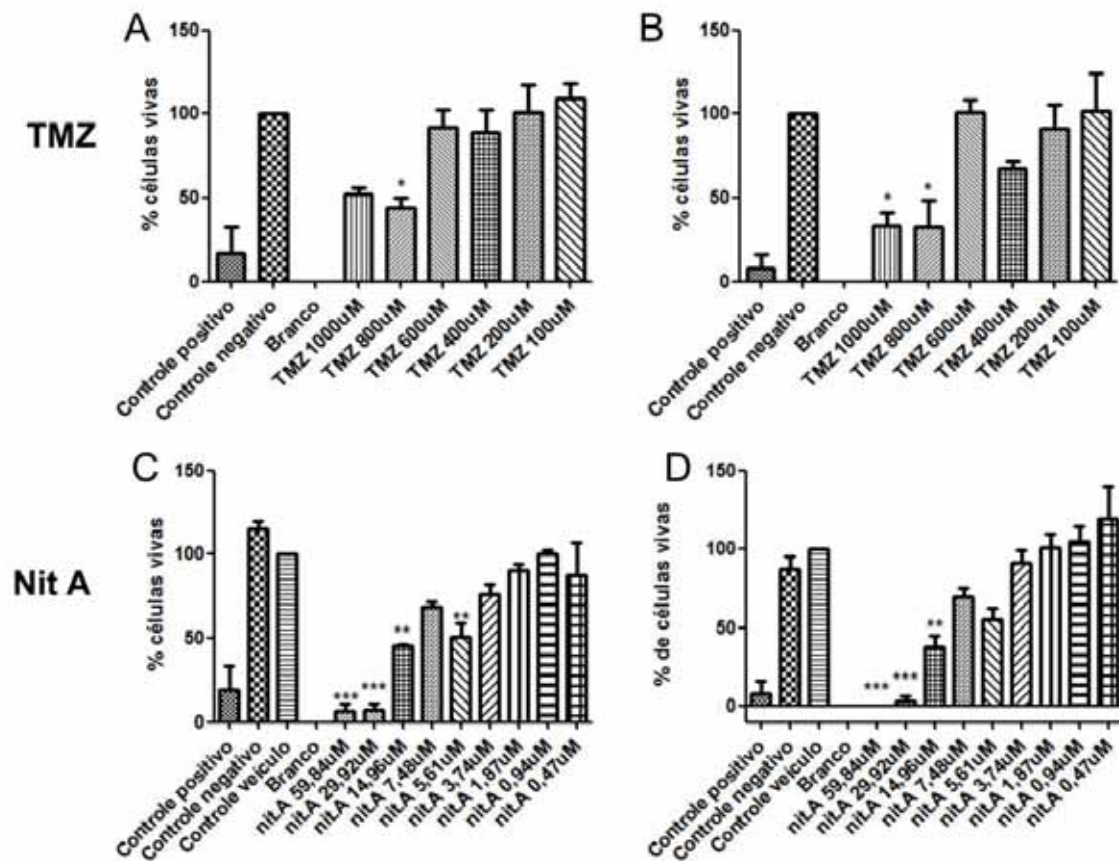


Figura 6. Percentual de células U87MG vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida. A linhagem U87MG foi tratada com TMZ e analisada imediatamente (A) ou após 24h de recuperação sem a substância (B). A linhagem U87MG também foi tratada com nitensidina A e analisada imediatamente (C) ou após 24h de recuperação.

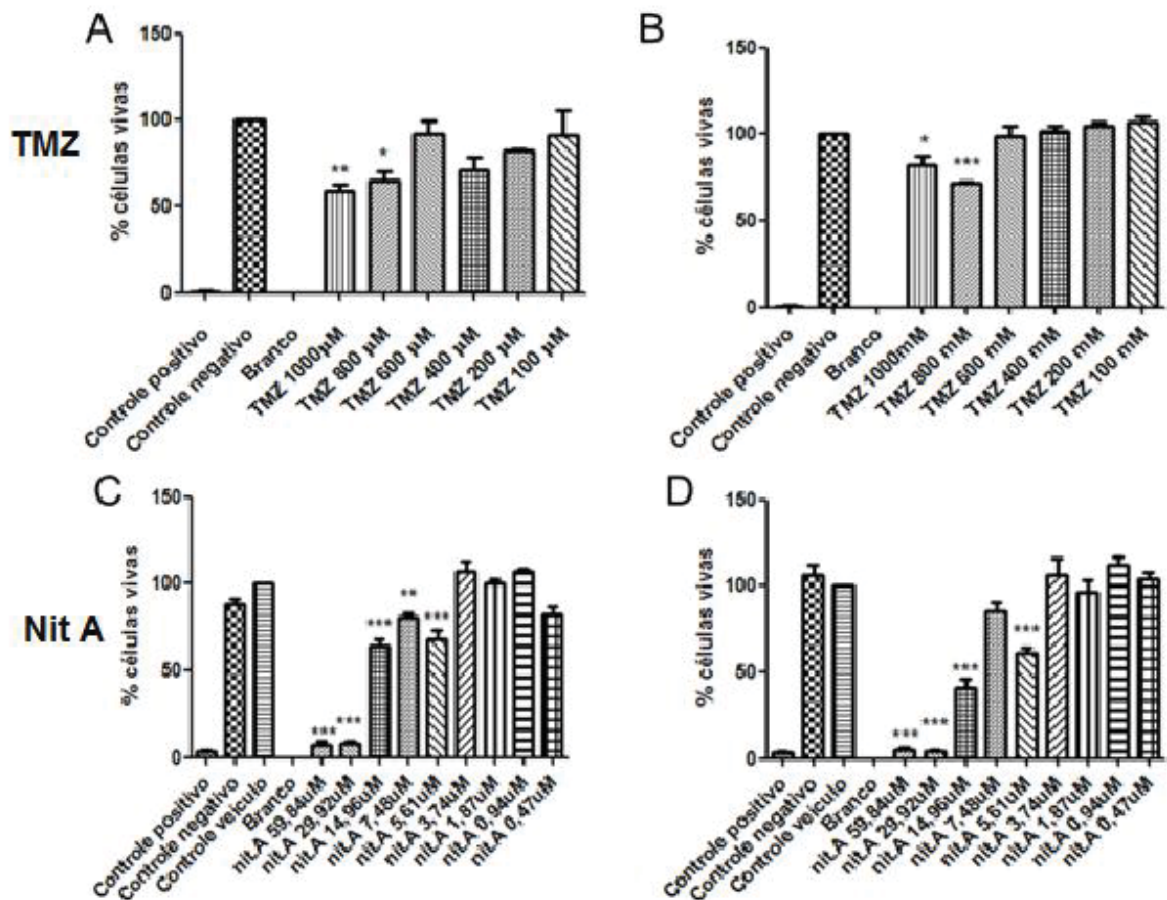


Figura 7. Percentual de células U138MG vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida. A linhagem U138MG foi tratada com TMZ e analisada imediatamente (A) ou após 24h de recuperação sem a substância (B). A linhagem U138MG também foi tratada com nitensidina A e analisada imediatamente (C) ou após 24h de recuperação.

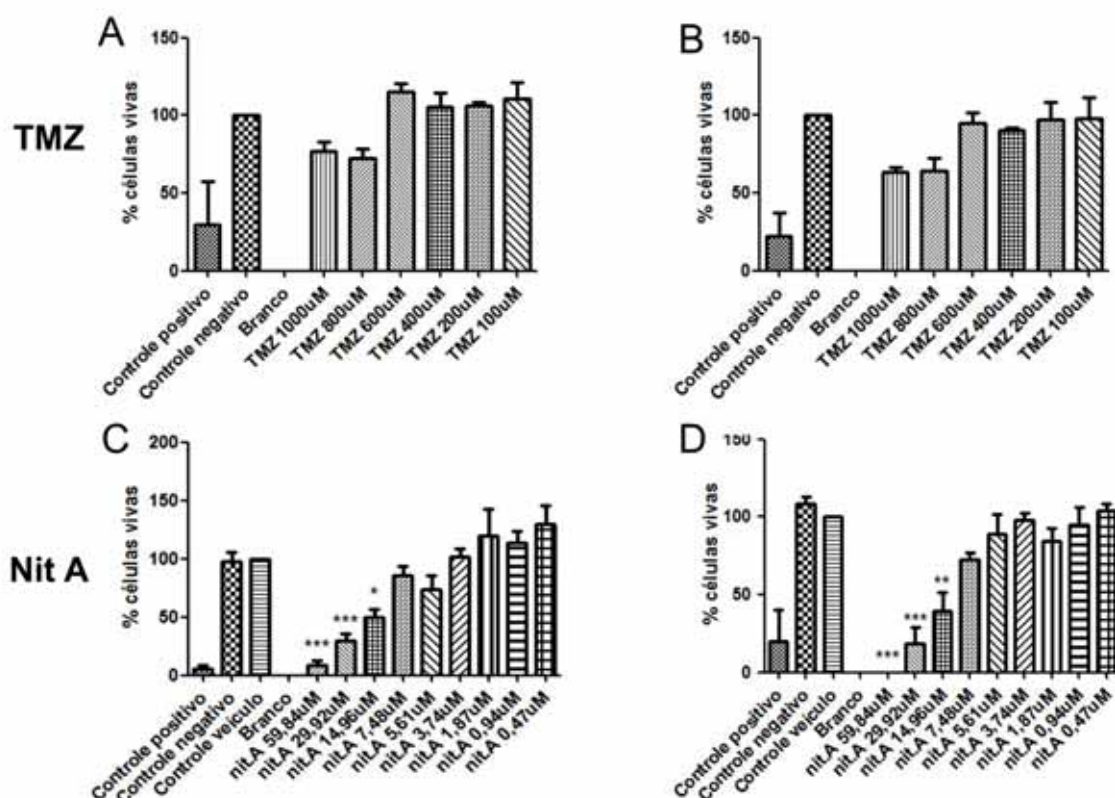


Figura 8. Percentual de células U343MG vivas após tratamento com nitensidina A ou temozolomida. A linhagem U343MG foi tratada com TMZ e analisada imediatamente (A) ou após 24h de recuperação sem a substância (B). A linhagem U343MG também foi tratada com nitensidina A e analisada imediatamente (C) ou após 24h de recuperação.

Com os resultados obtidos no ensaio de MTT foi possível calcular o IC_{50} dessas substâncias para diferentes células, com leitura imediatamente após tratamento (sem recuperação) e com 24h de recuperação (com recuperação) sem nenhuma substância (Quadros 1 e 2). Como demonstrado nos quadros, para a TMZ os valores de IC_{50} variam entre 760 a 1376 μ M, enquanto que para nitensidina A, a faixa de IC_{50} ficou entre 8 e 15 μ M. Estes dados sugerem uma eficiência cerca de 100x maior da nitensidina A em relação a TMZ. Além disso, notamos que as células U87MG parecem ser as mais sensíveis a ambas as substâncias, uma vez que os menores valores de IC_{50} foram obtidos para esta linhagem (IC_{50} -TMZ-sem recuperação = 899,23; IC_{50} -TMZ-com recuperação = 775,36; IC_{50} -nitA-sem

recuperação = 10; IC_{50} -nitA-com recuperação = 8,7); enquanto que as células U343MG parecem ser as mais resistentes (IC_{50} -TMZ-sem recuperação = 1311,72; IC_{50} -TMZ-com recuperação = 1189,62; IC_{50} -nitA-sem recuperação = 14,98; IC_{50} -nitA-com recuperação = 12,64).

Quadro 1. IC_{50} da nitensidina A e do TMZ para as diferentes linhagens celulares com leitura realizada imediatamente após o tratamento.

Linhagem	IC_{50} nitensidinaA (μ M)	IC_{50} TMZ (μ M)
MRC5	13,22 $\pm$ 0,16	760,77 $\pm$ 36,46
RO	13,74 $\pm$ 1,01	1015,17 $\pm$ 36,69
T98G	9,21 $\pm$ 2,61	1042,98 $\pm$ 101,66
U87MG	10,00 $\pm$ 1,76	899,23 $\pm$ 61,63
U138MG	15,93 $\pm$ 0,55	1113,59 $\pm$ 8,61
U343MG	14,98 $\pm$ 1,85	1311,72 $\pm$ 160,43

Quadro 2. IC_{50} da nitensidina A e do TMZ para as diferentes linhagens celulares com leitura realizada após 24h de recuperação sem nenhuma substância.

Linhagem	IC_{50} nitensidina A (μ M)	IC_{50} TMZ (μ M)
MRC5	8,4 $\pm$ 0,16	817,82 $\pm$ 14,65
RO	11,24 $\pm$ 1,34	924,78 $\pm$ 75,37
T98G	14,16 $\pm$ 1,60	925,48 $\pm$ 47,90
U87MG	8,70 $\pm$ 0,22	775,36 $\pm$ 69,96
U138MG	11,48 $\pm$ 0,24	1376,36 $\pm$ 214,88
U343MG	12,64 $\pm$ 1,94	1189,62 $\pm$ 82,02

3. Conclusão

Após analisar a sensibilidade das células RO, MRC5, T98G, U87MG, U138MG e U343MG ao tratamento com as substâncias temozolomida e nitensidina A, é possível afirmar que a nitensidina A apresenta atividade citotóxica em concentrações muito inferiores a da TMZ. Os nossos dados sugerem uma eficiência cerca de 100x maior da nitensidina A em relação a TMZ na promoção de citotoxicidade.

Com base nas porcentagens de sobrevivência e nos valores de IC_{50} obtidos, podemos ainda concluir que as células U87MG são as mais sensíveis a ambas substâncias testadas, enquanto que as células U343MG são as mais resistentes. Além disso, observamos que as células U343MG, extremamente resistentes a TMZ, são sensíveis a níveis relativamente baixos de nitensidina A. Para as células não tumorais analisadas, a linhagem RO demonstrou maior resistência que a MRC5 para a nitensidina A, enquanto que para a TMZ ambas as linhagens apresentaram sensibilidade similar.

Em conjunto, estes resultados indicam que a nitensidina A tem um potencial terapêutico promissor para o tratamento de astrocitomas. Para poder avaliar o potencial desta substância como antineoplásico mais testes deverão ser realizados, como por exemplo: avaliar o efeito genotóxico e mutagênico das substâncias (ensaio do cometa e micronúcleo) e avaliar o tipo de morte induzida pela nitensidina A e TMZ (ensaio de Anexina V – iodeto de propídeo).

4. Referências bibliográficas

BAI, R.Y.; STAEDTKE, V.; RIGGINS, G.J. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. **Trends in Molecular Medicine**, n.6, Vol. 17, p. 301-312, 2011.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A.. **Neuroscience: exploring the brain**, 3. Ed. Philadelphia :Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

BUCH, K.; PETERS, T.; NAWROTH, T.; SÄNGER, M.; SCHMIDBERGER, H.; LANGGUTH, P.. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. **Radiation Oncology** 2012 7:1.

GRZMIL, M.; HEMMING, B. A.. Deregulated signalling networks in human brain tumours . **Biochimica et Biophysica Acta** n.1804, p. 476-483, 2010.

GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I.. DNA - damaging natural products with potential anticancer activity. **Studies in Natural Products Chemistry** n.20, p. 457-505, 1998.

HENRIKSSON, R.; ASKLUND, T.; POULSEN, H.S. Impact of therapy on quality of life, neurocognitive function and their correlates in glioblastomamultiforme: a review. **Journal of Neuro-oncology** n.104, p.639-646, 2010.

Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA; Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>> Acesso em: 04 de setembro 2012.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P., ZIPURSKY, L.; DARNELL, J.. **Molecular Cell Biology**. 6. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2007.

NAJMAN, H.; GADELHA, M.I.P. Temozolamida. **Revista Brasileira de Cancerologia** n.48(3), p. 439-445, 2002.

REGASINI, L.O.; FERNANDES D.C.; CASTRO-GAMBOA I.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; CARDOSO-LOPES, E.M.; YOUNG, C.M.; TORRES, L.B.; VELLOSA, J.C.R.; OLIVEIRA, O.M.M.O.. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química Nova**, Vol. 31, n.4, p. 802-806, 2008.