

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

**Dissertação**



**FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS A PARTIR DE *Mikania hastato-cordata*:  
OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGLIOMA.**

**Kennia de Cássia Araújo Galdino**

Pelotas, 2016

Kennia de Cássia Araújo Galdino

**FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS A PARTIR DE *Mikania hastato-cordata*:  
OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGLIOMA.**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica e Bioprospecção da  
Universidade Federal de Pelotas  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
(Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Co-Orientadora: Profa. Dra. Rosélia Maria Spanevello

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

G111f Galdino, Kennia de Cássia Araújo

Fungos endofíticos isolados a partir de Mikania hastatocordata: obtenção dos extratos e avaliação da atividade antiglioma / Kennia de Cássia Araújo Galdino ; Elizandra Braganhol, orientadora ; Rosélia Maria Spanevello, coorientadora. — Pelotas, 2016.

72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Guaco. 2. Mikania. 3. Endofíticos. 4. Compostos fenólicos. 5. Glioma. I. Braganhol, Elizandra, orient. II. Spanevello, Rosélia Maria, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

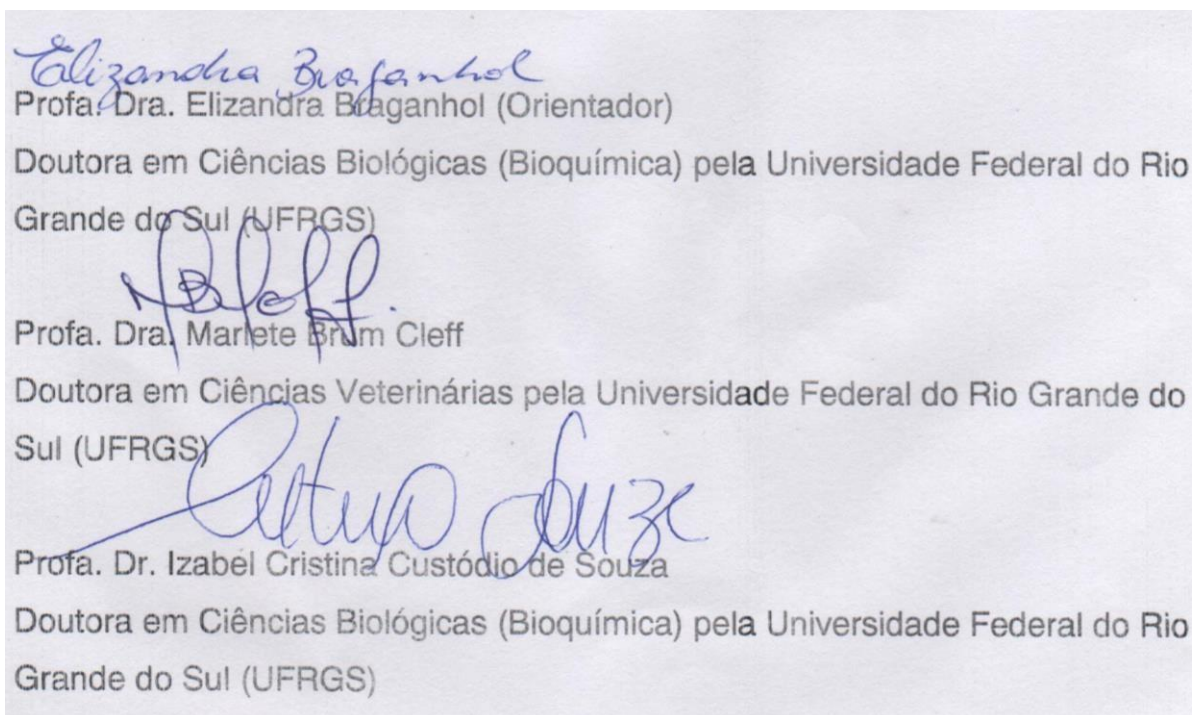
Kennia de Cássia Galdino

FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS A PARTIR DE *Mikania hastato-cordata*:  
OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGLIOMA.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 09/03/2016

Banca examinadora:



Elizandra Braganhol  
Profa. Dra. Elizandra Braganhol (Orientador)  
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dra. Mariete Brum Cleff  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Izabel Cristina Custódio de Souza  
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

**Dedico**

**Aos amigos que me ajudaram,**

**Aos professores envolvidos,**

**Às pessoas que amo.**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas, as Agências de Fomento e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, que propiciaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Taíse, Juliana, Elita, Mayara, Gabriela, Bruna, Anita e Paula, e aos de outros laboratórios, Daniel e Helene, sem os quais este trabalho não teria sido executado.

Agradeço imenso as minhas professoras Elizandra Braganhol e Rosélia Spanevello pelo apoio, dedicação e incentivo.

Agradeço aos meus colegas Carlus Augustu Tavares do Couto e Nathalia Stark Pedra pelo carinho, amizade, paciência e compreensão. As tardes e noites de trabalho ficaram mais divertidas com vocês. Sem o apoio incondicional de cada um, este trabalho não teria sido concluído.

A Nathalia, um agradecimento especial, por me apoiar nesta empreitada e dar continuidade a este, que é pra mim, um objeto de estudo sensacional.

Ao Anderson, pelo companheirismo sem precedentes. E a minha família.

*“Os homens devem moldar seu caminho. A partir do momento em que você vir o caminho em tudo o que fizer, você se tornará o caminho.”*

*Miyamoto Musashi*

## Resumo

GALDINO, Kennia de Cássia Araújo. **Fungos endofíticos isolados a partir de *Mikania hastato-cordata*: obtenção dos extratos e avaliação da atividade antiglioma.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Gliomas são tumores que apresentam características fenotípicas e gênicas similares às células gliais do SNC e são o tipo mais comum de tumor cerebral primário. O glioblastoma multiforme (GBM) é classificado como glioma de grau IV, de acordo com sua malignidade e morfologia. Pacientes diagnosticados com GBM apresentam sobrevida média de um ano. O tratamento empregado atualmente é a cirurgia, quando possível, seguido de radio/quimioterapia, com a utilização da temozolomida (TMZ). Entretanto, esses tratamentos demonstram eficácia limitada devido à capacidade desses tumores de difundir-se amplamente no parênquima normal circundante, sendo necessária a busca de novas modalidades terapêuticas capazes de inibir o desenvolvimento tumoral. Plantas que possuem determinada ação medicinal conhecida poderiam ser hospedeiras de micro-organismos endofíticos que, por sua vez, poderiam apresentar tais propriedades, pelas quais estas plantas são conhecidas. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito antiglioma dos extratos do fungo endofítico de *Mikania hastato-cordata* e determinar a presença de compostos fenólicos e o teor de flavonoides presentes nos mesmos. Para tanto, o fungo isolado de folhas sadias de *M. hastato-cordata* foi posto em meio líquido BD para a produção de biomassa fungica e de compostos do metabolismo secundário, em três diferentes tempos de cultivo 13, 20 e 27 dias. Após, cada biomassa foi filtrada e separada do seu respectivo meio de cultivo. Os solventes DCM, AcoEt e n-BuOH foram utilizados para a obtenção dos extratos do metabolismo secundário de cada um dos meios nos diferentes tempos de cultivo. O ultimo tempo da biomassa fungica foi utilizada para a extração de compostos com o uso de MeOH. Todos os extratos foram utilizados para avaliar a viabilidade celular de células de glioma C6 e cultura primária de astrócitos. Os resultados indicam que os extratos obtidos em diferentes tempos de cultivo do fungo foram capazes de inibir o crescimento da linhagem tumoral de glioma C6 de rato. Além disso, quando testadas em culturas primária de astrócitos, os extratos não demonstraram efeito citotóxico. Este efeito pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos e de flavonoides nos extratos que exibiram melhor potencial antiglioma. Assim, verifica-se que micro-organismos endofíticos isolados de *Mikania hastato-cordata*, abrigam endófitos que possuem potencial terapêutico que pode ser aplicado ao tratamento do GBM.

**Palavras- chaves:** Guaco; *Mikania*; endofíticos; compostos fenólicos; glioma; citotoxicidade.



## Abstract

GALDINO, Kennia de Cássia Araújo. Endophytic fungus isolated from *Mikania hastato-cordata*: extract preparation and antiglioma activity evaluation. 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Gliomas are tumors that exhibit phenotypic and genetic characteristics related to glial cells of the CNS, being the most common type of primary brain tumor. Glioblastoma multiforme (GBM) is classified as grade IV glioma, according to its malignancy and morphology. Patients diagnosed with GBM have one year of median survival. The currently employed treatment is surgery when possible, followed by radio/chemotherapy with temozolomide (TMZ). However, these treatments have shown limited effectiveness due to the ability of these tumors to diffuse widely in the surrounding normal parenchyma, requiring search for new therapeutic modalities capable of inhibiting tumor growth and thereby increase the survival of patients. Medicinal plants presenting certain known medicinal action could be host of endophytes, which in turn could present such properties. Thus, the objectives of this study were to evaluate the effect of antiglioma endophytic fungus extracts obtained from *Mikania hastato-cordata* and determine the presence of phenolic and flavonoid content present in the extracts. The fungus isolated from healthy leaves of *M. cordata-hastato* was put into BD liquid medium for the production of fungal biomass and production of secondary metabolites in three different culture times (13, 20 and 27 days). After this time, each biomass is filtered and separated from their respective culture media. The DCM and AcOEt solvents were used for obtaining the secondary metabolism extracts of each culture times. The last time the fungal biomass was used for the extraction of compounds using MeOH. All extracts were used to evaluate cell viability of C6 glioma cells and primary cultured astrocytes. These results indicate that the extracts obtained at different times of fungal culture were able to inhibit C6 glioma cell line growth. Furthermore, when tested in primary astrocyte cultures, the extracts showed no cytotoxic effect. This effect can be attributed to the presence of phenolic compounds obtained in two of the four extracts obtained. Thus, the results suggest that endophytic microorganisms isolated from *Mikania cordata-hastato* have therapeutic potential that can be applied to the GBM treatment.

**Key words:** Guaco; *Mikania*; endophytics; phenolic compounds; glioma; cytotoxicity.

## Lista de Figuras

- Figura 1. (A)** Folhas de *Mikania lindileyana* (Fonte: SILVA, 2011). **(B)** Florescência de *Mikania hastato-cordata* (Fonte: Arcevo pessoal) ..... 16
- Figura 2. (A)** Hifas de fungo endofítico (linhas azuis) crescendo entre os espaços celulares de seu hospedeiro (FONTE: KEMP et al., 2007). **(B)** Fungo endofítico *Hypoxyton* sp. isolado de *Mikania laevigata* (FONTE: RIBEIRO, 2011) ..... 19
- Figura 3. (A)** Estrutura básica de um composto fenólico, que pode possuir de um ou mais grupos hidroxilas ligado. **(B)** Estrutura básica de um flavonoide..... 23

## **Lista de Tabelas**

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Distribuição em subtipos do GBM baseado em suas alterações moleculares mais comuns ..... | 12 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Lista de Abreviaturas

ATCC – *American Type Culture Collection*

BCNU – Bis-cloroetilnitrosourea ou Carmustine

CCNU – 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea ou Lomustine

e-AcoEt – Extrato obtido com o solvente orgânico acetato de etila

e-DCM – Extrato obtido com o solvente orgânico dicloro-metano

EGFR – Receptor do fator de crescimento endotelial

e-n-BuOH – Extrato obtido com o solvente orgânico n-butanol

GBM – Glioblastoma Multiforme

GSCs – *glioma stem cells*

IC<sub>50</sub> – *Half maximal inhibitory concentration*

IDH1 – Isocitrato desidrogenase 1

MGMT – O6-metilguanina metiltransferase

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NF1 – Gene neurofibromatose tipo 1

OMS – Organização Mundial da Saúde

p53 – Proteína citoplasmática de peso molecular 53kDa, sintetizada pelo gene supressor tumoral

PTEN – Proteína fosfatase homóloga a tensina

PVC – tratamento combinado de procarbazine, lomustine e vincristina

TMZ – Temozolomida

TPA – *Tetradecanoylphorbol acetate*

SNC – Sistema nervoso central

## Sumário

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                                     | 8  |
| 2. Objetivos .....                                                      | 10 |
| Geral                                                                   | 10 |
| Específicos.....                                                        | 10 |
| 3. Revisão da Literatura .....                                          | 11 |
| Glioblastoma Multiforme.....                                            | 11 |
| Tratamento do GBM e o desenvolvimento de quimioresistência .....        | 14 |
| <i>Mikania hastato-cordata</i> .....                                    | 15 |
| Os micro-organismos endofíticos.....                                    | 18 |
| Potencial biológico dos fungos endofíticos.....                         | 20 |
| Micro-organismos endofíticos de espécies do gênero <i>Mikania</i> ..... | 22 |
| Compostos fenólicos e flavonoides .....                                 | 22 |
| 4. Manuscrito.....                                                      | 25 |
| 5. Conclusões .....                                                     | 57 |
| Referências .....                                                       | 58 |

## 1. Introdução

Gliomas são tumores que apresentam características gênicas e fenotípicas relacionadas às células gliais do sistema nervoso central (SNC), sendo o tipo mais comum de tumor cerebral primário. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o glioblastoma multiforme (GBM) é classificado como um tumor de grau IV, baseado em critérios morfológicos e características histopatológicas (HUSE & HOLLAND, 2010). Pacientes diagnosticados com GBM apresentam sobrevida média de um ano, e constitui-se então, na forma mais comum e devastadora de tumor cerebral (HUSE & HOLLAND, 2010; STUPP et al., 2005; 2009).

O tratamento empregado atualmente é a cirurgia, quando possível, seguido de radio- e quimioterapia, sendo a temozolomida (TMZ) o primeiro agente quimioterápico aprovado para ser utilizado no tratamento do GBM (BUTOWSKI et al., 2006). Entretanto, esses tratamentos demonstram eficácia limitada devido à capacidade desses tumores em difundir-se amplamente no parênquima normal circundante, resultando em elevadas taxas de recorrência (BUTOWSKI et al., 2006). O regime quimioterapêutico é comumente utilizado como parte do tratamento contra o GBM pode ser vantajoso por curtos períodos de tempo, a quimioterapia é eventualmente prejudicada pelo desenvolvimento de quimioresistência (OLIVA et al., 2010). Assim, a quimioresistência constitui um grande desafio e uma das principais causas da baixa taxa de sobrevida dos pacientes (PHILLIPS et al., 2006).

O gênero *Mikania* compreende as espécies vegetais popularmente conhecidas como guaco. As espécies do gênero estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo 171 de ocorrência natural no Brasil (RITTER & MIOTTO, 2005). Cumarinas, terpenos e sesquiterpenos têm sido descritos na literatura como os compostos que podem ser obtidos de diferentes espécies do gênero *Mikania* e que são responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas (RUFATTO et al., 2012; RUFATTO et al., 2013; RÍOS et al., 2014).

*M. glomerata* e *M. laevigata* são utilizadas como plantas medicinais pela população devido às suas propriedades bronco-dilatadora, expectorante, anti-

inflamatória e antialérgica (CZELUSNIAK et al., 2012; SANTANA et al., 2013). *M. laevigata* também tem sido investigada por sua atividade anti-ulcerogênica (BIGHETTI et al., 2005) e antitumoral (RUFATTO et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que micro-organismos associados às plantas podem oferecer moléculas biologicamente ativas com efeitos terapêuticos mais efetivos quando comparados às moléculas produzidas pelo metabolismo vegetal (STROBEL & LONG, 1998). Dessa forma, plantas de regiões tropicais e subtropicais podem abrigar micro-organismos com grande potencial para a obtenção de novos compostos com atividade terapêutica, sendo de maior interesse aqueles micro-organismos que estão estreitamente correlacionados com as plantas que os hospedam (STROBEL, 2003). Neste sentido, os micro-organismos endofíticos adquirem grande importância por ocuparem um nicho muito específico, os espaços inter-tecduais das plantas. Tais micro-organismos produzem uma vasta gama de compostos biologicamente ativos como, por exemplo, compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides. Estes compostos apresentam atividades antitumorais, antimicrobianas, anti-inflamatórias e outras já descritas na literatura.

Assim, considerando que o arsenal terapêutico disponível para o tratamento do GBM apresenta resultados insatisfatórios e, ainda, o potencial biológico apresentado tanto pelo gênero *Mikania* como pelos micro-organismos associados a ele, o objetivo desse estudo é isolar e identificar os fungos endofíticos presentes em *Mikania hastatocordata*, caracterizando a atividade antitumoral associada aos mesmos.



## 2. Objetivos

### Geral:

Realizar o isolamento, identificação de fungo(s) endofítico(s) obtido(s) a partir de folhas saudáveis de *Mikania hastato-cordata*, determinando o potencial antiglioma dos mesmos.

### Específicos:

- Realização do isolamento de fungos endofíticos isolados a partir de folhas saudáveis de *Mikania hastato-cordata*.
- Obtenção de extratos do micélio do fungo endofítico isolado, cultivado por 27 dias, com o solvente orgânico metanol.
- Obtenção dos extratos do meio de cultivo do fungo endofítico isolado utilizando diferentes tempos de cultivo (13, 20 e 27 dias) e solventes de polaridades distintas (dicloro metano, acetato de etila e *n*-butanol).
- Determinação da atividade citotóxica dos extratos obtidos em cultura de linhagem celular de glioma (C6) e em cultura de células análogas normais, os astrócitos.
- Determinação da presença e quantificação de compostos fenólicos e do teor de flavonóides presentes nos extratos obtidos.

### 3. Revisão da Literatura

#### **Glioblastoma Multiforme**

Os tumores cerebrais representam mais de 70% de todas as neoplasias do SNC e constituem o grupo de tumor mais frequente em adultos (HUSE & HOLLAND, 2010). Os gliomas podem apresentar características fenotípicas e moleculares de diferentes tipos celulares: astrócitos, oligodendrócitos, células ependimárias e a microglia (ZAUKE et al., 2008), e serem classificados de acordo com essa origem. Também podem ser classificados de acordo com o grau de malignidade, onde quanto maior o grau, maior a agressividade do tumor e menor é o tempo de sobrevida do paciente acometido (ref).

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor originário de células gliais, como astrócitos e oligodendrócitos, ou pode surgir a partir de células tronco tumorais presentes no sistema nervoso central (SNC) (LIEBELT et al., 2016; LATHIA et al., 2015). Tal tumor é caracterizado por uma população heterogênea de células, altamente infiltrativa, angiogênica e resistente a quimioterapia (SOEDA et al., 2015; RAMIREZ et al., 2013; HAAR et al., 2012). Segundo a OMS, o GBM é classificado como glioma de grau IV, de acordo com sua malignidade e com as características morfológicas as quais incluem extensas áreas de necrose, paliçada periférica, hiperplasia microvascular visível, além de pleomorfismo celular (HAAR et al., 2012; SANAI, 2005). Devido a essas características, o GBM é um tumor fatal e pacientes acometidos por ele apresentam sobrevida média de apenas um ano (HUSE & HOLLAND, 2010; STUPP et al., 2005; 2009).

O GBM pode ainda ser classificado em primário ou secundário. GBM primário ocorre sem evidência de um precursor menos maligno, enquanto GBM secundário se desenvolve a partir de um astrocitoma difuso, inicialmente de baixo grau (WHO grau II), ou de um astrocitoma anaplásico (WHO grau III) (WILSON et al., 2014). Além disso, o GBM secundário é associado a um melhor prognóstico quando comparado com o GBM primário (WILSON et al., 2014).

Embora o GBM apresente grande heterogeneidade celular, uma distribuição em subtipos é possível, baseado no perfil de alterações genéticas, como pode ser visualizado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Distribuição em subtipos do GBM baseado em suas alterações moleculares mais comuns.

| Glioblastoma multiforme |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Clássico</i>         | <p>Apresenta forte expressão de padrão de genes vistos em astrócitos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Superexpressão de EGFR</li> <li>• Perda do cromossomo 10</li> <li>• Mutações: TP53; NF1 e IDH1</li> </ul>                                                                 |
| <i>Mesenquimal</i>      | <p>Apresenta perfil de expressão comum a astrócitos, em adição, expressão de marcadores mesenquimais bem como de microglia</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alterações do gene NF1</li> <li>• Deleção de PTEN → alterações na sinalização intracelular PI3K/AKT/mTOR</li> </ul> |
| <i>Neural</i>           | <p>Apresenta perfil de expressão de genes observados em neurônios; expressa marcadores para astrócitos e oligodendrócitos</p>                                                                                                                                                               |
| <i>Pro-neural</i>       | <p>Apresenta perfil de expressão de genes pro-neuriais, bem como perfil de expressão observados em oligodendrócitos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alterações em TP53, PDGFR e IDH1.</li> </ul>                                                                               |

Fonte: Adaptado de WILSON et al., 2014.

Acredita-se que as células neurais estaminais e células progenitoras gliais, presentes no SNC são passíveis de uma transformação maligna a qual pode ser a base para o surgimento de tumores cerebrais (SANAÍ, 2005). As células-tronco tumorais (ou *cancer stem cells*) compartilham com muitos tumores cerebrais as mesmas vias de sinalização, incluindo vias de controle de proliferação e de migração celular (REYA et al., 2001). Além disso, as células tronco tumorais apresentam toda a maquinaria celular ativada, tais como genes pró-mitóticos, atividade da telomerase e genes antiapoptóticos, que são, então, necessários para a iniciação tumoral,

progressão, ou ambos (SANAI, 2005). Tais células também podem ser as responsáveis pela heterogeneidade celular apresentada pelo GBM (SANAI, 2005).

Além dos tipos celulares acima citados, também uma célula diferenciada, como neurônios, células gliais ou células precursoras de oligodendrócitos, podem ser alvo de alterações genéticas que iniciam o processo de gliomagenese, através de um processo de desdiferenciação (FRIEDMANN-MORVINSKI et al., 2012). Friedmann-Morvinski e colaboradores (2012) observaram que o silenciamento dos genes NF1 (neurofibromatose tipo 1 – mutado em 18% dos GBMs) e do p53 (mutado em mais de 35% dos GBMs) em células diferenciadas resulta na formação de gliomas de alto grau de malignidade. Tais células transformadas em cultura apresentam características de células iniciadora tumorais (FRIEDMANN-MORVINSKI et al., 2012).

Além das alterações em vias que controlam a proliferação, morte e diferenciação das células tumorais, achados recentes tem mostrado que a presença de um microambiente favorável é elemento essencial para a progressão do câncer (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011). De fato, o microambiente tumoral contém uma variedade de células não transformadas, como as células imunes e estromais, que podem contribuir para o crescimento e a manutenção do tumor (QUAIL & JOYCE, 2013). Assim, a manutenção do ambiente inflamatório, através de citocinas, quimiocinas ou de pequenas proteínas inflamatórias originárias tanto das células tumorais ou não tumorais podem favorecer o crescimento, a invasão, a angiogênese e a extensão metastática (DIAKOS et al., 2014).

As citocinas inflamatórias têm um papel chave na progressão tumoral, podendo promover mielopoiese e contribuir parcialmente com o bloqueio da maturação celular mielóide (DIAKOS et al., 2014). Além disso, diversos estudos apontam que o microambiente tumoral altera as células mielóides e pode convertê-las em potentes células imunes supressoras (GABRILOVICH et al., 2013). Assim, os fatores solúveis derivados do tumor iniciam vias imunossupressivas e após, promovem a diferenciação de células mielóides, em macrófagos imunossupressivos e células dendríticas (DIAKOS et al., 2014). As citocinas necessárias ao crescimento tumoral e invasão também alteram o recrutamento e o fenótipo das células do infiltrado imune, onde esta subversão das funções do sistema imune, em geral, beneficia o tumor (SICA & MANTOVANI, 2012).

## Tratamento do GBM e o desenvolvimento de quimioresistência

A ressecção cirúrgica do tumor seguido de radio- e/ou quimioterapia ainda representa a melhor alternativa para tratamento do GBM. Porém, a ressecção cirúrgica (total ou parcial) do tumor pode ser contraindicada em casos de grande comprometimento cerebral ou cognitivo. Além disso, tal estratégia pode não apresentar um resultado satisfatório (WILSON et al., 2014) devido à extensiva infiltração de células formadoras de gliomas ou GSCs (do inglês *glioma stem cells*) no tecido cerebral circundante, prevenindo assim a remoção destas células tumorais (SOEDA et al., 2015; BAO et al., 2006).

Até meados de 2004, os tratamentos eram baseados no uso de quimioterápicos como CCNU (1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea ou Lomustine), BCNU (bis-cloroetilnitrosourea ou Carmustine) e PVC (que se constitui em um tratamento combinado de procarbazine, lomustine e vincristina) (RAMIREZ et al., 2013; HOTTINGER, 2012). A quimioterapia desempenha um papel secundário no tratamento do GBM, pois em geral, os quimioterápicos não funcionam muito bem e são altamente tóxicos, além de não atravessarem a barreira hemato-encefálica (HOTTINGER, 2012; KREISL, 2009).

A temozolomida (TMZ), um fármaco alquilante capaz de cruzar a barreira hematoencefálica (RAMIREZ et al., 2013), é atualmente o agente quimioterápico utilizado no tratamento do GBM. Com o emprego da TMZ, o tratamento tornou-se mais efetivo, com um perfil de toxicidade mais favorável, permitindo uma exposição ao tratamento mais intensa e prolongada (HOTTINGER, 2012). A TMZ atua através da metilação da posição O6 da guanina. Nas células que não tem mais a capacidade de reparo do DNA, a guanina modificada forma par com a timina durante a replicação, ativando a via de “*mismatch repair*”, o que acaba resultando em quebra da dupla fita de DNA e ativação dos mecanismos de apoptose (RAMIREZ et al., 2013).

O mecanismo de resistência à ação da TMZ mais estudado se dá através da atuação da proteína de reparo do DNA, O6-metilguanina metiltransferase ou MGMT (RAMIREZ et al., 2013). Esta proteína permite a remoção do grupo metil adicionado pelo agente alquilante ao DNA, impedido a ativação dos mecanismos de apoptose. Assim, pacientes que a expressão de MGMT encontra-se reduzida, apresentam uma maior taxa de sobrevida ao tratamento com radioterapia e TMZ (RAMIREZ et al., 2013).

Além dos mecanismos de resistência ao TMZ acima citados, muitos pacientes apresentam recorrência após a ressecção cirúrgica em combinação com a TMZ. Isto pode ser parcialmente atribuído à natureza altamente infiltrativa deste de tumor, pois uma ressecção cirúrgica completa torna-se impossível de ser realizada (WILSON et al., 2014; RAMIREZ et al., 2013).

Neste sentido, a busca por novos medicamentos, mais eficazes e com menor toxicidade torna-se de grande importância. Assim, os micro-organismos endofíticos isolados de plantas medicinais, representam uma fonte promissora para busca de moléculas com propriedades antitumorais que possam interferir no crescimento, resistência ou diferenciação das células tumorais, proporcionando alternativas aos pacientes.

### ***Mikania hastato-cordata***

No Brasil, o gênero *Mikania* conta com cerca de 170 espécies que estão distribuídas desde o nordeste do país (RITTER & MIOTTO, 2005) ao sul do estado do Rio Grande do Sul e são popularmente conhecidas como “guaco” (CZELUSNIAK, 2012). Esse gênero também pode ser encontrado na Ásia, África, América do Norte (RUFATTO et al., 2012) e em países da América Central, como por exemplo, o México (RÍOS et al., 2014; PÉREZ-AMADOR et al., 2010). O gênero compreende plantas perenes, volúveis, decumbentes ou eretas (RITTER & MIOTTO, 2005), de flores brancas, como pode ser observado na **Figura 1**, e que cresce espontaneamente em matas primárias, capoeiras, capoeirões, orla de matas, terrenos de aluvião e várzeas sujeitas a inundações (CZELUSNIAK, 2012).



**Figura 1. (A)** Folhas de *Mikania lindleyana* (Fonte: SILVA, 2011). **(B)** Florescência de *Mikania hastato-cordata* (Fonte: Arcevo pessoal).

As espécies do gênero *Mikania* são utilizadas pela população devido as suas propriedades analgésicas (SILVA, 2011), broncodilatadoras, expectorante, anti-inflamatória e antialérgica (CZELUSNIAK et al., 2012; SANTANA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014), tendo algumas, atividade anti-nociceptiva comprovadas (SILVA, 2011). As folhas destas plantas são utilizadas no preparo de infusões para o tratamento de diversas doenças e, com o intuito de validar tais aplicações, diversas investigações têm sido conduzidas (ref).

Estudos indicam que a administração da fração rica em alcaloides obtidos do extrato etanólico de folhas de *Mikania cordata* exibiu, *in vivo*, atividade antiulcerogênica significativa em erosões gástricas induzidas por diclofenaco sódico em ratos Long Evans (PAUL et al., 2000). Além disso, a atividade anti-nociceptiva do extrato etanólico de folhas de *Mikania cordata* foi avaliada em modelo de indução de dor abdominal por aplicação de ácido acético em camundongos (NAYEEM et al., 2011). Neste estudo, observou-se que a administração de 125 mg/kg e de 250 mg/kg do extrato etanólico bruto reduziu as contorções em 81% e 96%, respectivamente.

Em *Mikania micrantha*, extratos de folhas e hastes frescas, e de sementes e inflorescências, ambos obtidos com os solventes hexano e acetato de etila, exibiram significativa atividade anti-inflamatória em modelo animal de edema de orelha induzido por TPA (*tetradecanoylphorbol acetate*) em camundongos. O extrato metanólico não exibiu atividade significativa (PÉREZ-AMADOR et al., 2010). O estudo também demonstrou que os três diferentes extratos obtidos de diferentes partes da planta foram

capazes de inibir o crescimento das bactérias *Escherichia coli* (ATCC-6051) e *Bacillus subtilis* (ATCC-6633) (PÉREZ-AMADOR et al., 2010).

Nove diferentes sesquiterpeno-lactonas obtidas de folhas de *Mikania micrantha* e *Mikania cordifolia* também foram avaliadas quanto à atividade anti-inflamatória em modelo animal de edema de orelha induzido por TPA em camundongos (RÍOS et al., 2014). Os compostos nomeados 9, 10, 11 e 12 (micrantolidas) exibiram melhor atividade anti-inflamatória, com percentual de inibição que variou entre 35-40%. O fármaco antiinflamatório indometacina foi utilizado como controle positivo, apresentando 84% de inibição do edema.

Ahmed e colaboradores (2001) avaliaram o extrato bruto e diferentes sesquiterpeno dilactonas isoladas de *Mikania cordata* em modelo de dor induzido por ácido acético em camundongos Swiss. O estudo indicou que o extrato bruto e uma nova molécula obtida de *Mikania cordata*, o deoximicanolídeo, foram capazes de reduzir em torno de 65% as contorções induzidas em camundongos por ácido acético. Assim, *Mikania cordata* apresentou um efeito analgésico significativo que pode ser devido à presença de deoximicanolídeo (AHMED et al., 2001).

Extratos obtidos a partir de folhas de *Mikania laevigata* com os solventes orgânicos hexano e etanol exibiram atividade citotóxica seletiva quando testados em linhagens celulares tumorais de câncer de colo uterino (HeLa), derivada de HeLa (Hep2) e em linhagem de fibroblastos (MCR-5) (RUFATTO et al., 2013). Entretanto, apesar de não apresentarem atividade citotóxica seletiva, os extratos obtidos com os solventes orgânicos acetato de etila e clorofórmio exibiram maior efeito citotóxico em linhagem celular Hep2. Os autores deste estudo apontam que a seletividade citotóxica apresentada pelos extratos de folhas com etanol e hexano pode ser devido a grande presença de compostos fenólicos observada no primeiro, e pela associação com a molécula de cumarina, encontradas no segundo.

Ríos e colaboradores (2014) isolaram 13 diferentes sesquiterpeno-lactonas de folhas de *Mikania micrantha* e *Mikania cordifolia* e avaliaram esses compostos quanto a sua atividade citotóxica nas linhagens tumorais de adenocarcinoma colorretal (HCT-15), leucemia mieloide crônica (K562), GBM (U251MG), câncer de mama (MCF-7), câncer de próstata (PC-3) e câncer de pulmão (SKLU-1). Os melhores resultados foram obtidos para as linhagens de GBM, câncer de mama e câncer de pulmão. Estes autores ainda ressaltam que a diferença encontrada nas atividades antiproliferativas



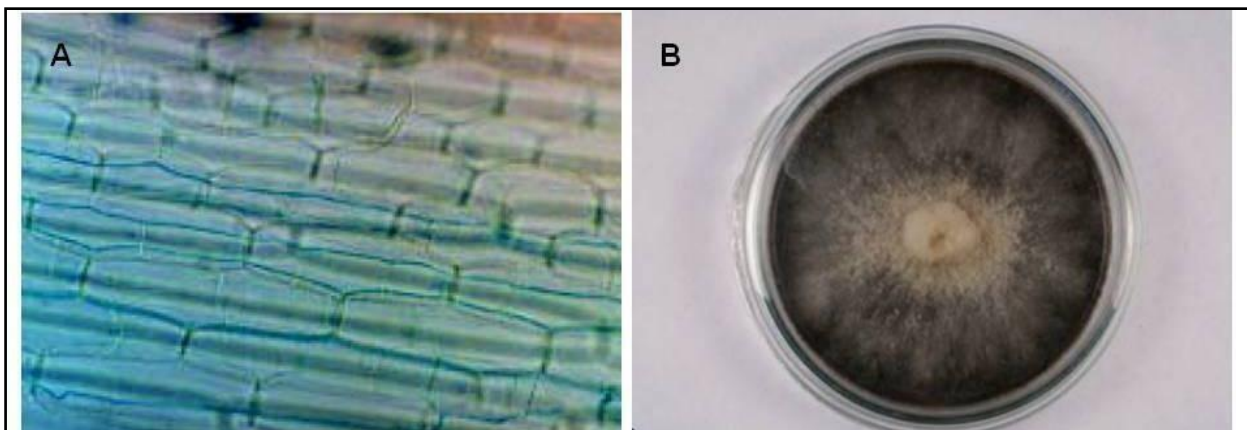
destes compostos pode ser mediada por características estruturais específicas (RÍOS et al., 2014).

Gregório (2008) demonstrou que extratos de *M. parodii* e *M. pilosa*, possuem atividade citotóxica para as linhagens celulares de carcinoma de colón (HCT-8), carcinoma de mama (MDA-MB435) e glioblastoma multiforme humano (SF925). O ácido caurenóico, obtido de *Mikania hirsutissima*, demonstrou ter efeito citotóxico e ação anti-proliferativa consideráveis em linhagem celular de glioma humano U87 (LIZARTE NETO et al., 2013)

Dou e colaboradores (2014) avaliaram o efeito citotóxico do extrato aquoso de *M. micrantha*. Esses autores observaram que o extrato inibe a atividade de células tumorais *in vivo* e *in vitro*, através de diversos mecanismos tais como a inibição da proliferação celular, indução de apoptose e parada do ciclo celular, ao mesmo tempo que apresenta baixa toxicidade sobre os órgãos do sistema imunológico. Estes autores também discutem que tal efeito observado pode ser devido a presença de flavonóides encontrados no extrato aquosos de *M. micrantha*.

### **Os micro-organismos endofíticos**

Além das plantas, os micro-organismos associados a elas também representam uma fonte de busca de novas moléculas com atividade biológica. Compostos isolados a partir do metabolismo desses micro-organismos têm dado origem a produtos com propriedades farmacológicas conhecidas, como por exemplo, o taxol. Uma característica importante na eleição de micro-organismos que exibam um maior potencial para a busca de novos compostos pode ser o nicho que ele ocupa (YU et al., 2010, STROBEL, 2003; STROBEL & DAISY, 2003), explicando então o interesse de pesquisas voltadas para os micro-organismos endofíticos.



**Figura 2.** (A) Hifas de fungo endofítico (linhas azuis) crescendo entre os espaços celulares de seu hospedeiro (FONTE: KEMP et al., 2007). (B) Fungo endofítico *Hypoxylon* sp. isolado de *Mikania laevigata* (FONTE: RIBEIRO, 2011).

Estes micro-organismos podem ser definidos como os que vivem no interior de suas plantas hospedeiras sem lhes causar sintomas de doença, conforme demonstrado na **Figura 2** (AZEVEDO, 1998, STROBEL 2003, KUSARI et al., 2012). Acredita-se que, dado o longo processo co-evolutivo entre estes micro-organismos e suas plantas hospedeiras (KEMP et al., 2007), tenha ocorrido troca de informações genéticas que levaram o fungo ou a planta a produzir compostos de interesse medicinal (KUSARI & SPITELLER, 2011).

A infecção das plantas por estes micro-organismos pode ocorrer de duas formas: (i) transferência vertical - que se dá entre a planta materna e a sua prole, através das sementes; e (ii) por transferência horizontal - que ocorre por meio de fissuras entre plantas de um mesmo ambiente (RODRIGUEZ et al., 2009). As partes aéreas das plantas superiores (como os estômatos, nas folhas) e as raízes, constituem as principais portas de entrada destes micro-organismos (AZEVEDO, 1998).

Acredita-se que a diversidade destes micro-organismos seja enorme, principalmente em florestas de clima temperado e tropical (STROBEL, 2003). Estes micro-organismos, especialmente os fungos endofíticos, têm sido isolados a partir de diversas plantas hospedeiras (RODRIGUEZ et al., 2009), sendo que cada planta pode hospedar um ou mais destes micro-organismos (STROBEL & DAISY, 2003; KUSARI et al., 2012).

Huang e colaboradores (2008) isolaram de 29 plantas medicinais chinesas das famílias Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Rubiaceae,

Solonaceae e Polygonaceae um total de 1160 fungos endofíticos. Estes autores verificaram que algumas espécies de fungos, tais como fungos do gênero *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp. e *Phoma* sp., demonstraram ser mais cosmopolitas do que outras como, por exemplo, *Aspergillus* sp. e *Xylariales* sp.

Torna-se importante salientar que tais micro-organismos estão intimamente correlacionados aos seus hospedeiros. Além disso, os mecanismos que levam ao desenvolvimento do endofitismo podem ser coordenados por sinais químicos que estão sujeitos às variações ambientais ou por refinamento do metabolismo de ambos (KUSARI et al., 2012). Assim, verificou-se que a ocorrência de determinadas espécies de fungos endofíticos pode estar associada ao conteúdo de fenóis totais da planta que as hospedam, enquanto outras não demonstraram essa correlação (HUANG et al., 2008).

A variedade de compostos obtidos destes micro-organismos também é notável, sendo atribuído um amplo espectro de atividades biológicas. Estes compostos podem apresentar desde atividades antimicrobianas, como o ácido helvótico de *Pichia guilliermondii*, endofítico da planta medicinal *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (ZHAO et al., 2010), até antitumorais, como o taxol (STIERLE et al., 1993), anti-inflamatórias, anti-helmínticas, antioxidantes e outras (BARROS et al., 2011; VERMA et al., 2013; YADAV et al., 2014; STROBEL & LONG, 1998; SURYANARAYANAN, et al., 2009).

Assim, o potencial para a busca por novos compostos naturais e potentes metabólitos de fontes inexploradas como os endofíticos encorajam as pesquisas neste campo (KATOCH et al., 2014).

### **Potencial biológico dos fungos endofíticos**

Micro-organismos endofíticos tem despertado o interesse de cientistas já há algum tempo. Tendo grande responsabilidade sobre este fato o trabalho de Stierle e colaboradores (1993), onde o fungo endofítico isolado das entrecascas de *Taxus brevifolia*, *Taxomices adrennae*, foi descrito como produtor de taxol, fármaco quimioterápico, apenas adequando-se as condições de cultivo (STIERLE et al., 1993). Essa descoberta fez com que muitos estudos se voltassem para a busca de outros micro-organismos endofíticos que também pudessem sintetizar o paclitaxel. Assim, endofíticos associados a outras espécies do gênero *Taxus*, ou de outras plantas de

gêneros correlacionados, foram encontrados tendo a habilidade de produzir o paclitaxel ou seus análogos (ZHAO et al., 2012). Além do taxol, a produção de outros compostos de interesse farmacêutico foi identificada e caracterizada em fungos endofíticos isolados a partir de diferentes espécies vegetais (WANG et al., 2014; ZHAO et al., 2012).

A camptotecina é um composto antitumoral que inibe a topoisomerase I através de ligação e estabilização covalente do complexo DNA-topoisomerase I (KUSARI et al., 2012). *Fusarium solani*, isolado de *Camptotheca acuminata*, planta da qual a camptotecina foi originalmente descoberta, é também um micro-organismo endofítico encontrado produzindo o mesmo composto que sua planta hospedeira apenas modificando-se as condições de cultivo (KUSARI et al., 2009).

Outro composto de interesse na pesquisa contra o câncer é o resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene). Três novas moléculas de resveratrol (reverastroldeído A, B e C) foram obtidas do endofítico *Alternaria* sp., isolada de *Myoporum bontioides* (WANG et al., 2014). Estes três novos compostos foram avaliados em linhagens celulares tumorais de câncer de mama (MDA-MB-435), de carcinoma hepato celular (HepG2) e de carcinoma colorretal (HCT-116) (resveratrol e epirubicina foram utilizados como controles positivos de inibição da proliferação celular). Ambos os compostos exibiram um efeito citotóxico dose-dependente. A atividade citotóxica observada para estes três novos compostos foi significativamente melhor do que a atividade do resveratrol para todas as linhagens celulares avaliadas no estudo (WANG et al., 2014).

Lakshmi & Selvi (2013), isolaram o fungo endofítico *Coletrichum gloesporides* da planta medicinal *Baringtonia acutangula* e avaliaram o potencial anticancer dos extratos obtidos contra linhagem de câncer de cólon humano (HT29). Os resultados demonstraram que o extrato do fungo foi capaz de reduzir a viabilidade celular da linhagem testada em aproximadamente 50%.

Os extratos orgânicos resultantes da extração dos fungos endofíticos de *Bacopa monnieri*, *Fusarium* sp. e *Fomitopsis cf. meliae* com diclorometano, exibiram atividade citotóxica nas linhagens celulares de carcinoma colo retal (HCT-116), pulmão (A-549), mama (MCF-7) e câncer de próstata (PC-3) (KATOCH et al., 2014). As melhores atividades citotóxicas foram observadas na linhagem de carcinoma colo retal, com IC<sub>50</sub> de 5 µg/mL e 6 µg/mL para os extratos de *Fusarium* sp. e *Fomitopsis cf. meliae*, respectivamente.

Os micro-organismos endofíticos também podem apresentar outras atividades. O extrato metanólico do micélio de *Rizoctonia* sp., por exemplo, demonstrou ter atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos (BARROS et al., 2011), assim como outros endofíticos possuem compostos em que foram observadas atividade antioxidante (YADAV et al., 2014; XIAO et al., 2014).

### **Micro-organismos endofíticos de espécies do gênero *Mikania***

Ribeiro e colaboradores (2014), isolaram 40 fungos endofíticos de folhas de *Mikania laevigata* e identificaram oito membros da família Xylariaceae. Neste estudo, o grupo fúngico dominante encontrado foram membros desta família. Os achados moleculares revelaram quatro principais classes de fungos: *Nodulisporium* sp., *Hypoxyton* sp, *Daldinia* sp. e *Xylaria luteostromata* (RIBEIRO et al., 2014).

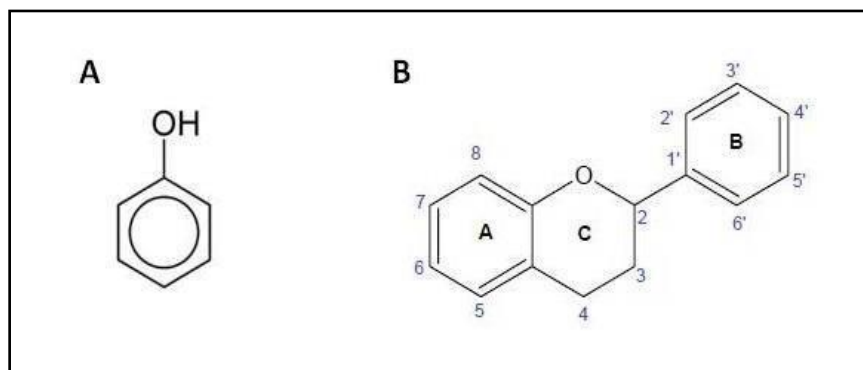
Polonio e colaboradores (2015) isolaram micro-organismos endofíticos de *Mikania glomerata* e avaliaram o potencial dos isolados para a produção de compostos de ação antimicrobiana e para biocontrole de patógenos em plantas. Em teste de placas de antagonismo, três isolados de *Diaporthe citri* foram eficientes contra os fungos fitopatógenos *Fusarium solani* e *Didymella bryoniae*. O extrato bruto de uma das variantes de *Diaporthe citri* mostrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (POLONIO et al., 2015).

Entretanto, não há, até o momento, nenhum estudo sobre a presença e a diversidade de fungos endofíticos da espécie *Mikania hastato-cordata*. É interessante apontar que este gênero a que pertencem plantas com propriedades medicinais reconhecidas e, baseado no que foi exposto até momento, pode abrigar espécies de fungos endofíticos de relevante interesse farmacêutico e biológico.

### **Compostos fenólicos e flavonoides**

Os compostos fenólicos apresentam, em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes um ou mais grupamentos hidroxilas (Figura 3A). De maneira simplificada, esta classe de compostos pode ser classificada em flavonoides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos) (SILVA et al, 2010) e podem ser divididos em diferentes grupos de acordo com o

número de anéis fenólicos que possuem e com base nos elementos estruturais que ligam estes anéis (LI et al, 2014).



**Figura 3. (A)** Estrutura básica de um composto fenólico, que pode possuir de um ou mais grupos hidroxilas ligado. **(B)** Estrutura básica de um flavonoide.

Os flavonoides são polifenóis que compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos em frutas e nos vegetais, apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (SILVA et al, 2010). Sua estrutura básica consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (ANGELO & JORGE, 2007), como pode ser observado na Figura 3B.

Estudos realizados com os compostos fenólicos demonstram sua capacidade como agentes antioxidantes, cardioprotetores, anti-inflamatórios, anticancerígena, além de demonstrar atividade antimicrobiana (SILVA et al, 2010; DOU et al, 2014; LI et al, 2014). Os compostos fenólicos têm sido considerados como um dos metabólitos secundários de interesse devido a seus efeitos quimiopreventivos e quimioterapêuticos em cânceres (JAFARI et al., 2014). Seu mecanismo de ação anticancerígeno é descrito como multifacetado. Os compostos fenólicos podem aprimorar o sistema imune para reconhecer e destruir bem como, inibir a angiogênese e também por atenuar a adesão e invasão de células cancerígenas, reduzindo assim o potencial metastático das mesmas (WAHLE, 2009).

Assim como os vegetais, diversos fungos endofíticos têm sido relatados na literatura com capacidade para a produção de compostos fenólicos e flavonoides que

possuem atividade antioxidante e citotóxica comprovadas (YADAV et al, 2014; SRINIVASAN et al, 2010; LIU et al, 2001).

As espécies de fungos endofíticos *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *Fusarium oxysporium*, obtidos de *Cortalaria pallida* contem quantidades significativas de fenóis e flavonoides (Govindappa et al., 2011). Tendo sido observado, por estes autores, que os extratos de *A. niger* e *F. oxysporium* têm significativa atividade antioxidante.

06/01/2017

Editorial Manager®

**Applied Microbiology and Biotechnology**[HOME](#) [LOGOUT](#) [HELP](#) [REGISTER](#) [UPDATE MY INFORMATION](#) [JOURNAL OVERVIEW](#)  
[MAIN MENU](#) [CONTACT US](#) [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)Role: XXXXXXXXXX Username: [Bragasapah](#)

## Author's Decision

Thank you for approving "Endophytic fungous obtained from *Mikania hastato-cordata* exhibits antitumor activity".

[View Reference Checking Results](#)  
[Main Menu](#)



#### 4. Manuscrito

**Antitumor activity of an endophytic fungous obtained from *Mikania hastato-*  
*cordata***

Kennia de Cássia Araújo Galdino, Nathalia Stark Pedra, Daniel S. Silva, Carlus Augustu  
Tavares do Couto, Helene Santos de Abreu, Rui C. Zambiasi, Wilson Cunico, Claiton  
Leoneti Lencina, Rosélia Maria Spanevello, Elizandra Braganhol

**Antitumor activity of an endophytic fungous obtained from *Mikania hastato-cordata***

Kennia C.A. Galdino<sup>1</sup>, Nathalia S. Pedra<sup>1</sup>, Daniel S. Silva<sup>1</sup>, Carlus A.T. do Couto<sup>1</sup>, Helene S. Abreu<sup>2</sup>; Rui C. Zambiasi<sup>2</sup>; Wilson Cunico<sup>1</sup>, Claiton L. Lencina<sup>3</sup>; Rosélia M. Spanevello<sup>1</sup>; Elizandra Braganhol<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Curso de Farmácia, Centro de Ciências Químicas, CCQFA, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Corresponding Author

Elizandra Braganhol ([ebraganhol@ufcspa.edu.br](mailto:ebraganhol@ufcspa.edu.br))

Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DCBS) - UFCSPA

Rua Sarmiento Leite, 245 - Anexo I - sala 303

CEP: 90.050-170

Porto Alegre, RS, Brasil

Phone: +55 51 3303 8762

## Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the worst and most common primary brain tumor. The currently employed treatment is surgery when possible, followed by radio/chemotherapy with temozolomide. However, these treatments have shown limited effectiveness, requiring research for new therapeutic modalities to increase the survival of patients. The genus *Mikania* comprises plant species popularly known as “*guaco*”. This genus has species distributed in tropical and subtropical areas in the Americas. In traditional medicine they are used due to its analgesic, bronchodilator, expectorant, anti-inflammatory and antiallergic, activities. Medicinal plants presenting certain known medicinal action could be hosted by endophytes, which in turn could present such properties. Thus, the objectives of this study were to evaluate the effect of antiglioma endophytic fungus extracts *Mikania hastato-cordata* and determine the presence of phenolic and flavonoid content in the extracts. The results indicate that the extracts obtained at different times of fungal culture inhibited C6 glioma cell growth ~80% (dichloromethane extract - 500µg/mL) and ~70% (ethyl acetate extract - 500µg/mL). Furthermore, when tested in primary astrocyte cultures, the extracts showed no cytotoxic effect. This effect can be attributed to the presence of phenolic compounds obtained in two of the four extracts obtained. Thus, the results suggest that endophytic microorganisms isolated from *Mikania cordata-hastato* have therapeutic potential that can be applied to the GBM treatment.

**Key words:** *Mikania*; endophytics; phenolic compounds; glioma; citotoxicity

## 1. Introduction

Gliomas are the most common and lethal form of primary brain tumors (Huse and Holland, 2010). Glioblastoma multiforme (GBM), a grade IV glioma (Haar *et al.*, 2012), is characterized by high infiltrating capacity, angiogenic and chemoresistance potential (Ramirez *et al.*, 2013). Patients with GBM have a poor prognosis and a median survival around 12 months after diagnosis (Huse & Holland, 2010; Stupp *et al.*, 2005; 2009). The currently employed treatment is surgery, when possible, followed by radio- and chemotherapy with temozolomide (TMZ), which is the first chemotherapeutic agent approved for GBM treatment (Butowski *et al.*, 2006). However, despite intensive efforts, the treatment is just palliative and new strategies able to decrease the GBM advance and to increase the median survival of patients are urgently needed.

The growing demand for new molecules with biological activities to be applied in the treatment of lethal diseases, as some types of cancer, is increasing. In this context, endophytic microorganisms are emerging as a promising source of new molecules with therapeutic potential. Notably, plants provide a complex library of unique bioactive constituents and can be an advantageous strategy to prospect new pharmacological compounds (Rufatto *et al.*, 2012). In this regard, it is believed that microorganisms have co-evolved with their hosts and the production of specific metabolites with biological activity is a result of not only host interactions, but also may be modulated by environmental conditions (Strobel & Daisy, 2003; Kusari & Spiteller, 2011; Kusari *et al.*, 2012).

Endophytes are able to live into their host, producing compounds that habilitate them to survive at variable environmental conditions (Waqas *et al.*, 2012), besides they do not cause symptoms of disease (Azevedo, 1998, Strobel 2003, Kusari *et al.*, 2012). Genetic and biochemical fungal biodiversity are large. Souza *et al.* (2004) obtained 512

isolates from *Palicourea longiflora* and 79 isolates from *Strychnos cogens* (Amazon tropical plants). Huang *et al.* (2008) obtained from 29 different plants families in China a total of 1160 fungal isolates. Sun *et al.* (2015) isolated 12 species of endophytic fungi from *Dalbergia odorifera*, traditional plant of Chinese medicine.

In Brazil, native species of genus *Mikania* comprises plant species popularly known as “*guaco*” and some biological activities have been reported in the literature. For example, *M. glomerata* and *M. laevigata* popularly is known due to its broncodilator, expectorant, anti-inflammatory and anti-allergic properties (Czelusniak *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2013). *M. laevigata* have been investigated as antiulcerogenic (Bighetti *et al.*, 2005), as well as antitumor activities (Rufatto *et al.*, 2013). *M. micrantha* was investigated for its anti-inflammatory activities in a mouse ear edema test induced with TPA (*tetradecanoylphorbol acetate*) (Pérez-Amador *et al.*, 2010). However, although the chemical components and the biological activities of *Mikania* have been extensively studied (Nayeem *et al.*, 2011; Rufatto *et al.*, 2012; Rufatto *et al.*, 2013), little is known about the endophytic fungi associated to this genus and the possible therapeutic applications of these microorganisms.

The present study evaluated the antiglioma activity of endophytic fungus isolated from *Mikania hastato-cordata*. To this end, different extracts using dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtAc), n-butyl alcohol (n-BuOH) and methanol (MeOH) where prepared from the endophytic fungus identified as “F3b’3” and its citotoxic activity was evaluated in C6 glioma cell line and in astrocyte cultures, a model of non-transformed cell. Our data show that the endophytic fungus extracts, mainly the DCM extract, decreased selectively the glioma cell viability, which potency correlated to the polyphenol and flavonoid contents. Taken together, these results suggest the endophytic fungus from *M. hastato-cordata* as a promising source of molecules with

antitumor activity, which may be applied in the therapy or be used as prototype for new drugs.

## **2. Materials and methods**

### **Chemicals**

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fungizone, penicillin/streptomycin, 0.25% trypsin/ EDTA solution, fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). 3(4,5-dimethyl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Agar was provided by Dinâmica (Dinâmica Química Ltda, Diadema, SP, BR). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

### **Collection of Plant Tissue and Isolation of Endophytic Fungi**

Leaves of *Mikania hastato-cordata* were collected at Campus Capão do Leão (Federal University of Pelotas - UFPel, Rio Grande do Sul, Brazil; geographic coordinates: 31°48'00.7" S and 52°25'08.0" W). The collected material was identified by Dra. Raquel Ludke from the Botany Department (Biology Institute, UFPel), and a voucher specimen was deposited under the code PEL N° 25 944. The plant tissue was washed thoroughly in ddH<sub>2</sub>O, and dried on a paper towel. Surface sterilization of leaf pieces was initiated by successive immersion in 95% EtOH (15 s) and 2% NaClO solution (2 min). Finally, the leaf pieces were submerged in 70% EtOH for 3 min and left to dry in sterile petri dishes. A hole puncher previously washed in 70% EtOH and flame-sterilized was used to excise 3 circular leaf discs from each leaf with a sterile scalpel to expose fresh tissue surfaces for fungal isolation. Leaf discs were inoculated on water-agar medium and incubated at 25 ± 2°C under controlled light conditions (Thelga; Dom Bosco, MG, BR).

Following seven days, the hyphae that emerged was picked on a petri dish with 1.7% PDA (potato-dextrose-agar) medium and maintained at same conditions described above. Morphologically distinct mycelia emanating from the peripheral edge of all leaf discs was individually subcultured by *in vitro* hyphal tip transfer and maintained on PDA. Cultures were propagated and purified by continuous subculture on 4% (w/v) PDA. Stock cultures were held at 25°C and maintained in the culture collection of NeuroCan Laboratory (UFPEl). The material collection and all experiments were authorized by the Council of Management of Genetic Patrimony, Brazil (CGEN, process number 010761/2015-2).

### **Extract preparation**

Liquid cultures were obtained by cutting plugs of mycelium (7 mm diameter) from the edges of 7-day-old cultures and inoculating them in 1.7% PDB (potato-dextrose-broth) medium (1 plug per 100 mL medium into 250 mL erlenmeyer flasks) and allowed to growth for 13, 20 and 27 days at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  under controlled light conditions. Therefore, mycelial biomass was filtered, dried and the molecules from crushed mycelium were extracted with methanol (MeOH) (1:10), as shown in **Figure 1**. The culture supernatant, of each cultivation time, was extracted three times with dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtAc) and n-butyl alcohol (*n*-BuOH) in the ration 1:2. After filtration, all extracts were evaporated in a rotary evaporator under reduced pressure and weight out.

### **Phenolic compound determination**

Total phenol content of fungal endophytic extracts was estimated using Folin-Ciocalteau colorimetric method. Briefly, each extract was dissolved in methanol (1 mg/mL) and the procedure was carried out according to Yadav *et al.* (2014). The mixture was incubated

at room temperature for 40 min and the absorbance was determined at 725 nm in spectrophotometer SpectraMAX 190 (MolecularDevices, Sunnyvale, CA, USA). The same procedure was repeated with known concentrations of gallic acid (GA) diluted in methanol, at stock solution of 1 mg/mL, and further diluted in 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL which was used as standard for calibration curve. Total phenolic content was estimated from the regression equation:  $y = 0.067102x - 0.0021754$  with  $R^2=0.9981$  and expressed as mg/g gallic acid equivalent (GAE) using the formula:  $T = cV/M$  (T: total phenolic compound content in mg/g of GAE; c: concentration of GA determined from the calibration curve; V: volume of extract; M: weight of fungus extract).

### **Flavonoid content determination**

Total flavonoid content from fungal endophytic extracts was carried out according to Zhishen *et al.* (1999) and each extract was dissolved in DMSO to concentration 1 mg/mL. Total flavonoid content was estimated from the regression equation:  $A = 0,075C - 0,062$  with  $R^2=0.99808$ , where A is the absorbance and C is the flavonoid content in µg per g of extract.

### **General cell culture procedures**

C6 rat glioma cell line was obtained from the ATCC (American Type Cell Collection; Rockville, Maryland, USA). Cells at 10–20 passages were grown in culture flasks and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (pH 7.4) containing 1% DMEM (Gibco BRL), 8.4 mM HEPES, 23.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% fungizone, penicillin/streptomycin 0.5 U/mL and supplemented with 5% (v/v) FBS. Cells were kept at a temperature of 37°C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.



Astrocyte cultures were prepared as previously described (Frota Jr. *et al.*, 2009). Briefly, cortex of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed and dissociated mechanically in a  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Mg}^{+2}$  free balanced salt solution (CMF), pH 7.4, (137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.27 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 6.1mM glucose). After centrifugation at 1000 *g* for 10 min, the pellet was suspended in DMEM supplemented with 10% FBS. The cells ( $5 \times 10^4$ ) were seeded in poly-L-lysine-coated 96-multiwell plates. Cultures were allowed to grow to confluence by 20–25 days. Medium was replaced every 4 days. All procedures used in the present study followed the “Principles of Laboratory Animal Care” of the National Institutes of Health and were approved by the Ethical Committee of UFPel (protocol number 10321).

#### ***In vitro* cell culture treatment**

The dried organic extracts were firstly dissolved in DMSO at the concentration of 10 mg/mL and further diluted in DMEM with 5% or 10% FBS to obtain 31.25, 62.5, 125, 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$ . The C6 glioma cell line was seeded at  $5 \times 10^3$  cells/well in DMEM/5% FBS in 96 multiwell plates in a final volume of 100  $\mu\text{L}$  and the cells were allowed to growth for 24 h. Astrocyte cultures were prepared as previously described. Cell cultures were exposed to fungal endophytic extracts for 24, 48 and 72 h. Appropriate controls containing 0.05% DMSO were performed.

#### **Cell viability assay**

Dehydrogenases-dependent 3(4,5-dimethyl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction was used to estimate viability of glioma and astrocyte cell cultures. This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT and form a blue formazan product. MTT solution (sterile stock solution of 5 mg/mL) was added to the incubation

medium in the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL. The cells were left for 60 min at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The medium was then removed and plates were shaken with DMSO for 30 min. The optical density of each well was measured at 492 nm in a microplate reader (SpectraMAX 190). Results were expressed as percentage of control.

### **Statistical analysis**

The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and the individual data were submitted to one-way variance analysis (ANOVA) followed by Tukey's *post-hoc* test, with critical range at  $P \leq 0.05$ , or two-way variance analysis, followed by Bonferroni's *post-hoc* test.

## **3. Results**

### **Isolation of Endophytic Fungi from *M. hastato-cordata***

Leaves of *M. hastato-cordata* were processed as described in material and methods and a total of nine isolates of endophytic fungi were obtained from PDA medium. Each isolate was subcultured and purified by successive transfer over a period of six months. The endophytic fungus selected to perform this study was identified as F3B'3 and it exhibited morphological characteristics septate hyphae, filamentous colonies with cotton aspect, which color ranges from ocher yellow to white. Phialides were observed in the microcultivation. However, the absence of conidia did not allow the fungus morphological identification (**Fig. 2**).

### **Cytotoxic assay of extracts obtained from endophytic fungi isolated from *M. hastato-cordata***

In order to evaluate the biological potential of F3B'3, the isolated fungus was cultivated in a liquid culture and following 13, 20 and 27 days the liquid culture medium was submitted to extraction with DCM, EtAc or *n*-BuOH in order to isolate molecules with different chemical properties. In parallel, the mycelium biomass extract was obtained with MeOH from a 27 day culture. The yields of each extraction (for each 100 mL of medium) are exhibited at Table 1.

The citotoxic activities of the extracts were tested in rat C6 glioma cell line cultures. Firstly, the antiglioma effect of mycelium was evaluated. As shown in Figure 3, methanol extract prepared from mycelium did not reduce the glioma cell viability. In contrast, lower extract concentrations (31.25, 62.5 and 125 µg/mL) were able to significantly increase in 82% cell proliferation (62.5 µg/mL, 72 h) (**Fig. 3**).

Next, the activity of extracts obtained from liquid culture medium of F3B'3 was determined (**Fig. 4**). DCM and EtAc extracts induced citotoxic activity against C6 glioma cell line, by about 80% (DCM 27 days - 500µg/mL) and 73% (EtAc 20 days - 500µg/mL). EtAc extract obtained from 13 days of liquid medium fungus culture significantly reduced cell viability at concentrations of 250 and 500 µg/mL in all times tested for citotoxic assay (24, 48 and 72 h), and exhibited a IC<sub>50</sub> 171 µM at 48 h of treatment (**Fig. 5**). EtAc extract obtained from 20 days of liquid medium fungus culture significantly reduced cell viability at concentrations of 250 and 500 µg/mL following 24 and 48 h of treatment. After 72 h of treatment, this extract also significantly reduced cell viability at 125 µg/mL. EtAc extract obtained from 27 days fungus culture, significantly reduced cell viability at concentrations from 125 to 500 µg/mL following 48 and 72 h of exposition in citotoxic assay (IC<sub>50</sub> 97.23 in 48 h; **Fig. 5**).

DCM extract 13 days significantly reduced cell viability at concentrations of 125, 250 and 500 µg/mL at all times tested (24, 48 and 72 h; Fig. 4) and present IC<sub>50</sub> value

~0.4445  $\mu\text{M}$  in 48 h (Fig. 5). DCM 20 days extract also significantly reduced cell viability at concentrations of 125, 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$  at all times tested and present  $\text{IC}_{50}$  value 29.49  $\mu\text{M}$  in 48 h (**Fig. 5**). DCM extract 27 days exhibit antiglioma activity at concentrations of 125, 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$  at 48 and 72 h of treatment; in 48 h exhibit antiglioma activity at concentrations of 250 and 500  $\mu\text{g/mL}$ , and  $\text{IC}_{50}$  116.2  $\mu\text{M}$  (**Fig. 5**).

Little cytotoxic activity was found for *n*-BuOH extracts when compared to EtAc and DCM extracts (**Fig. 4**). Interestingly, extracts obtained from 13 or 27 days fungus liquid culture induced an increase in glioma cell viability following 72 h of treatment (13 days extract) and 24 and 48 h of treatment (27 days extract), while the higher concentration (500  $\mu\text{g/mL}$ ; 27 days extract) reduced glioma viability, characterizing a biphasic effect (**Fig. 4**).

### Cytotoxicity of extracts in primary culture of astrocytes

To evaluate the cytotoxic assay in *non-tumor* cell culture, astrocytes were submitted to exposition to the DCM and EtAc extracts. The cytotoxic activity of the promising extracts EtAc and DCM in primary astrocyte cultures was also evaluated (**Fig. 6**). Notably, the highest concentrations of DCM and EtAc extracts did not altered astrocyte viability, suggesting a selectivity of effect against tumor cells.

### Phenolic Compounds and Flavonoid Determination

In order to elucidate the possible molecules responsible for the cytotoxic activity exhibited by the extracts, the total phenolic content and the presence of flavonoids were evaluated (**Fig. 7**). The concentration of total phenolic compounds found for all extracts is shown in the Figure 7 (panel A). The values ranged from 0.015 to 2,783.66 mg GAE/g of dry weight and, interestingly, the content of phenolic compounds is directly

proportional to antiglioma activity exhibited by the extracts. The highest content of phenols was observed in extract of DCM 13 days ( $2.783,66 \pm 129.19$  mg GAE/g of extract) followed by extract DCM 27 days ( $2.254,04 \pm 196.40$  mg GAE/g of extract) and DCM 20 days ( $1,772.14 \pm 116.25$  mg GAE/g of extract). For EtAc extracts, the phenol content varied from  $2.694 \pm 0.179$  mg GAE/g (13 days of biomass cultivation) to  $2.028 \pm 0.094$  mg GAE/g (20 days of biomass cultivation). The lowest concentration was found in all *n*-BuOH times of biomass cultivation. The flavonoid content was determined for all extracts (Fig. 7, panel B). EtAc extract exhibited the highest values compared with the other extracts.

#### 4. Discussion

Hexane and ethanolic extracts obtained from leaves of *Mikania laevigata* showed selectivity cytotoxic activity when tested on tumor cell lines HeLa, Hep2 and MCR-5 (Rufatto *et al.*, 2013). According to the authors, such selective activity may be due to the large presence of phenolic compounds observed at first, and the association with the coumarin molecule found in the second. Leaf extract from *Mikania scandens* have demonstrated anti-inflammatory activity in vitro and in vivo assay, and carrageenan induced inflammation was significantly antagonized by *M. scandens* leaf extract. The leaf extract from *M. scandens* has revealed the presence of tannins, alkaloids, steroids and flavonoids (Banerjee *et al.*, 2014).

This study was the first to isolate endophytic fungi from *Mikania hastato-cordata*, and to evaluate the antitumor effect of its extracts. Other studies have isolated different endophytic fungi from the genus *Mikania*. Ribeiro *et al.*, (2014) isolated 40 endophytes of leaves of *Mikania laevigata*. The molecular findings revealed four major clades of fungi: *Nodulisporium* sp, *Hypoxylon* sp, *Daldinia* sp. and *Xylaria luteostromata*.

Polonio *et al.*, (2015) isolated endophytic microorganisms of *Mikania glomerata*. In this study, three isolates of *Diaporthe citri* were effective against plant pathogens *Fusarium solani* and *Didymella bryoniae*, and effective anti-microbial activity against *Staphylococcus aureus*.

These microorganisms has aroused the interest of the scientific community to be noted that several compounds, previously believed to be produced exclusively by certain plant species, have been obtained from endophytic microorganisms with various pharmaceutical activities of interest, including the anti-tumor activity. Among these we highlight taxol produced by the fungus *Taxomices adrennae* (Stierle *et al.*, 1993); camptothecin produced by *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata* (Kusari *et al.*, 2012); and also three new molecules were obtained from resveratrol endophyte *Alternaria* sp., isolated *Myoporium bontioides* (Wang *et al.*, 2014).

In this study, it was observed that the antitumor activity exhibited by extracts of secondary metabolism, is related to the content of total phenols or flavonoids found in the extracts. Yadav *et al.* (2014) determined the total phenolic compounds extracts with the organic solvent ethyl acetate of different isolated endophytic fungi. The fungus *Chaetomium* sp. had the highest amount of total phenolic compounds among the evaluated microorganisms ( $60.13 \pm 0.41$  mgGAE/g extract). And the extracts of *Isaria tenuipes* ( $4.25 \pm 0.20$  mg GAE/g extract) showed the best antioxidant activity.

In our study we observed the presence of flavonoids in the e-EtAc, followed by e-DCM. Yadav and colleagues (2014) and Garcia and colleagues (2012), points out that the solvent ethyl acetate is the most efficient in the extraction of phenolic compounds, especially flavonoids.

## Conclusion

The extracts obtained in different fungal culture times of 13, 20 and 27 days, with organic solvents DCM and EtAc showed the best antiglioma effects when compared to extract obtained with *n*-BuOH and the extract obtained with the fungal mycelium with organic solvent methanol.

Quantitation of concentrations of phenolic compounds and flavonoids were measured for all extracts, and the extracts obtained with dichloromethane and the extracts obtained ethyl acetate showed the significant amounts of these compounds, respectively.

This study corroborates the findings of other authors that endophytic fungi are a promising source for the search for new compounds. Further studies are needed to show the establishments of which compounds present in the extracts are involved with the activity observed antiglioma activity.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Universal Processo 482055/2013-8); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Galdino, KCA; do Couto CAT, Pedra NS; Silva DS; Abreu HS were recipients of CNPq or CAPES fellowship.

### **References**

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: I. S. Melo; J. L. Azevedo. (Org.). Ecologia Microbiana. 1.ed. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, p. 117-137.

BANERJEE, S.; CHANDA, A.; ADHIKARI A.; DAS, A.; BISWAS S. Evaluation of Phytochemical Screening and Anti Inflammatory Activity of Leaves and Stem of *Mikania scandens* (L.) Wild. Annals of Medical & Health Sciences Research. v. 4, n. 4, p. 532–536, 2014.

BIGHETTI A. E.; ANTÔNIO, M. A.; KOHN, L. K.; REHDER, V. L.; FOGLIO, M. A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. Phytomedicine, v. 12, p. 72–77, 2005.

BUTOWSKI, N. A.; SNEED, P. K.; CHANG, S. M. Diagnosis and Treatment of Recurrent High-Grade Astrocytoma. Journal of Clinical Oncology, v. 24, n. 8 p. 1273-1280, 2006.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulz Bip. ex Baker. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DA FROTA JR, M. L. C.; BRAGANHOL, E.; CANEDO, A. D.; KLAMT,F.; APEL, M. A.; MOTHES, B.; LERNER, C.; BATTASTINI, A. M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human



U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. *Investigational new drugs*, v. 27, n. 1, p. 13-20, 2009.

GARCIA, A.; RHODEN, S. A.; BERNARDI-WENZEL, J.; ORLANDELLI, R. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 2, n. 10, p. 35, 2012.

GOVINDAPPA, M; BHARATH, N; SHRUTHI, H.B.; SANTOYO, G. *In vitro* Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Endophytic Extracts of *Crotalaria pallida*. *Free Radicals and Antioxidants*, v. 1, n. 3, p. 79-86, 2011.

HAAR, C. P.; HEBBAR, P.; WALLACE IV, G. C.; DAS, A.; VANDERGRIFT III, W. A.; SMITH, J. A.; GIGLIO, P.; PATEL, S. J.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochemical research*, v. 37, n. 6, p. 1192-1200, 2012.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; HYDE, K. D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, v. 33, n. 1560-2745, p. 61-75, 2008.

HUSE, J. T.; HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nature Reviews: Cancer*, v. 10, n. 5, p. 319-331, 2010.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Natural Product Report*, v. 28, n. 7, p. 1203–1207, 2011.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

NAYEEM, A. A.; KHATUN, A.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, M. Evaluation of phytochemical and pharmacological properties of *Mikania cordata* (Asteraceae) leaves. *Journal of Pharmacognosy and phytotherapy*, v. 3, p. 1-6 2011.

PÉREZ-AMADOR, M. C.; OCOTERO, V. M.; BALCAZAR, R. I.; JIMÉNEZ, F. G. Phytochemical and pharmacological studies on *Mikania micrantha* H.B.K. (Asteraceae). *Python: International Journal of Experimental Botany*, v. 79, p. 77-80, 2010.

POLONIO, J. C.; ALMEIDA, T. T.; GARCIA, A.; MARIUCCI, G. E.; AZEVEDO, J. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 3, p. 7297-309, 2015.

RAMIREZ, Y. P.; WEATHERBEE, J. L.; WHEELHOUSE, R. T.; ROSS, A. H. Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1475-1506, 2013.

RIBEIRO, F. P. C.; KAMIDA, H. M.; ALMEIDA, P. R. M.; UETANABARO, A. P. T.; COSTA, L. C. B.; BRANCO, A. Isolation and identification of endophytic fungi in the medicinal plant *Mikania laevigata* (Asteraceae). *Pharmacognosy Journal*, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2014.

RUFATTO, L. C.; GOWER, A.; SCHWAMBACH, J.; MOURA, S. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, n. 6, p. 1384-1403, 2012.

RUFATTO, L. C.; FINIMUNDY, T. C.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S. *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. *Phytomedicine*, v. 20, n. 10, p. 883-889, 2013.

STUPP R.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J. B.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J. G.; EISENHAUER, E.; MIRIMANOFF, R. O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, v. 10, n. 352, p. 987–996, 2005.

STUPP R.; HEGI, M. E.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; TAPHOORN, M. J. B.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; ALLGEIER, A.; FISHER, B.; BELANGER, K.; HAU, P.; BRANDES, A. A.; GIJTENBEEK, J.; MAROSI, C.; VECHT, C. J.; MOKHTARI, K.; WESSELING, P.; VILLA, S.; EISENHAUER, E.; GORLIA, T.; WELLER, M.; LACOMBE, D. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus

radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, v. 5, n. 10, p. 459–466, 2009.

SUN, S.; ZENG, X.; ZHANG, D.; GUO, S. Diverse fungi associated with partial irregular heartwood of *Dalbergia odorífera*. *Scientific Reports*, v. 5, n. 8464, p. 1-7, 2015.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Paulicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens betham*. *Acta Amazônica*, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004

SANTANA, L. C. L. R.; BRITO, M. R. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M. Propriedades físicoquímicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico padronizado a 70% das folhas de *Mikania glomerata* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.15, n.4, p.742-750, 2013.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v.5, n. 6, p. 535–544, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

YADAV, M.; YADAV, A.; YADAV, J. P. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. Asian Pacific journal of tropical medicine, v. 7, p. S256-S261, 2014.

WANG, J.; COX, D. G.; DING, W.; HUANG, G.; LIN, Y.; LI, C. Three new resveratrol derivatives from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. Marine drugs, v. 12, n. 5, p. 2840-2850, 2014.

WAQAS, M.; KHAN, A. L.; KAMRAN, M.; HAMAYUN, M.; KANG, S.; KIM, Y.; LEE, I. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. Molecules, v. 17, n. 9, p. 10754-10773, 2012.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

## Legends to Figures

**Figure 1.** Scheme of fungus culture and extraction procedures. Following isolation and purification, the fungus identified as F3B'3 was grown in liquid culture medium for 13, 20 or 27 days. Then, the molecules present in the culture supernatant were extracted with dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtAc) and n-butyl alcohol (*n*-BuOH). The mycelium cultivated for 27 days was submitted to extraction with methanol (MeOH).

**Figure 2.** Endophytic fungus isolated from *M. hastato-cordata* culture. **(A)** Photographs of F3B'3 fungus grown in solid PDA medium. **(B)** Phase contrast microphotograph was taken using an Olympus microscope (1000x magnification).

**Figure 3.** Effect of methanol extract obtained from mycelia biomass on C6 glioma cell viability. Cells were treated for 24, 48 and 72 h as indicated in the figure with increasing concentrations of MeOH extract (31.25 – 500 µg/mL) or dimethylsulfoxide (DMSO) (control), and the cell viability was evaluated by MTT as described in material and methods. Absorbance in samples treated with DMSO was considered 100% of cell viability. The values represent the mean ± SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by post-hoc comparisons (Bonferoni test). \*, \*\*, \*\*\*Significantly different from Control cells ( $P \leq 0.05$ ;  $P \leq 0.01$ ;  $P \leq 0.001$ ).

**Figure 4.** Effect of dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtAc) and n-butyl alcohol (*n*-BuOH) extracts obtained from supernatant of 13, 20 or 27 culture days of F3B'3 fungus on C6 glioma cell viability. Cells were treated for 24, 48 and 72 h as indicated in the

figure with increasing concentrations of extracts (31.25 – 500  $\mu\text{g/mL}$ ) or dimethylsulfoxide (DMSO) (control), and the cell viability was evaluated by MTT as described in material and methods. Absorbance in samples treated with DMSO was considered 100% of cell viability. The values represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by post-hoc comparisons (Bonferoni test). \*, \*\*, \*\*\*Significantly different from Control cells ( $P \leq 0.05$ ;  $P \leq 0.01$ ;  $P \leq 0.001$ ).

**Figure 5.**  $\text{IC}_{50}$  determination of dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EtAc) extracts obtained from supernatant of 13, 20 or 27 culture days of F3B'3 fungu. C6 glioma cells were treated for 48 h with increasing concentrations of extracts (31.25 – 500  $\mu\text{g/mL}$ ) or dimethylsulfoxide (DMSO) (control) and the  $\text{IC}_{50}$  values indicated in the graphs were determined using Prisma GraphPad software.

**Figure 6.** Effect of dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EtAc) extracts obtained from supernatant of 13, 20 or 27 culture days of F3B'3 fungus on astrocyte primary culture cell viability. Cells were treated for 72 h with increasing concentrations of extracts as indicated in the figure or dimethylsulfoxide (DMSO) (control), and the cell viability was evaluated by MTT as described in material and methods. Absorbance in samples treated with DMSO was considered 100% of cell viability. The values represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey's test). \*\*\*Significantly different from Control cells ( $P \leq 0.001$ ).

**Figure 7.** Determination of total phenolic content (A) and flavonoids (B) on dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtAc), *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH) or methanol (MeOH) extracts obtained from supernatant of 13, 20 or 27 culture days of F3B'3 fungus. The values represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by post-hoc comparisons (Bonferoni's test). \*\*\*Significantly different from 13, 20 or 27 days of culture ( $P \leq 0.001$ ); #Significantly different from EtAc, DCM, *n*-BuOH or MeOH extracts ( $P \leq 0.01$ ).



| Extract              | Culture              | Culture Time<br>(Days) | Yield (%) |
|----------------------|----------------------|------------------------|-----------|
| <b>E-MeOH</b>        | Mycelium (w/w)       | 27                     | 39.82     |
| <b>EtAc</b>          | Liquid culture (w/p) | 13                     | 0.0014    |
|                      |                      | 20                     | 0.0009    |
|                      |                      | 27                     | 0.0065    |
| <b>DCM</b>           | Liquid culture (w/p) | 13                     | 0.0048    |
|                      |                      | 20                     | 0.0017    |
|                      |                      | 27                     | 0.205     |
| <b><i>n</i>-BuOH</b> | Liquid culture (w/p) | 13                     | 0.0205    |
|                      |                      | 20                     | 0.0557    |
|                      |                      | 27                     | 0.0258    |

**TABELA 1**

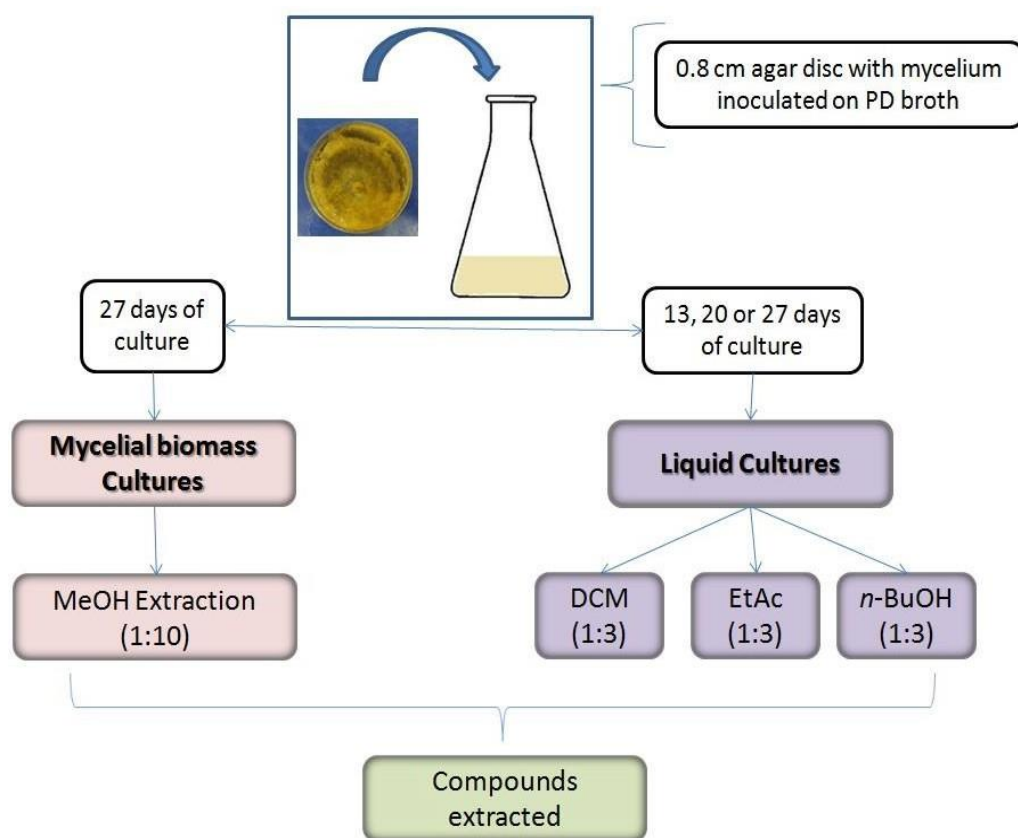
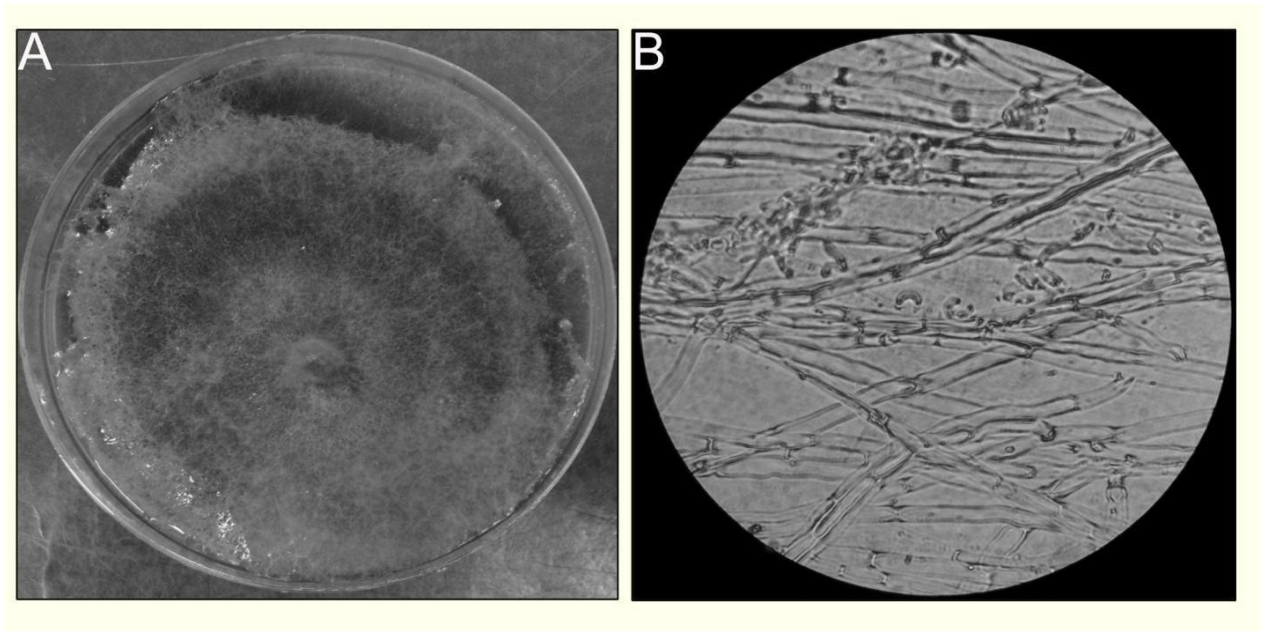


FIGURA 1



**FIGURA 2**

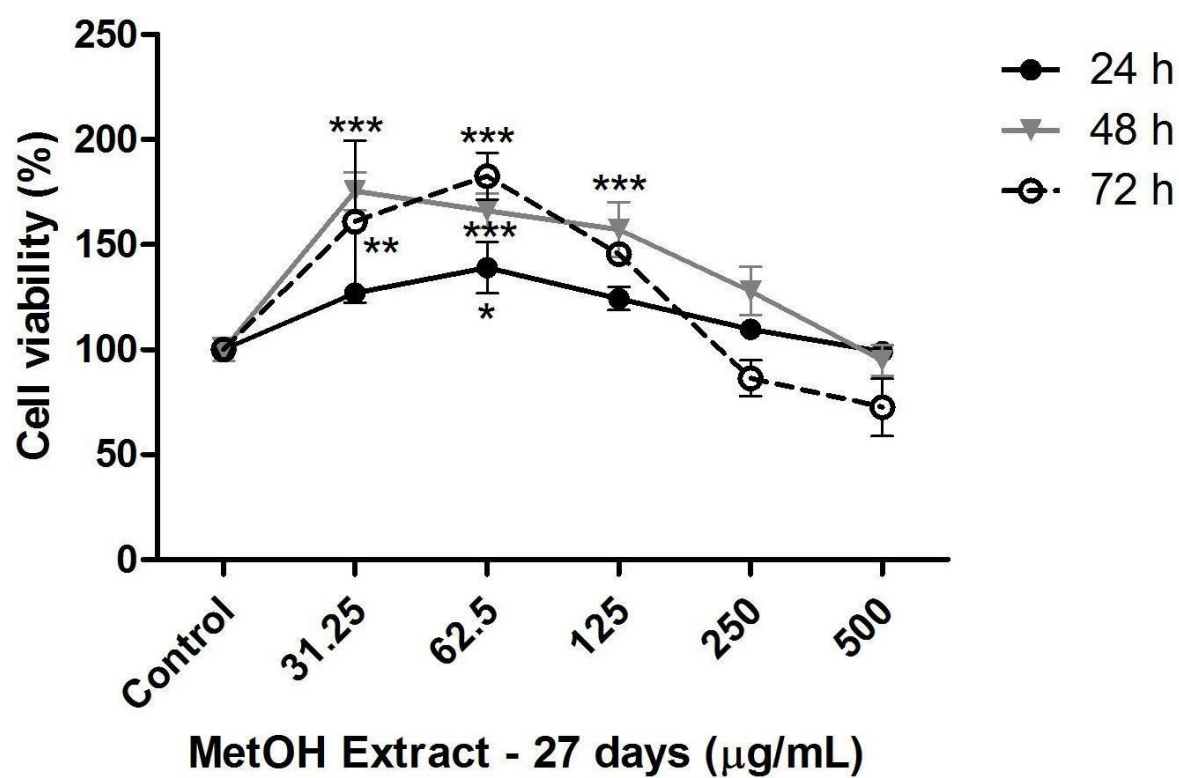


FIGURA 3

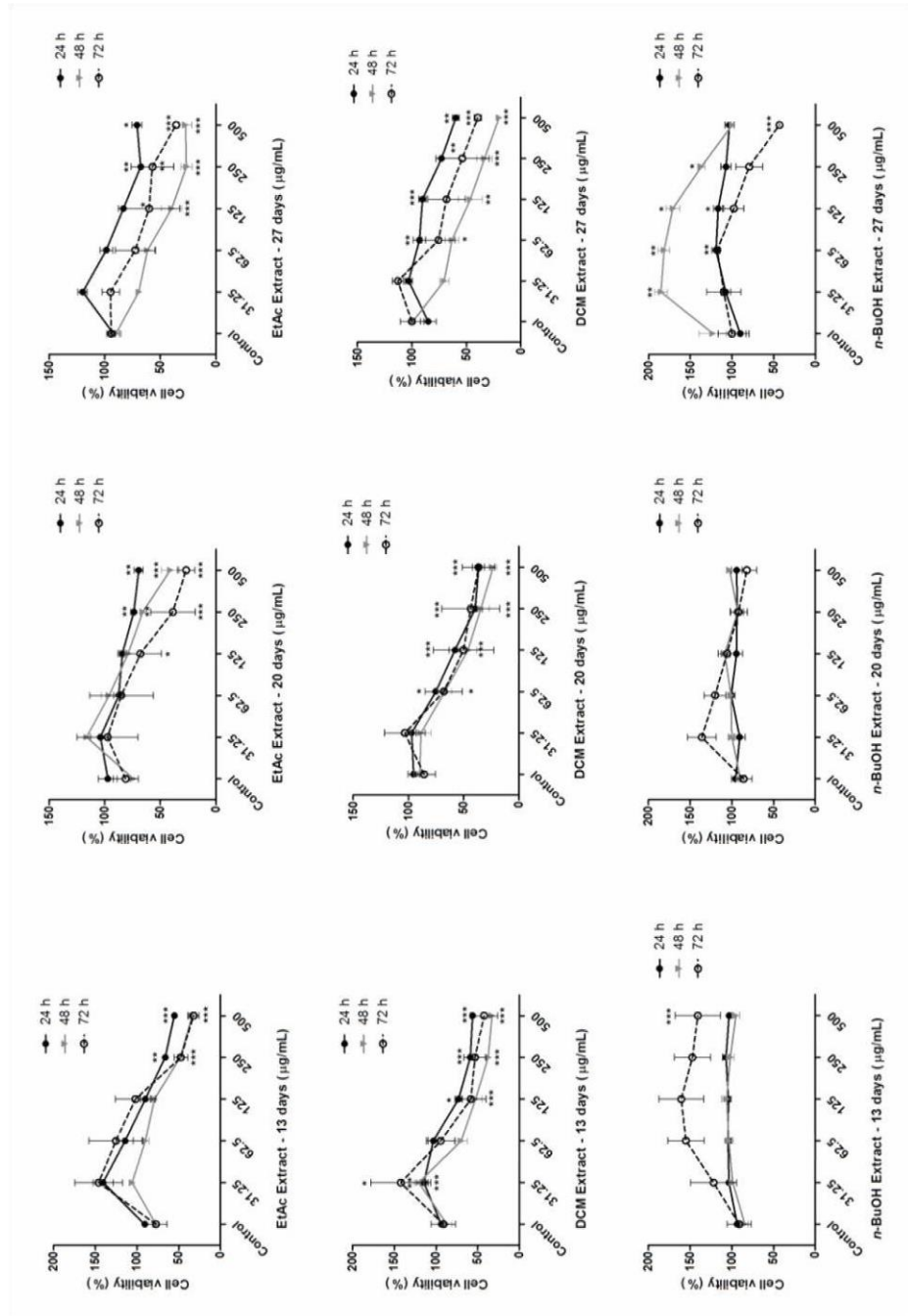


FIGURA 4

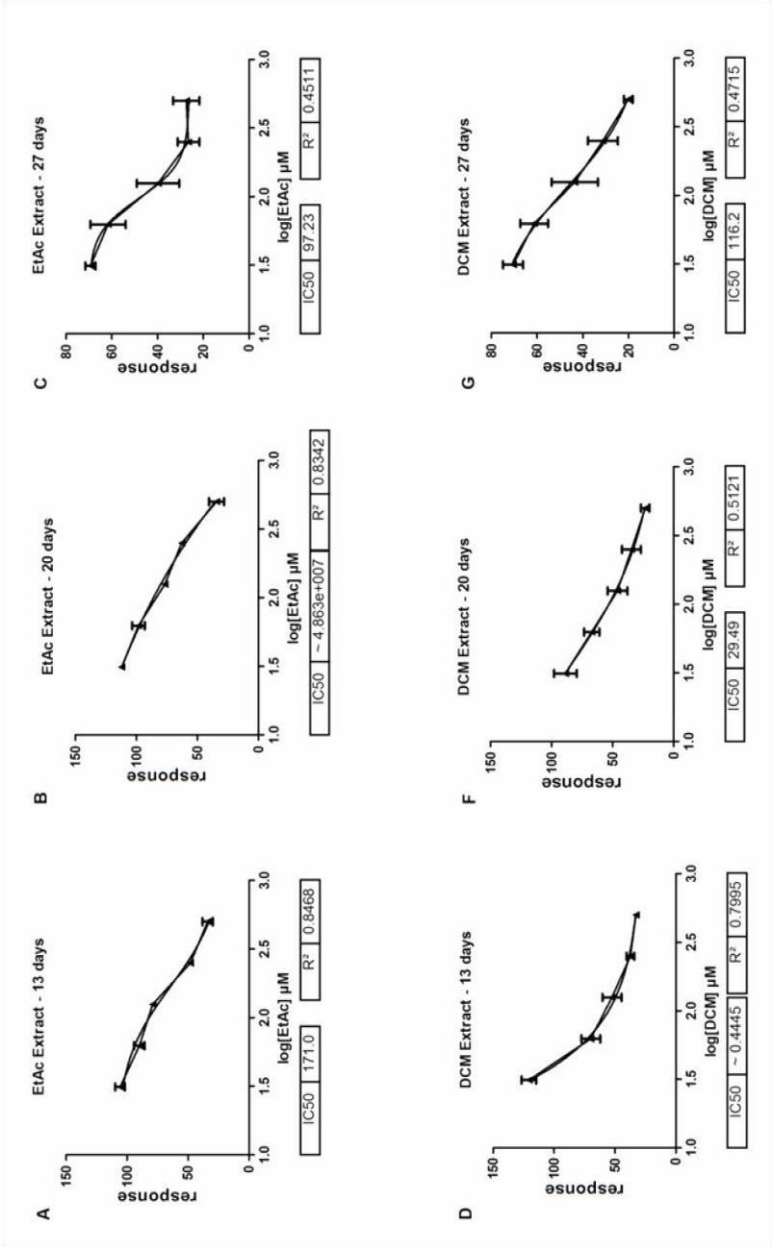


FIGURA 5

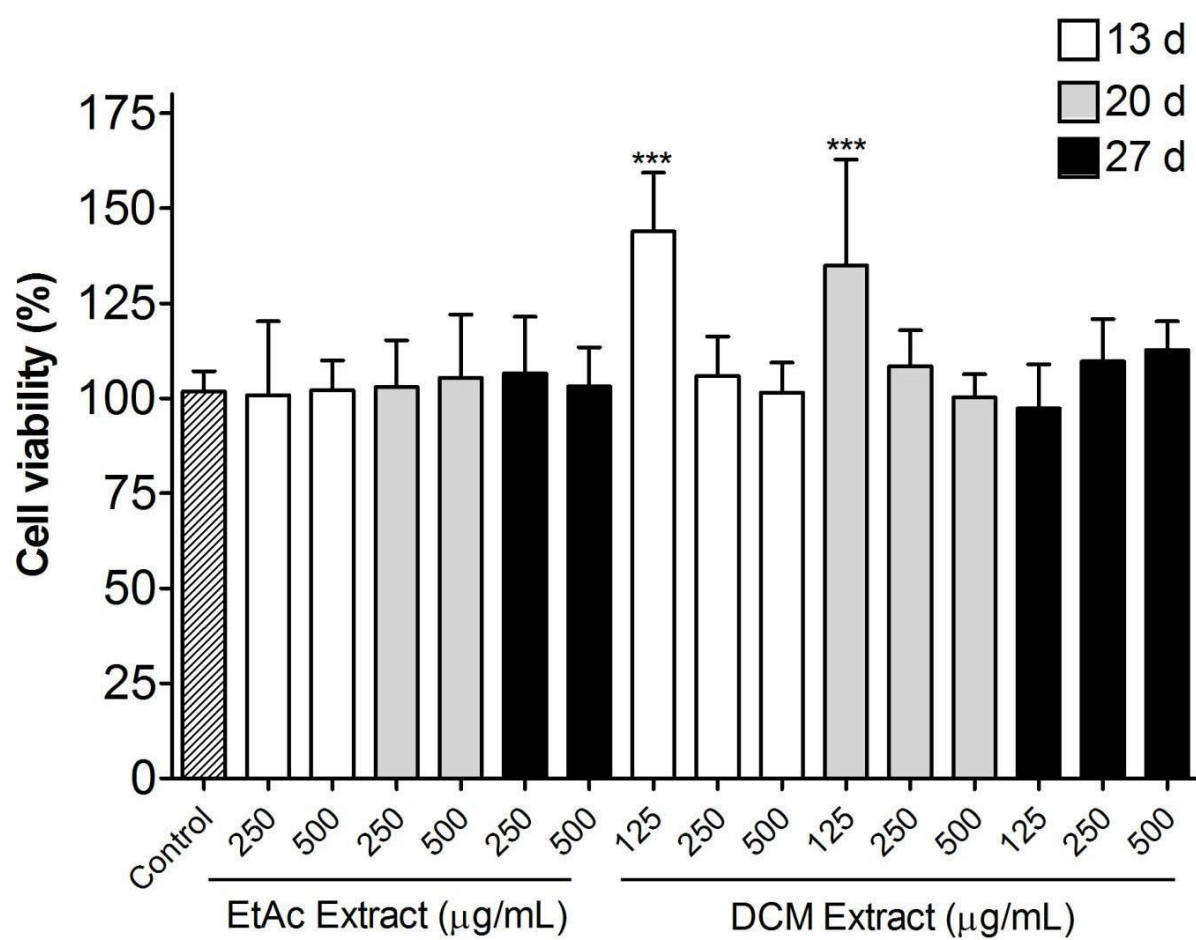


FIGURA 6

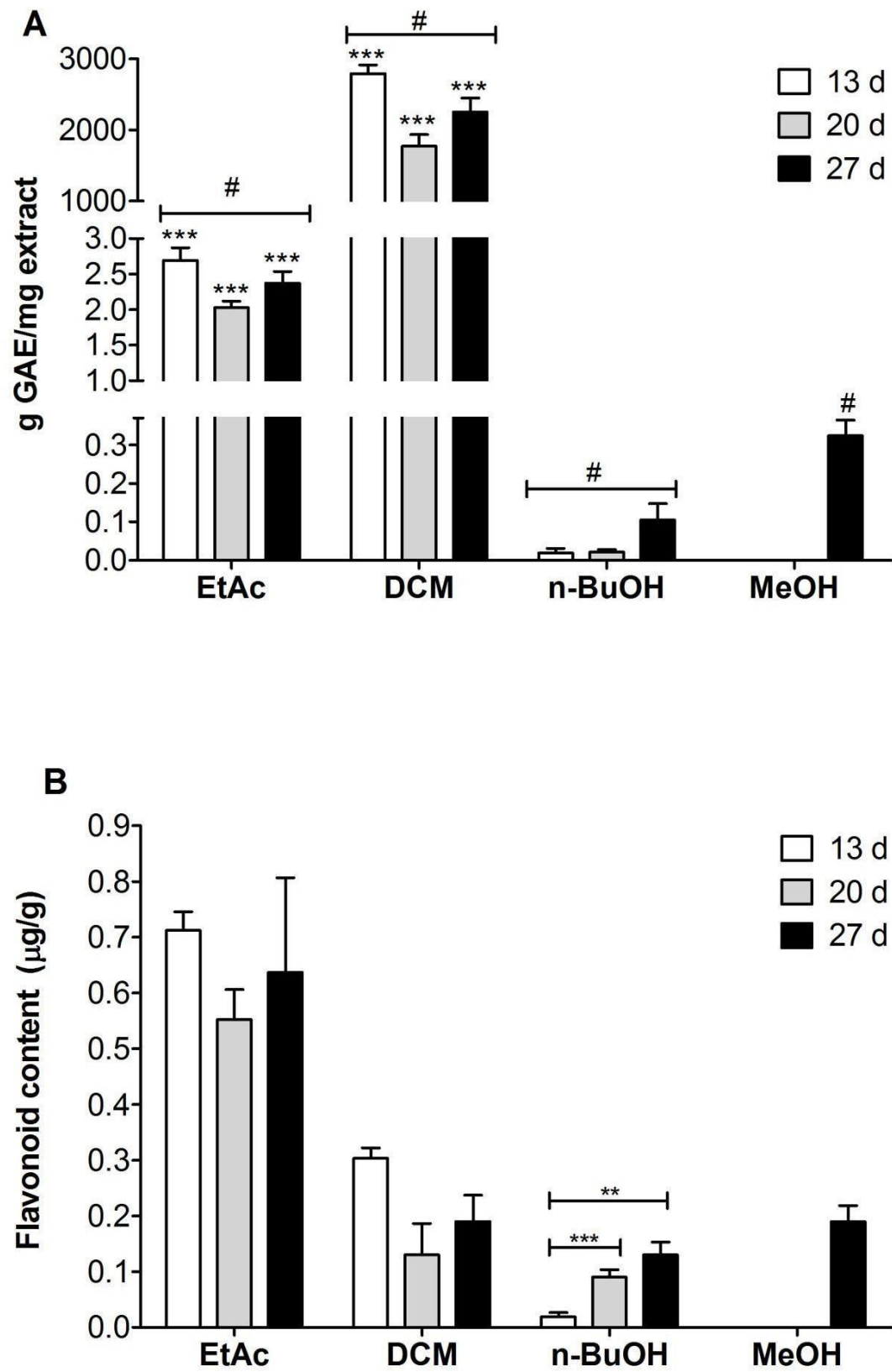


FIGURA 7



## 5. Conclusões

Nosso trabalho foi capaz de demonstrar o efeito antiglioma dos extratos de fungo endofítico obtido de folhas sadias de *Mikania hastato-cordata* coletada no horto do Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas, RS - Brasil.

- e-DCM e e-AcoEt (13, 20 e 27 dias) exibiram os melhores efeitos antiglioma em relação ao extrato obtido com n-butanol (e-n-BuOH) e que o extrato obtido do micélio do fungo (27 dias), com o solvente orgânico metanol.
- Os extratos que exibiram melhor efeito antiglioma, e-DCM e e-AcoEt, foram avaliados quando a citotoxicidade em células normais de cultura primária de astrócitos, e observados que nenhum dos extratos apresentaram efeito citotóxico para este tipo celular.
- Concentrações de compostos fenólicos totais foram determinadas para todos os extratos, sendo que os e-DCM e e-AcoEt foram os que apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos. Sendo a quantidade de fenóis determinada para o e-DCM significativamente maior que aquela encontrada para o e-AcoEt, em todos os tempos de cultivo da biomassa fúngica.
- A quantificação dos flavonoides foi determinada para todos os extratos obtidos. Todos os e-AcoEt apresentaram quantidades significativamente maiores de flavonóides.

Este estudo corrobora o achado de outros autores de que fungos endofíticos representam uma fonte promissora para a busca de novos compostos com propriedades farmacêuticas. Novos estudos se mostram necessários para o estabelecimento das estruturas dos compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos avaliados neste trabalho, bem como a presença de outros compostos que possam estar envolvidos com a atividade antiglioma observada.

## Referências

- AHMED, M.; RAHMAN, M.T.; ALIMUZZAMAN, M.; SHILPI, J. A. Analgesic sesquiterpene dilactone from *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 919- 921, 2001.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: I. S. Melo; J. L. Azevedo. (Org.). **Ecologia Microbiana**. 1.ed. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, p. 117-137.
- BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R. E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A. B.; DEWHIRST, M. W.; Bigner, D. D.; RICH, J. N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 7120, n. 444, p. 756-760, 2006.
- BARROS, B. S.; SILVA, J. P; FERRO, J. N. S.; AGRA, I. K. R.; BRITO, F. A.; ALBUQUERQUE, E. D.; CAETANO, L. C.; BARRETO, E. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3, p. 526–53, 2011.
- BUTOWSKI, N. A.; SNEED, P. K.; CHANG, S. M. Diagnosis and Treatment of Recurrent High-Grade Astrocytoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 8 p. 1273-1280, 2006.
- CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.
- DIAKOS, C.; CHARLES, K. A.; MCMILLAN, D. C.; CLARKE, S. J. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 11, p. e493–e503, 2014.
- DOU, X.; ZHANG, Y.; SUN, N.; WU, Y.; LI, L. The anti-tumor activity of *Mikania micrantha* aqueous extract in vitro and in vivo. **Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 107-117, 2014.

FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; BUSHONG, E. A.; KE, E.; SODA, Y.; MARUMOTO, M.; SINGER, O.; ELLISMAN, M. H.; VERMA, I. M. Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice. **Science**, v. 338, n. 6110, p.1080–1084, 2012.

GABRILOVICH, D. I.; OSTRAND-ROSENBERG, S.; BRONTE, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. **Nature Reviews Immunology**, v.12, n.4, p. 253–268, 2013.

GOVINDAPPA, M; BHARATH, N; SHRUTHI, H.B.; SANTOYO, G. *In vitro* Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Endophytic Extracts of *Crotalaria pallida*. *Free Radicals and Antioxidants*, v. 1, n. 3, p. 79-86, 2011.

GREGÓRIO, L. E. **Fitoquímica e atividades biológicas de plantas do gênero *Mikania* (Asteraceae)**. 2008. 250f. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo.

HAAR, C. P.; HEBBAR, P.; WALLACE IV, G. C.; DAS, A.; VANDERGRIFT III, W. A.; SMITH, J. A.; GIGLIO, P.; PATEL, S. J.; RAY, S. K.; BANIK, N. L. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. **Neurochemical research**, v. 37, n. 6, p. 1192-1200, 2012. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. p646–674, 2011.

HOTTINGER, A. F. Manejo dos gliomas de alto grau – Tratamento padrão e opções futuras. Tendências atuais no tratamento de gliomas. 35º Congresso Latino-Americano de neurocirurgia – CLAN 2012. Rio de Janeiro, 2012.

HUSE, J. T.; HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews: Cancer**, v. 5, n. 10, p. 319-331, 2010.

JAFARI, S.; SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 409-421, 2014.

KATOCH, M.; SINGH, G.; SHARMA, S.; GUPTA, N.; SANGWAN, P. L.; SAXENA, A. K. Cytotoxic and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Bacopa monnieri* (L.) Pennell (Scrophulariaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 52, n. 14, p. 2-8, 2014.

KEMP, H. BOURKE, C.; WHEATLEY, W. Endophytes of perennial ryegrass and tall fescue. **Agriculture Primefact**, NSW Department of Primary Industries, n 535, 2007

KREISL, T. N. Chemotherapy for malignant gliomas. **Seminars in Radiation Oncology**, V. 19, n. 3, p. 150-154, 2009.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Report**, v. 28, n. 7, p. 1203–1207, 2011.

KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 1, n. 72, p. 2-7, 2009.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

LAKSHMI, P. J., SELVI, K. V. Anticancer potentials of secondary metabolites from endophytes of *Barringtonia acutangula* and ITS molecular characterization. International. **Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 2, p. 44-55, 2013.

LATHIA, J. D.; MACK, S. C.; MULKEARNS-HUBERT, E. E.; VALLENTIM, C. L. L.; RICH, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. **Genes & Development**, v. 12, n. 29, p. 1203-1217, 2015.

LI, A. N., LI, S., ZHANG, Y. J., XU, X. R., CHEN, Y. M., & LI, H. B. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020-6047, 2014.

LIEBELT, B. D.; SHINGU, T.; ZHOU, X.; REN, J.; SHIN, S. A.; HU, J. Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy. **Stem Cells International**, v. 2016, n. 1, p. 1-10, 2016.

LIZARTE NETO, F. S.; TIRAPELLI, D. P. C.; AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; OLIVEIRA, F. M.; NOVAIS, P. C.; PERIA, F. M.; OLIVEIRA, H. F.; CARLOTTI JUNIOR, C. G.; TIRAPELLI, L. F. Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 71-80, 2013.

MORRONE F. B.; HORN, A. P.; STELLA, J.; SPILLER, F.; SARKIS, J. J. F.; SALBEGO, C. G.; LENZ, G.; BATTASTINI, A. M. O. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. **Journal of Neuro-oncology**, v.71, n.2, p.135-140, 2005.

NAYEEM, A. A.; KHATUN, A.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, M. Evaluation of phytochemical and pharmacological properties of *Mikania cordata* (Asteraceae) leaves. **Journal of Pharmacognosy and phytotherapy**, v. 3, p. 1-6 2011.

OLIVA, C. R.; MOELLERING, D. R.; GILLESPIE, G. Y.; GRIGUER, C. E. Acquisition of Chemoresistance in Gliomas Is Associated with Increased Mitochondrial Coupling and Decreased ROS Production. **PLOS One**, v. 6, n. 9, p. 1-10, 2010

PAUL, R. K.; JABBAR, A.; RASHID, M. A. Antiulcer activity of *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 701-703, 2000.

PÉREZ-AMADOR, M. C.; OCOTERO, V. M.; BALCAZAR, R. I.; JIMÉNEZ, F. G. Phytochemical and pharmacological studies on *Mikania micrantha* H.B.K. (Asteraceae). **Python: International Journal of Experimental Botany**, v. 79, p. 77-80, 2010.

PHILLIPS, H. S.; KHARBANDA, S.; CHEN, R.; FORREST, W. F.; SORIANO, S. H.; WU, T. D.; MISRA, A.; NIGRO, J. M.; COLMAN, H.; SOROCEANU, L.; WILLIAMS, P. M.; MODRUSAN, Z.; FEUERSTEIN, B. G.; ALDAPE, K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 3, p157–173, 2006.

POLONIO, J. C.; ALMEIDA, T. T.; GARCIA, A.; MARIUCCI, G. E.; AZEVEDO, J. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. **Genetics and Molecular Research**. v. 14, n. 3, p.7297-7309, 2015.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and Metastasis. **Nature Medicine**, v. 11, n. 19, p. 1423–1437, 2013.

RAMIREZ, Y. P.; WEATHERBEE, J. L.; WHEELHOUSE, R. T.; ROSS, A. H. Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1475-1506, 2013.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105-11, 2001.

RIBEIRO, Fernanda Pinheiro de Carvalho. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Mikania laevigata* (Asteraceae) e análise química dos extratos por CLAE-DAD**. 2011. 159f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) –

Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

RIBEIRO, F. P. C.; KAMIDAB, H. M.; ALMEIDAB, P. R.; UETANABAROC, A. P.; COSTAC, L. C.; BRANCO, A. Isolation and identification of endophytic fungi in the medicinal plant *Mikania laevigata* (Asteraceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2014.

RÍOS, E. V.; LEÓN, A.; CHÁVEZ, M. I.; TORRES, Y.; RAMÍREZ-APAN, M. T.; TOSCANO, R. A.; BRAVO-MONZÓN, A. E.; ESPINOSA-GARCÍA, F. J.; DELGADO, G. Sesquiterpene lactones from *Mikania micrantha* and *Mikania cordifolia* and their cytotoxic and anti-inflammatory evaluation. **Fitoterapia**, v. 94, p. 155–163, 2014.

RITTER, R. M.; MIOTTO, S. T. S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Jornal Hoehnea**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 309-359, 2005.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314 – 330, 2009.

RUFATTO, L. C.; GOWER, A.; SCHWAMBACH, J.; MOURA, S. Genus *Mikania*: chemical composition and phytotherapeutical activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1384-1403, 2012.

RUFATTO, L. C.; FINIMUNDY, T. C.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S. *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 883-889, 2013.

SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M. S. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 8, p. 811-822, 2005.

SANTANA, L. C. L. R.; BRITO, M. R. M.; SOUSA, G. F.; FREITAS, R. M. Propriedades físicoquímicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico padronizado a 70% das folhas de *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v.15, n.4, p.742-750, 2013.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 3, n. 122, p. 787-795, 2012.

SILVA, M. L. C. COSTA, R. S. DOS SANTOS SANTANA, A.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, Andressa Santa Brigida da. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Mikania lindleyana* DC.: validação do uso na medicina popular.** 2011. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SOEDA, A.; HARA, A.; KUNISADA, T.; YOSHIMURA, S.; IWAMA, T.; PARK, D. M. The Evidence of Glioblastoma Heterogeneity. **Scientific Reports**, v. 5, n. 7979, p. 1-6, 2015.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535–544, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Reviews**. vol.67, n. 4, p. 491–502, 2003.

STROBEL, G. A.; D. M. LONG. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society of Microbiology News**. v. 64, p. 263-268, 1998.

STUPP R.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J. B.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J. G.; EISENHAEUER, E.; MIRIMANOFF, R. O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 10, n. 352, p. 987–996, 2005.

STUPP R.; HEGI, M. E.; MASON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; TAPHOORN, M. J. B.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; ALLGEIER, A.; FISHER, B.; BELANGER, K.; HAU, P.; BRANDES, A. A.; GIJTENBEEK, J.; MAROSI, C.; VECHT, C. J.; MOKHTARI, K.; WESSELING, P.; VILLA, S.; EISENHAEUER, E.; GORLIA, T.; WELLER, M.; LACOMBE, D. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 10, p. 459–466, 2009.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, 23, p. 9 – 19, 2009.

VERMA, V. C.; GANGWAR, M.; YASHPAL, M.; NATH, G. Anticestodal Activity of Endophytic *Pestalotiopsis* sp. on Protoscoleces of Hydatid Cyst *Echinococcus granulosus*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-11, 2013

YADAV, M. YADAV, A. YADAV, J. P. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 256-261, 2014.

XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y. Q.; TANG, J. J.; ZHANG, A. L.; GAO, J. M.. Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 16, n 62. p.3584- 3590, 2014.

WAHLE, K. W.J.; ROTONDO, D.; BROWN, I.; HEYSET, S. D. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. In: **Bio-Farms for Nutraceuticals**. Springer US, 2010. p. 36-51.

WANG, J.; COX, D. G.; DING, W.; HUANG, G.; LIN, Y.; LI, C. Three New Resveratrol Derivatives from the Mangrove Endophytic Fungus *Alternaria* sp. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2840-2850, 2014.

WILSON, T. A.; KARAJANNIS, M. A.; HARTER, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical Neurology International**, v. 5, n. 64, p. 1-18, 2014.

ZAUK, A. D. et al.. Tumores do sistema nervosa central. In: I. S. Melo; M. Vilela; A. Hackbart. (Org.). **Ocologia Básica: Experiencia multidisciplinar da UFPel**. 1.ed. Jaguariuna: EDITORA UNIVERSITÁRIA UFPel, 2008, p. 229-266.

ZHAO, J.; MOU, Y.; SHAN, T.; LI, Y.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, J. Antimicrobial Metabolites from the Endophytic Fungus *Pichia guilliermondii* Isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Molecules**, v. 11, n. 15, p. 7961 – 7970, 2010.

ZHAO, J. et al.. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants In: MENDEZ-VILAS, A. (Org.) **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, 1 ed. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2012, pp. 567–576.