

Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura *in vitro*

Anticancer drug screening: standardization of in vitro wound healing assay

Vitor M. Almeida; Maximino Alencar Bezerra Jr.; Jéssica C. Nascimento; Lidia Maria F. Amorim

Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

RESUMO

Introdução: Gliomas são caracterizados por terem rápida proliferação e invasão agressiva no tecido cerebral circundante normal. Em laboratórios médicos, o ensaio de ranhura – um teste *in vitro* – destaca-se por ser um método simples, fácil, barato e acessível para avaliar a migração e a proliferação celular. **Objetivo:** Padronizar o ensaio de ranhura, utilizando drogas antimicrotúbulos como controles positivos. **Métodos:** As células de glioma U87MG foram semeadas em diferentes concentrações e, após 24 horas, a monocamada foi arranhada usando ponteiros de diferentes tamanhos para criar uma fenda sem células. As células foram então tratadas com colchicina e paclitaxel, com meio em ausência ou presença de soro fetal bovino. A ranhura foi fotografada com auxílio de microscópio invertido, e a área da ranhura foi medida por meio do programa Image J. **Resultados:** Ranhuras com bordas mais bem definidas e monocamada com aproximadamente 90% de confluência foram obtidas com $1,5$ e 2×10^5 células/poço. A largura e a área das ranhuras obtidas foram, respectivamente, $948 \mu\text{m}/2,193 \text{mm}^2$; $964 \mu\text{m}/2,266 \text{mm}^2$; e $1448 \mu\text{m}/3,221 \text{mm}^2$ para as ponteiros de 10, 200 e 1000 μl . A colchicina inibiu o fechamento das ranhuras em 12,6% ou 2,4%, tanto na presença quanto na ausência de soro; o paclitaxel, em 3,4% e 6,7%, respectivamente. **Conclusão:** Em condições padronizadas, colchicina e paclitaxel podem ser usados como controles positivos eficientes no teste *in vitro* de ranhura.

Unitermos: colchicina; paclitaxel; glioma; proliferação celular; movimento celular; ensaios de seleção de medicamentos antitumorais.

ABSTRACT

Introduction: Gliomas are characterized by rapid proliferation and aggressive invasion into normal surrounding brain tissue. In medical laboratories, the *in vitro* wound healing assay stands out as a simple, easy, inexpensive and affordable method to evaluate cell migration and proliferation. **Objective:** To standardize the *in vitro* wound healing assay using antimicrotubule drugs as positive controls. **Methods:** U87MG glioma cells were seeded at different densities and, after 24 h, the monolayer was scratched using different micropipette tip size to create a gap with no cells. The cells were then treated with colchicine and paclitaxel in culture medium with the presence or absence of fetal bovine serum. The wound was photographed with the aid of an inverted microscope and the wound area was measured using the Image J software. **Results:** Better defined edges scratches and monolayer with approximately 90% confluence were obtained at 1.5 and 2×10^5 cells/well density. The width and area of the scratch were, respectively, $948 \mu\text{m}/2.193221 \text{mm}^2$; $964 \mu\text{m}/2.266 \text{mm}^2$ and $1448 \mu\text{m}/3.221 \text{mm}^2$ to 10, 200 and 1000 μl micropipette tips. Colchicine inhibited wound closure by 12.6% or 3.4%, both in the presence or absence of serum; paclitaxel 2.4 and 6.7% respectively. **Conclusion:** Under standardized conditions, colchicine and paclitaxel proved to be efficient positive controls into the *in vitro* wound healing assay.

Key words: colchicine; paclitaxel; glioma; cell proliferation; cell movement; antitumor drug screening assays.

RESUMEN

Introducción: Gliomas se caracterizan por rápida proliferación e invasión agresiva del tejido cerebral normal circundante. En laboratorios médicos, el ensayo de cierre de herida – una prueba *in vitro* – se destaca por ser un método simple, fácil, de bajo costo y accesible para evaluar la migración y la proliferación celular. **Objetivo:** Estandarizar el ensayo de cierre de herida usando agentes anti-microtúbulos como control positivo. **Métodos:** Las células de glioma U87MG fueron sembradas en diferentes concentraciones y, después de 24 horas, la monocamada fue rayada con punteras de diferentes tamaños para crear una bendidura sin células. Las células fueron entonces tratadas con colchicina y paclitaxel, en medio con o sin suero fetal bovino. La ranura fue fotografiada con la ayuda de un microscopio invertido, y el área de la ranura fue medida mediante el programa Image J. **Resultados:** Ranuras con bordes más bien-definidos y monocamada con alrededor de 90% de confluencia se obtuvieron con $1,5$ y 2×10^5 células/pozo. La anchura y el área de las ranuras obtenidas fueron, respectivamente, $948 \mu\text{m}/2,193 \text{ mm}^2$; $964 \mu\text{m}/2,266 \text{ mm}^2$; y $1448 \mu\text{m}/3,221 \text{ mm}^2$ para las punteras de 10 , 200 y $1000 \mu\text{l}$. La colchicina inhibió el cierre de las ranuras en $12,6\%$ o $2,4\%$, tanto en presencia como en ausencia de suero; el paclitaxel, $3,4\%$ y $6,7\%$, respectivamente. **Conclusión:** En condiciones estandarizadas, colchicina y paclitaxel pueden ser usados como control positivo en el ensayo de cierre de herida *in vitro*.

Palabras clave: colchicina; paclitaxel; glioma; proliferación celular; movimiento celular; ensayos de selección de medicamentos antitumorales.

INTRODUÇÃO

Metodologias para examinar a migração celular são muito úteis e importantes para uma ampla gama de testes e exames biomédicos, como a triagem de drogas anticâncer. Embora existam vários métodos para visualizar a migração celular no campo da medicina laboratorial, como o ensaio de câmaras Transwell/Boyden, ensaios de barreira e ensaios com base em microfluídica, esses métodos são frequentemente caros e não acessíveis a todos os laboratórios. O ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*, também conhecido como “ensaio de ranhura”, é um método simples, versátil e econômico para estudar a migração celular. Nesta técnica, uma fenda é gerada em uma monocamada de células confluentes, e a taxa de fechamento da ranhura e a migração celular podem ser quantificadas fotografando com um microscópio invertido em vários intervalos de tempo⁽¹⁾.

A migração celular é essencial para muitos processos biológicos, como reparo e regeneração tecidual. Entretanto, a regulação aberrante desse processo impulsiona a progressão de muitas doenças, incluindo a invasão e metástase do câncer⁽²⁾. Os componentes do citoesqueleto, como os filamentos de actina e tubulina, são cruciais para a migração celular. Essas proteínas formam polímeros dinâmicos altamente versáteis, capazes de organizar organelas citoplasmáticas e compartimentos intracelulares, definindo a polaridade celular e gerando forças de protrusão e contração^(3, 4). Devido a isso, o citoesqueleto

é considerado um dos alvos mais promissores na triagem de drogas anticâncer. Drogas capazes de atingir ambos os filamentos de actina⁽⁵⁾, como a rede de microtúbulos, formada por tubulina⁽⁶⁾, promovem a desregulação da estrutura celular e o interrompimento dos processos proliferativos.

Estima-se que haverá 23,6 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, a cada ano, até 2030, se as tendências recentes de incidência de grandes cânceres e crescimento populacional forem vistas globalmente no futuro. Isso é 68% mais casos do que em 2012, com um crescimento ligeiramente maior nos países de baixo e médio índice de desenvolvimento humano (IDH) (66% mais casos em 2030 do que em 2012) do que nos países com IDH alto e muito alto (56% a mais em 2030 de 2012)⁽⁷⁾. O glioblastoma é um glioma astrocítico maligno associado a prognósticos sombrios devido à sua capacidade de migrar e infiltrar-se difusamente no parênquima cerebral. Após a resseção cirúrgica desse tipo de tumor, a população residual de células invasivas dá origem a um tumor recorrente que, em mais de 90% dos casos, se desenvolve imediatamente adjacente à margem de resseção ou a vários centímetros da cavidade de resseção⁽⁸⁾.

O objetivo deste trabalho foi padronizar o ensaio de ranhura a ser utilizado na avaliação de substâncias com atividade proliferativa e migratória sobre o glioma e outras células cancerígenas. Colchicina⁽⁹⁻¹¹⁾ e paclitaxel⁽¹²⁻¹⁵⁾, que possuem atividade antimicrotúbulos, foram utilizados como controles positivos, uma vez que são capazes, respectivamente, de desestabilizar e estabilizar os microtúbulos.

MÉTODOS

Cultura de células

A linhagem de glioblastoma humano (GBM) U87MG (ATCC® HTB-14TM) foi mantida em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C.

Plaqueamento e realização da ranhura

A linhagem celular U87MG foi tripsinizada, contada em diferentes concentrações de células (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 × 10⁵ células/500 µl) e foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24 horas de incubação a 37°C, as monocamadas foram arranhadas, criando uma fenda sem células, utilizando uma ponta de micropipeta estéril sob um ângulo de cerca de 90 graus para manter a largura do fenda limitada. Para determinar o tamanho apropriado da ranhura, três diferentes tamanhos de pontas de micropipeta (1000, 200 e 10 µl) foram utilizados. O meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com meio sem soro (500 µl) para remover as células no sobrenadante.

Ensaio de ranhura

O paclitaxel 10 (Sigma)⁽¹⁵⁾ e a colchicina 1 (Sigma)⁽¹⁶⁾ foram diluídos em meio DMEM/F12 e utilizados como controles positivos do ensaio na presença de (10%) ou ausência de SFB, utilizando 1,5 × 10⁵ células/500 µl/poço para formar a monocamada de células. Células tratadas com meio (500 µl) suplementadas com ou sem soro foram utilizadas como controle negativo.

Quantificação da ranhura

A área da ranhura foi fotografada utilizando um microscópio invertido (Bel Photonics inv 100) antes da adição da droga (tempo 0), bem como após 24 h do tratamento, utilizando uma objetiva que permite a visualização de ambas as bordas da ferida com aumento de 40×. As imagens foram salvas como arquivos *.tif para obter o mesmo campo durante a aquisição da imagem. Os pontos de referência foram feitos desenhando uma linha reta, com uma caneta marcadora de ponta ultrafina, no fundo externo dos poços da placa. A marca de referência foi colocada fora do campo de imagem de captura, mas dentro do campo de visão microscópico. Duas áreas da fenda, acima e abaixo da linha guia, foram medidas em cada poço em 0 e 24 h de tratamento utilizando o *software* Image J (*Software* 1.48q, Rayne Rasband,

National Institutes of Health, EUA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)⁽¹⁷⁾. O *software* Image J foi utilizado para detectar automaticamente a posição da extremidade da borda⁽¹⁸⁾ e todo o procedimento foi descrito no Material Suplementar. O fechamento da ranhura (%) foi quantificado utilizando a mudança percentual na área de medição normalizada dividida pela área aberta original de acordo com: % fechamento da ranhura = $[A(0) - A(t)/A(0)] \times 100$ ⁽¹⁸⁾ onde a área no tempo zero (0) e a área após o tempo de incubação (t) foram utilizadas para calcular a porcentagem de fechamento da ranhura.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como porcentagem do fechamento da ferida, considerando a área medida no tempo zero como 0%. As comparações entre os tratamentos foram realizadas utilizando o teste de análise de variância (Anova) seguido de comparação múltipla do teste de Dunnett (foram avaliados três conjuntos de dados), utilizando células não tratadas como controle. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (DP) e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 5.0 (San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

Padronização do ensaio de ranhura utilizando células U87MG

Os passos realizados no ensaio de ranhura *in vitro* foram descritos na **Figura 1**. A densidade ideal para a linhagem celular U87MG foi 1,5 e 2 × 10⁵ células (**Figura 2A**). Abaixo dessa densidade de células, a confluência era menor que 90% e, acima disso, as células começaram a se sobrepor e se desprenderam da placa durante o experimento. Diferentes concentrações de células também foram arranhadas com três tamanhos de ponta de micropipeta. O objetivo era criar uma zona livre de células com bordas retas por meio da monocamada de células a ser visualizada e fotografada após 24 horas. A densidade celular tem grande influência para uma ranhura homogênea. À medida que a concentração celular aumentava, as bordas da ranhura começavam a formar aglomerados de células que podiam atrapalhar a quantificação da ranhura e também, com a menor concentração de células, entalhes eram criados na borda da superfície da ferida (**Figura 2B**). Em 1,5 e 2 × 10⁵ células, as três pontas da micropipeta foram eficientes para realizar a ferida

(Figura 2B), diferindo apenas na área ($p < 0,05$). As áreas da ranhura foram respectivamente 1.908, 2.508 e 2.787 mm² para pontas de micropipeta branca (10 µl), amarela (200 µl) e azul (1000 µl). Mesmo na presença de soro (Figura 3A e 3B), as lacunas realizadas com ponta de micropipeta branca não foram totalmente fechadas após 24 horas de incubação; optou-se por realizar os experimentos utilizando a ponteira branca, pois ela apresentava a menor área riscada entre as duas outras pontas testadas nos poços.

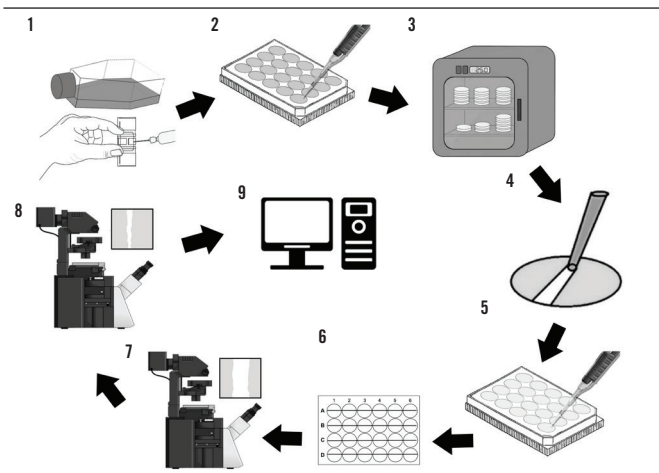


FIGURA 1 – Etapas para realizar o ensaio de cicatrização de ranhura *in vitro*

1. Tripsinização e contagem de culturas de células; 2. Semeadura de placas com vários poços; 3. As células puderam realizar ligações, se espalhar e formar uma monocamada confluyente de 90% em um período de 24 horas; 4. fabricação das ranhuras; 5. lavagem dos poços com PBS gelado e aplicação de droga em meio com ou sem SFB; 6. desenho de uma linha reta no fundo das placas; 7. tempo de captura de imagem e medição do vão – 0 h; 8. tempo de incubação e captura de imagens e medição do vão – 24 h; 9. análise de dados.

PBS: solução salina tamponada com fosfato; SFB: soro fetal bovino.

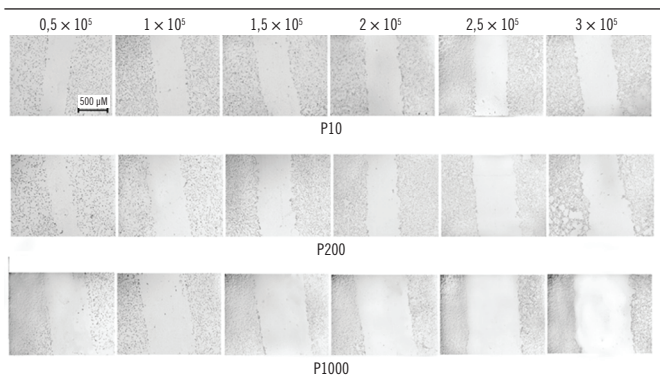


FIGURA 2 – Monocamada celular U87MG e padronização do ensaio de ranhuras *in vitro*

A) As células U87MG foram plaqueadas em diferentes densidades e, após 24 horas de incubação, foram fotografadas para observação da confluência das monocamadas celulares. Em 0,5 e 1 × 10⁵ células por poço, a monocamada celular apresentou baixa confluência e, em 2,5 e 3 × 10⁵ células por poço, as células começaram a se sobrepor; B) a monocamada foi então arranhada com três tamanhos de pontas de micropipeta. As densidades celulares de 1,5 e 2 × 10⁵/500 µl apresentaram confluência ideal para a realização do ensaio.

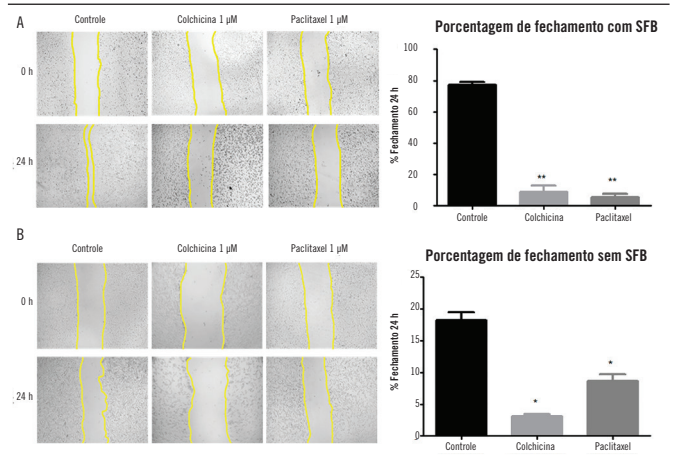


FIGURA 3 – Fechamento *in vitro* da área de ferida do ensaio de ranhura após 24 horas de tratamento com colchicina ou paclitaxel na presença ou ausência de soro

As células U87MG cells foram plaqueadas a 1,5 × 10⁵ células/poço e tratadas por 24 horas com 1 µM de colchicina ou 1 µM de paclitaxel diluído em DMEN/F12 com (A) ou sem (B) o soro. As imagens foram capturadas por câmera acoplada ao microscópio Bel inv 100, com ampliação de 40× antes do tratamento (tempo 0) e após 24 horas de tratamento e comparadas com o controle negativo sem drogas. As imagens foram analisadas no software Image J para avaliar a ranhura por quantificação das áreas ocupadas pela lesão. O gráfico mostra os valores médios e o erro padrão de três experimentos em quadruplicados. Teste Anova seguido pelo teste Dunnett post-hoc test; ***p < 0,001.

Anova: análise de variância; SFB: soro fetal bovino.

Colchicina e paclitaxel como controles no ensaio de ranhura

O ensaio de ranhura foi realizado utilizando os fármacos colchicina e paclitaxel diluídos em meio com (Figura 3A) ou sem (Figura 3B) SFB (10%). Ambas as drogas foram capazes de inibir a migração celular na presença ou ausência de soro ($p < 0,05$) e, a presença de soro não teve influência na área da ferida ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Monocamada de células U87MG e padronização do ensaio de ranhura

Embora o ensaio de ranhura *in vitro* seja uma fenda reta, a falta de padronização em sua execução dificulta a comparação de resultados e a reprodução de experimentos. O número necessário de células para formar uma monocamada confluyente de 90%⁽¹⁹⁻²¹⁾ precisa ser determinado de acordo com o tipo de célula e o tamanho dos poços da placa. A linhagem celular escolhida para o estudo foi U87MG, uma linhagem estabelecida de glioblastoma humano, caracterizada por sua alta taxa de proliferação e migração^(22, 23), com tempo de duplicação da população de aproximadamente 34 h (ATCC, 2012) e tamanho de 12-14 µm (<http://bionumbers.hms.harvard.edu>). Na literatura, o ensaio de ranhura foi descrito com

diferentes tipos celulares, como células de fibroblastos^(24, 25) e células cancerígenas, incluindo glioblastoma⁽²⁶⁻²⁸⁾, câncer de mama^(20, 21, 29), e câncer de ovário⁽³⁰⁻³²⁾. Além disso, foi encontrada uma elevada variação no número de células utilizadas para obter a monocamada celular a ser riscada, como $1 \times 10^{5(21, 30)}$, $2 \times 10^{5(29, 33)}$ e $1 \times 10^{6(19, 34)}$. Outros autores descreveram que as células foram plaqueadas para obter uma confluência de 90% em placas de múltiplos poços⁽¹⁹⁻²¹⁾. O uso de células U87MG no ensaio de ranhura também foi encontrado na literatura⁽³⁵⁾, porém utilizando placas de seis poços. O ensaio de ranhura pode ser realizado em qualquer configuração de placa disponível. A utilização de placas de 24 poços obtém uma triagem rápida em comparação com placas de 12 ou seis poços. Essas abordagens minimizam os custos de teste, reduzindo as quantidades de composto de teste e reagente utilizados. O intervalo ideal de densidade de linha celular U87MG foi $1,5$ e 2×10^5 , correspondendo a $80-107 \times 10^3$ células/cm². Embora essa densidade possa ser utilizada como referência, o ensaio deve ser ajustado de acordo com o tipo de célula particular a ser estudado.

Para simular ferimentos em um tecido, a abordagem mais comum é criar uma lacuna arranhando uma monocamada confluenta com uma ponta de pipeta, agulha ou outra ferramenta pontiaguda. O tamanho das pontas das micropipetas utilizadas para produzir a ferida também apresentou variação^(26, 35-37). Todos os três tamanhos de ponta mostraram-se eficientes para realizar a ferida como relatado anteriormente^(26, 35-37). No entanto, à medida que a concentração celular aumentava, as feridas se tornavam menos homogêneas, formando aglomerados celulares nas bordas da ferida. Como a ranhura é criada manualmente, pode ser difícil gerar ferimentos reprodutíveis. É importante inclinar a pipeta corretamente, assim como aplicar uma pressão consistente para criar uma largura de fenda consistente. Também é importante lavar duas vezes com solução salina tamponada com fosfato ou meio soro livre antes do tratamento e a aquisição da imagem serem iniciados. A lavagem removerá os detritos das células danificadas ou mortas, particularmente após arranhes mecânicos.

Para reduzir o risco de proliferação celular e comprometer o estudo da migração, uma dose baixa do inibidor da proliferação mitomycin C pode ser utilizada. Mitomycin C (2-10 ml para parar a proliferação de 2-5 h antes de retirar), um antibiótico antitumoral que provoca *cross-linking* de ácido desoxirribonucleico (DNA) e inibição da síntese de DNA, pode ser utilizado para parar a mitose em várias etapas. No entanto, a dose precisa ser cuidadosamente otimizada para evitar efeitos tóxicos que possam afetar a migração celular. O método mais comum para suprimir a proliferação celular em ensaios de ranhura é o uso de baixas concentrações de SFB ou ausência completa no meio celular (privação de soro). No entanto, a duração da privação de soro e as concentrações de soro necessárias precisam ser rigorosamente determinadas para cada linhagem celular estudada, uma vez que as células primárias

não toleram a privação sérica, bem como as linhagens celulares estabelecidas.

As drogas escolhidas para serem testadas foram colchicina e paclitaxel. Ambos são fármacos conhecidos com atividade sobre os microtúbulos^(38, 39) e têm ação comprovada na migração^(39, 40) e na proliferação celular^(41, 42). Na literatura, há uma grande variação, tanto na concentração quanto no tempo de exposição desses fármacos testados em diferentes tipos celulares. Na padronização do ensaio de ranhura, as concentrações de $1 \mu\text{M}$ para colchicina⁽⁴³⁾ e $1 \mu\text{M}$ para paclitaxel⁽⁴⁴⁾ foram estabelecidas utilizando-se, como base, a literatura. Tanto a colchicina como o paclitaxel demonstraram ser uma boa escolha de controles positivos para a realização do ensaio de ranhura, mesmo na presença de 10% de soro.

Quantificação da ranhura

A migração celular pode ser quantificada utilizando a distância média da largura da ranhura entre as suas extremidades. Muitas medidas são necessárias devido à irregularidade das bordas e essa quantificação manual pode ser muito demorada. A largura da ferida (mm) deve diminuir à medida que a migração celular progride ao longo do tempo. A migração celular também pode ser medida utilizando as áreas da ranhura. A área da ranhura pode ser calculada rastreando manual ou automaticamente a área livre de células em imagens capturadas utilizando o *software* de domínio público Image J (NIH, Bethesda, MD). Diferentes tipos de fórmulas matemáticas foram utilizados para avaliar o fechamento da fenda em diferentes períodos de tempo. Alguns usam fórmulas cujos resultados são apresentados utilizando escalas métricas. As unidades de medida de comprimento podem gerar ambiguidades ao converter as proporções de uma imagem digital (representada por pixels) para mm. Portanto, a representação de um resultado que não utiliza unidades baseadas na medida de comprimento, como a utilizada neste estudo, pode contornar o problema. Em condições normais, a área da ferida (mm ou pixel) diminuirá com o tempo [área da ferida = $A(0) - A(t)/t$]. Alternativamente, a migração pode ser expressa como a alteração percentual na área de medição normalizada para a área aberta original [fechamento da ferida % = $A(0) - A(t)/A(0) \times 100$].

A quantificação da ranhura manual utilizando *software* de imagem proporciona maior precisão nos valores da área da fenda, levando em consideração as diferentes irregularidades nas bordas proporcionadas pela implementação da medida manual ou automática. Outros *softwares*, além do Image J, são utilizados pela literatura e também têm sido eficientes nesses quesitos por possuírem ferramentas de quantificação semelhantes ao Image J⁽¹⁸⁾.

CONCLUSÃO

A padronização do ensaio de ranhura utilizando uma linha celular de glioma na placa de 24 poços múltiplos foi bem-sucedida. Tanto a colchicina como o paclitaxel mostraram inibição no

fechamento da fenda da monocamada mesmo na presença de 10% de soro e podem ser utilizados como controles positivos da técnica. Portanto, a técnica padronizada em glioma pode ser acessível em muitos laboratórios clínicos e médicos, com pouca ou nenhuma limitação de uso.

REFERÊNCIAS

- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007; 2(2): 329-33. PubMed PMID: 17406593.
- Condeelis J, Singer RH, Segall JE. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21(1): 695-718. PubMed PMID: 16212512.
- Fife CM, McCarroll JA, Kavallaris M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol.* 2014; 171(24): 5507-23. PubMed PMID: 24665826.
- Hall A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28(1-2): 5-14. PubMed PMID: 19153674.
- Stehn JR, Haass NK, Bonello T, et al. A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells. *Cancer Res.* 2013; 73(16): 5169-82. PubMed PMID: 23946473.
- Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005; 5: 65-71. PubMed PMID: 15720262.
- Manuscript A. Europe PMC Funders Group The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015; 1(4): 505-27. PubMed PMID: 26181261.
- Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol.* 2005; 23(10): 2411-22. PubMed PMID: 15800333.
- Malawista SE, Bensch KG. Human polymorphonuclear leukocytes: demonstration of microtubules and effect of colchicine. *Science.* 1967; 156(3774): 521-2. PubMed PMID: 6021678.
- Bhattacharyya B, Panda D, Gupta S, Banerjee M. Antimitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med Res Rev.* 2008; 28(1): 155-83. PubMed PMID: 17464966.
- Sivakumar G. Colchicine semisynthetics: chemotherapeutics for cancer? *Curr Med Chem.* 2013; 20(7): 892-8. PubMed PMID: 23210778.
- Bensch KG, Malawista SE. Microtubule crystals: A new biophysical phenomenon induced by vinca alkaloids. *Nature.* 1968; 218(5147): 1176-7. PubMed PMID: 5656643.
- de Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R, de Mey J. Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci.* 1981; 78(9): 5608-12. PubMed PMID: 6117858.
- Weaver BA. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2014; 25(18): 2677-81. PubMed PMID: 25213191.
- Liebmann JE, Cook JA, Lipschultz C, Teague D, Fisher J, Mitchell JB. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer.* 1993; 68(6): 1104-9. PubMed PMID: 7903152.
- Cronstein BN, Molad Y, Reibman J, Balakhane E, Levin RI, Weissmann G. Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. *J Clin Invest.* 1995; 96(2): 994-1002. PubMed PMID: 7543498.
- Menon MB, Ronkina N, Schwermann J, Kotlyarov A, Gaestel M. Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2009; 66(12): 1041-7. PubMed PMID: 19743408.
- Treloar KK, Simpson MJ. Sensitivity of edge detection methods for quantifying cell migration assays. *PLoS One.* 2013; 8(6). PubMed PMID: 23826283.
- Dasari VR, Kaur K, Velpula KK, et al. Up regulation of PTEN in glioma cells by cord blood mesenchymal stem cells inhibits migration via downregulation of the PI3K/Akt pathway. *PLoS One.* 2010; 5(4). PubMed PMID: 20436671.
- Oxmann D, Held-Feindt J, Stark AM, Hattermann K, Yoneda T, Mentlein R. Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. *Oncogene.* 2008; 27(25): 3567-75. PubMed PMID: 18223685.
- Yang N, Hui L, Wang YAN, Yang H, Jiang X. SOX2 promotes the migration and invasion of laryngeal cancer cells by induction of MMP-2 via the PI3K/Akt/mTOR pathway. 2014; 2651-9. PubMed PMID: 24700142.
- Jan H, Lee C, Shih Y, et al. Osteopontin regulates human glioma cell invasiveness and tumor growth in mice. 2010; 12(1): 58-70. PubMed PMID: 20150368.
- Papi A, Bartolini G, Ammar K, et al. Inhibitory effects of retinoic acid and IIF on growth, migration and invasiveness in the U87MG human glioblastoma cell line. *Oncol Rep.* 2007; 18(4): 1015-21. PubMed PMID: 17786368.
- Choritz L, Grub J, Wegner M, Pfeiffer N, Thieme H. Paclitaxel inhibits growth, migration and collagen production of human Tenon's fibroblasts – potential use in drug-eluting glaucoma drainage devices. 2010; 197-206. PubMed PMID: 19898860.
- Ramírez G, Hagoood JS, Sanders Y, et al. Absence of Thy-1 results in TGF- β induced MMP-9 expression and confers a profibrotic phenotype to human lung fibroblasts. *Lab Invest.* 2011; 91(8): 1206-18. PubMed PMID: 21577212.
- Cheng WY, Chiao MT, Liang YJ, Yang YC, Shen CC, Yang CY. Luteolin inhibits migration of human glioblastoma U-87 MG and T98G cells through downregulation of Cdc42 expression and PI3K/AKT activity. *Mol Bio Rep.* 2013; 40(9): 5315-26. PubMed PMID: 23677714.

27. Lu Y, Jiang F, Zheng X, et al. TGF- β 1 promotes motility and invasiveness of glioma cells through activation of ADAM17. *Oncol Rep.* 2011; 25(5): 1329-35. PubMed PMID: 21359495.
28. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, et al. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion – an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene.* 2008; 27(7): 918-30. PubMed PMID: 17684491.
29. Fortunati N, Marano F, Bandino A, Frairia R, Catalano MG, Boccuzzi G. The pan-histone deacetylase inhibitor LBH589 (panobinostat) alters the invasive breast cancer cell phenotype. *Int J Oncol.* 2014; 589(20): 700-8. PubMed PMID: 24366407.
30. de Jong E, Winkel P, Poelstra K, Prakash J. Anticancer effects of 15d-prostaglandin-J 2 in wild-type and doxorubicin-resistant ovarian cancer cells: novel actions on SIRT1 and HDAC. *PLoS One.* 2011; 6(9). PubMed PMID: 21957481.
31. Du F, Wu X, Liu Y, et al. Acquisition of paclitaxel resistance via PI3K – dependent epithelial – mesenchymal transition in A2780 human ovarian cancer cells. *Oncol Rep.* 2013; 1113-8. PubMed PMID: 23807572.
32. Kim BR, Yoon K, Byun HJ, Seo SH, Lee SH, Rho SB. The anti-tumor activator sMEK1 and paclitaxel additively decrease expression of HIF-1 α and VEGF via mTORC1-S6K/4E-BP-dependent signaling pathways. *Oncotarget.* 2014; 5(15): 6540-51. PubMed PMID: 25153728.
33. Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, et al. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc.* 2009; 4(11): 1591-613. PubMed PMID: 19834475.
34. Zhou Y, Su J, Shi L, Liao Q, Su QI. DADS downregulates the Rac1-ROCK1/PAK1-LIMK1-ADF/cofilin signaling pathway, inhibiting cell migration and invasion. *Oncol Rep.* 2013; 605-12. PubMed PMID: 23233092.
35. Gu JJ, Gao GZ, Zhang SM. MiR-218 inhibits the migration and invasion of glioma u87 cells through the slit2- robo1 pathway. *Oncol Lett.* 2015; 9(4): 1561-6. PubMed PMID: 25789001.
36. Yu K, Chen Z, Pan X, et al. Tetramethylpyrazine-mediated suppression of C6 gliomas involves inhibition of chemokine receptor CXCR4 expression. *Oncol Rep.* 2012; 955-60. PubMed PMID: 22710373.
37. Guo P, Lan J, Ge J, Mao Q, Qiu Y. ID1 regulates U87 human cell proliferation and invasion. *Oncol Lett.* 2013; 6(4): 921-6. PubMed PMID: 24137437.
38. Yang H, Ganguly A, Cabral F. Inhibition of cell migration and cell division correlates with distinct effects of microtubule inhibiting drugs. *J Biol Chem.* 2010; 285(42): 32242-50. PubMed PMID: 20696757.
39. Goldman RD. The role of three cytoplasmic fibers in bhk-21 cell motility. I. Microtubules and the effects of colchicine. *J Cel Biol.* 1971; 51: 752-62. PubMed PMID: 4942774.
40. Salum LB, Altei WF, Chiaradia LD, et al. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. *Eur J Med Chem.* Elsevier Masson SAS; 2013; 63: 501-10. PubMed PMID: 23524161.
41. Salai M, Segal E, Cohen I, et al. The inhibitory effects of colchicine on cell proliferation and mineralisation in culture. *J Bone Joint Surg Br.* 2001; 83(6): 912-5. PubMed PMID: 11521938.
42. Jia L, Zhang S, Ye Y, et al. Paclitaxel inhibits ovarian tumor growth by inducing epithelial cancer cells to benign fibroblast-like cells q, qq. *Cancer Lett.* Elsevier Ireland Ltd; 2012; 326(2): 176-82. PubMed PMID: 22902993.
43. Lemor M, de Bustros S, Glaser BM. Low-dose colchicine inhibits astrocyte, fibroblast, and retinal pigment epithelial cell migration and proliferation. *Arch Ophthalmol.* 1986; 104(8): 1223-5. PubMed PMID: 3741255.
44. Westerlund A, Hujanen E, Höyhty M, Puistola U, Turpeenniemi-hujanen T. Ovarian cancer cell invasion is inhibited by paclitaxel. *Clin Exp Metastasis.* 1997; 15(3): 318-28. PubMed PMID: 9174131.

AUTOR CORRESPONDENTE

Vitor Martins de Almeida  0000-0001-7902-6876
 e-mail: vitoralmeida1808@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.