

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos - CCQFA

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

Investigação da atividade antiglioma do ácido tânico: estudos *in vitro* e pré-clínico

Natália Pontes Bona

Pelotas, 2019

Natália Pontes Bona

Investigação da atividade antiglioma do ácido tânico: estudos *in vitro* e pré-clínico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Co-orientadora: Dra. Elita Ferreira da Silveira

Pelotas, 2019.

Natália Pontes Bona

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B697i Bona, Natália Pontes

Investigação da atividade antiglioma do ácido tânico:
estudos *in vitro* e pré-clínicos / Natália Pontes Bona ;
Francieli Moro Stefanello, orientadora ; Elita Ferreira da
Silveira, coorientadora. — Pelotas, 2019.

66 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências
Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade
Federal de Pelotas, 2019.

1. Câncer. 2. Glioblastoma. 3. Ácido tânico. 4.
Antioxidante. 5. Modelo animal. I. Stefanello, Francieli Moro,
orient. II. Silveira, Elita Ferreira da, coorient. III. Título.

CDD : 581.19

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Natália Pontes Bona

Natália Pontes Bona

Investigação da atividade antiglioma do ácido tânico: estudos *in vitro* e pré-clínico

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: 27/02/2019

Banca examinadora:



Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello (Orientadora)

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)



Prof. Dr. César Augusto Brüning

Doutor em Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)



Profa. Dra. Fabiana Kömmling Seixas

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

**Dedico este trabalho aos meus pais Arno
e Rosane e minha avó Catarina.**

Agradecimentos

Aos meus pais, Arno e Rosane, meu agradecimento será eterno. O apoio de vocês em todos os momentos foi e é indispensável. Esse título é de vocês também, que são o meu porto seguro, meus melhores amigos e incentivadores, que não medem esforços pra me verem feliz e realizada. Obrigada, amo vocês!

À minha avó Catarina, um ser de luz, uma rocha, minha inspiração. O que seria de mim sem ela e suas velinhas? Que a cada saída pra Pelotas fica rezando para que os bons anjinhos me acompanhem. Que torce e vibra junto comigo a cada vitória. Obrigada, te amo vovozinha.

Ao Diego, que foi muito mais que namorado nesses longos anos, foi ouvidos paciosos para as lamentações e apoio quando a vontade era desistir e voltar correndo pra casa, um amigo acima de todas as coisas. Quem esteve presente em todos os momentos. Obrigada, te amo!

Ao Pedro, meu irmão, que tem uma serenidade invejável, e uma coragem admirável de largar tudo e correr atrás dos seus sonhos, nos ensinando que ser feliz é o que interessa independente de qualquer título.

A minha dinda Sandra e a Jéssica, por estarem sempre presente em todos os momentos importantes.

As amigas que a faculdade me deu e que a vida conservou, Lari e Raquel, que me trazem serenidade e dividem comigo todos os momentos angustiantes dessa vida adulta, vibrando comigo nas minhas conquistas.

As minhas comadres Aline e Priscila e minhas afilhadas Clara e Camila, pela amizade, pelas conversas e por me apoiarem sempre.

Às minhas amigas Aline, que mesmo distante sempre está presente. Obrigada por tudo. A Duda que por mais que tenhamos nos afastado nesses últimos anos, foi peça essencial para o meu crescimento pessoal e profissional. A Clarice que sempre me apoiou e foi uma amigona nesses anos em Pelotas. Obrigada, sem vocês não estaria onde estou hoje.

A Pathise e a Mariana, por terem me ensinado tanto, por terem me direcionado para trabalhar com cultivo, e por serem essenciais nessa minha caminhada. Obrigada!

A Juliana, que me acolheu no laboratório, me transmitiu grande parte do conhecimento que tenho hoje, mas principalmente que virou uma amiga, me acompanhando em várias indagações desse mestrado. Obrigada Ju.

A Nathi, que foi minha companheira fiel nesses 2 anos, quase que de segunda a segunda, nas noites de células e nos finais de semana de biotério. Obrigada pela parceria, mas principalmente pela amizade. A Lu e a Thais, com quem pude contar diversas vezes pra desabafar o quão difícil era estar longe de casa, ninguém melhor do que elas pra me entender e me apoiar. Obrigada gurias pela amizade e por serem aquele apoio amigo nas horas mais necessitadas.

À Elita, que de doutoranda do laboratório virou minha amiga, co-orientadora e comadre. Sem palavras pra te agradecer tudo o que fizesse e fazes por mim, não só cientificamente, mas na vida. Obrigada pelo presente de ser ainda desse ser mais amado que me deu força nessa reta final, nosso Augusto.

À Mayara, pessoa sensacional, de uma humildade ímpar e um conhecimento sem igual. És minha motivação e só tenho a agradecer por papai do céu ter nos aproximado. Obrigada por sanar minhas dúvidas científicas e da vida, por estar sempre disponível seja o horário e dia que for. Sem palavras por toda a ajuda, mas principalmente pela amizade.

Aos amigos e colegas que o NEUROCAN e BIOMARCADORES me deram ao longo dessa caminhada, Vânia, Bruna, Karina, Lorenzo, Fernanda T, Pri, Simone, Juliane, Fernanda G., Bernardo, Alana, Anita, Kamila, Sabrina e Júlia obrigada por toda ajuda, pelo companheirismo e amizade.

À Rose, obrigada pela disponibilidade, pelo otimismo e segurança que nos passa, por estar sempre ali para tirar nossas dúvidas e pra dar um abraço apertado que sempre nos conforta e nos dá a certeza de que tudo dará certo.

À Fran, minha orientadora querida, de uma energia contagiante e um conhecimento inigualável! Não tenho palavras pra te agradecer por tanto. Pela disponibilidade, por acreditar em mim, pelo apoio e incentivo. Por ser uma orientadora na qual todos deveriam se espelhar. Foste essencial nessa caminhada. Obrigada por tudo!

A Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de ensino e aprendizado.

Por fim, agradeço a Deus por tudo, a toda a minha família, amigos e professores, cada um teve um papel especial nessa etapa vencida, muito obrigada!

“Os dias prósperos não vem por acaso, nascem de muito trabalho e persistência.”
(Henry Ford)

Resumo

BONA, Natália Pontes. Investigação da atividade antiglioma do ácido tânico: estudos *in vitro* e pré-clínico. 2019. Nº 66f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas.

O câncer é um conjunto de doenças que apresentam um crescimento celular desordenado invadindo tecidos e órgãos, e assim possibilitam a migração de células para outras regiões do corpo. Dentre os diversos tipos de cânceres está o glioblastoma (GBM), tumor mais comum e agressivo que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC), cujo tratamento é multimodal sendo realizada cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ). Considerando que o GBM apresenta uma alta capacidade infiltrativa, elevada taxa de proliferação e quimiorresistência ao TMZ, é necessária a busca por novas alternativas terapêuticas para um melhor prognóstico dos pacientes. O ácido tânico (AT) é um polifenol com atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa. Neste trabalho avaliamos *in vitro* a atividade antitumoral e antioxidante do AT frente a células de GBM e sua citotoxicidade em relação a cultura primária de astrócitos. As células foram expostas a diferentes concentrações de AT (6,25 a 75 μ M) durante 24, 48 e/ou 72 h. Além disso foram avaliadas a formação de colônias, migração e adesão celular, tipo de morte e o ciclo celular. Posteriormente, a ação do AT foi determinada em um modelo pré-clínico de GBM. Nesse protocolo, após implantação intracerebroventricular de células de GBM (C6), ratos Wistar receberam uma dose de 50 mg/kg/dia de AT, pela via intragástrica, durante 15 dias. Nossos resultados demonstraram que o AT apresentou uma importante ação antiglioma *in vitro*, induzindo morte celular por apoptose e parada do ciclo celular, reduzindo a formação e o tamanho das colônias, a migração e adesão celular, além de demonstrar um efeito antioxidante. Já no efeito antiglioma *in vivo*, pode-se observar que o AT diminuiu o volume do tumor em 55% acompanhado de um aumento na área de necrose intratumoral e infiltração de linfócitos, sem causar danos sistêmicos. Assim, o AT pode ser considerado um promissor agente na terapêutica para o GBM.

Palavras-chave: câncer; glioblastoma; ácido tânico; seletividade; modelo pré-clínico

Abstract

BONA, Natália Pontes. Investigation of tannic acid antiglioma activity: *in vitro* and preclinical studies. 2019. Nº 66f. Dissertation (Master degree) - Post-graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas.

Cancer is a set of diseases that present a disordered cell growth invading tissues and organs, and thus enable the migration of cells to other regions of the body. Among the various types of cancer is the glioblastoma (GBM), the most common and aggressive tumor that affects the Central Nervous System (CNS), whose treatment is multimodal and surgery followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ). Considering that the GBM presents a high infiltrative capacity, high proliferation rate and chemoresistance to TMZ, it is necessary to search for new therapeutic alternatives for a better prognosis of the patients. Tannic acid (TA), is a polyphenol with antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity. In this work, we evaluated *in vitro* the antitumor and antioxidant activity of TA against GBM cells and their cytotoxicity in relation to primary astrocyte cells. Cells were exposed to different TA concentrations (6.25 to 75 μ M) for 24, 48 and / or 72 h. In addition, the formation of colonies, migration and cell adhesion, type of death and cell cycle were evaluated. Subsequently, the action of TA was determined in a preclinical GBM model. In this protocol, after intracerebroventricular implantation of C6 GBM cells, Wistar rats received a dose of 50 mg/kg/day of TA through the intragastric route for 15 days. Our results demonstrated that TA showed an important antiglioma action *in vitro*, inducing cell death by apoptosis and cell cycle arrest, reducing formation and size of colonies, migration and cell adhesion, and demonstrating an important antioxidant effect. In the antiglioma effect *in vivo*, it is possible to observe that TA decreased tumor volume by 55%, accompanied by an increase in the area of intratumoral necrosis and lymphocyte infiltration, without causing systemic damage. Thus, TA can be considered a promising agent in the therapy for GBM.

Keywords: cancer; glioblastoma; tannic acid; selectivity; preclinical model

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Classificação dos gliomas.....	21
Figura 2	Estrutura química do composto ácido tânico.....	28

Manuscrito

Figure 1	Effect of tannic acid (TA) on the proliferation and viability of C6 rat glioma cells and proliferation of primary astrocytes... ..	49
Figure 2	Analysis of tannic acid (TA) and temozolomide (TMZ) effect on C6 glioma cell.....	50
Figure 3	Analysis of tannic acid (TA) effect on C6 rat glioma cells colony formation	51
Figure 4	Analysis of tannic acid (TA) effect on C6 rat glioma cells migration and cell adhesion	52
Figure 5	Analysis of tannic acid (TA) effect on C6 rat glioma cells cell cycle and cell death.....	53
Figure 6	Analysis of oxidative stress parameters in C6 rat glioma cells	54
Figure 7	C6 glioma cells were implanted intracerebroventricularly in adult rats.....	55
Figure 8	Overview of antiglioma activity of tannic acid <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	56

Lista de tabelas

Manuscrito

Table 1	Biochemical parameters in animals with glioma implant control and treated (TA).....	47
Table 2	Histological characteristics of implanted glioma.....	48

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AT	Ácido tânico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C6	Linhagem de glioma de rato
CAT	Catalase
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
$C_{76}H_{52}O_{46}$	Fórmula molecular do ácido tânico
CO_2	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
DBCA	Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica
DCFH-DA	Diacetato de 2', 7-diclorodi-hidrofluoresceína
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Dissulfeto de 3-carboxi-4-nitrofenila, ácido 6,6'-dinitro-3,3'-ditiodibenzóico, dissulfeto de bis (3-carboxi-4-nitrofenila)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
GBM	Glioblastoma
GPx	Glutathione peroxidase
h	Horas
HE	Hematoxilina-eosina
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
icv	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IDH	Isocitrato desidrogenase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDM2	Minuto duplo 2 murino

m ²	Metro quadrado de superfície corporal
min	Minutos
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2-5-difeniltetrazólio
nm	Nanometro
O ₂ • ⁻	Ânion superóxido
OH•	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PI	Iodeto de propídeo
PTEN	Fosfatase homóloga de tensinas
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforodamina B
SNC	Sistema Nervoso Central
TERT	Telomerase transcriptase reversa
TMZ	Temozolomida
UV	Ultravioleta
WHO	Organização Mundial da Saúde
μM	Micromolar

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	17
	Objetivo Geral	17
	Objetivos Específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
	Câncer	18
	Gliomas.....	19
	Glioblastoma	21
	Sintomatologia, Diagnóstico e Sobrevida.....	22
	Estresse Oxidativo no Desenvolvimento do Câncer	23
	Tratamentos dos Gliomas	24
	Fármacos originados de Produtos Naturais	25
	Taninos	26
	Ácido Tânico	26
4	MANUSCRITO.....	28
5	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	65
	Anexo A - Carta de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)	66

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado por apresentar um acúmulo gradual de mutações genéticas que conseqüentemente vão aumentar a proliferação celular (TOMASETTI et al., 2017). É considerado um problema de saúde pública mundial e a principal causa de morte na população, além de ser uma barreira importante para o aumento da expectativa de vida nos países no século XXI (BRAY et al., 2018). Devido ao diagnóstico tardio, as alternativas terapêuticas são limitadas. Com isso, a busca de novas alternativas para o tratamento da doença vem ganhando força e apresentam como principal objetivo uma melhoria nos efeitos adversos e na qualidade de vida dos pacientes (LOPÉZ-GÓMEZ et al., 2013).

Os gliomas são tumores cerebrais primários, subdivididos conforme sua célula de origem (AGNIHOTRI et al., 2013). O glioblastoma (GBM) representa a forma mais devastadora e comum de tumor do sistema nervoso central (SNC) em adultos, sendo um dos cânceres menos susceptíveis aos tratamentos disponibilizados (CARAGHER et al., 2019). Pacientes acometidos com GBM apresentam uma sobrevida média de aproximadamente 14 a 15 meses após o diagnóstico (THAKKAR et al., 2014). É o tumor cerebral com maior incidência na população e também de maior letalidade, possuindo uma baixa capacidade de metástase, entretanto grande capacidade de infiltração através do tecido cerebral (VAN MEIR et al., 2010). Atualmente, o tratamento aplicado é considerado multimodal, onde é realizada a cirurgia quando possível, seguida de radioterapia e quimioterapia (MRUGALA, 2013). O quimioterápico padrão utilizado na terapêutica do GBM é o temozolomida (TMZ), que depois de diversos estudos foi o único fármaco capaz de alterar a sobrevida dos pacientes (GROSSMAN, 2016). No entanto, a eficácia dessas estratégias terapêuticas é limitada fazendo com que o prognóstico dos pacientes permaneça insatisfatório, sendo a quimioresistência a principal barreira ao sucesso do tratamento.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), para suprir as necessidades básicas de saúde mais de 80% da população prioriza os medicamentos oriundos de produtos naturais. Além disso, no tratamento do câncer, 75% dos fármacos descobertos e aprovados são produtos naturais ou derivados deles (CRAGG, 2016).

O ácido tânico (AT) é um tanino hidrolisável encontrado em diversos alimentos como a uva, vinho tinto, café, chá verde, chá preto entre outros (CHUNG et al., 1998).

Estudos relatam que esse composto exerce diversas atividades biológicas, como antioxidante (LOPES et al., 1999), antitumoral (SAHINER et al. 2015), antimicrobiana e antiviral (BUZZINI et al., 2008) e ainda apresenta efeitos protetores contra várias doenças e danos atuando principalmente como agente anti-inflamatório (PERELSHTAIN et al., 2014).

Tendo em vista o alto índice de mortalidade dos pacientes acometidos pelo GBM e a falta de eficiência nos tratamentos disponibilizados, o AT apresenta-se como um promissor composto para auxiliar na terapêutica do glioblastoma, podendo oferecer uma melhoria no prognóstico dos pacientes.

2 OBJETIVO

Objetivo Geral

Avaliar o efeito antitumoral do AT *in vitro* e em modelo pré-clínico de glioblastoma.

Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do AT sobre linhagem de glioma de rato (C6) e cultivo primário de astrócitos através dos testes do MTT e Sulforodamina B;
- Avaliar a atividade *in vitro* do AT sobre linhagem de glioma de rato (C6) sobre a formação de colônias, migração, adesão, tipo de morte e ciclo celular;
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo *in vitro* sobre linhagem de glioma de rato (C6) exposta ao AT;
- Avaliar o efeito antiglioma do AT, através da análise histopatológica, frente a um modelo pré-clínico de GBM;
- Avaliar a toxicidade do AT, através de análise dos parâmetros bioquímicos séricos, no modelo pré-clínico de GBM.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Câncer

O câncer pode ser descrito como sendo um conjunto de diversas doenças que apresentam um crescimento desordenado de células, podendo invadir órgãos e tecidos adjacentes. As células cancerígenas são caracterizadas por apresentarem uma divisão rápida, agressiva e incontrolável, dando origem a tumores e podendo se espalhar para outras regiões do corpo (INCA, 2018). As células cancerosas reproduzem-se postergando os limites normais da divisão celular e acabam invadindo e colonizando regiões que são normalmente destinadas a outros tipos celulares (ALBERTS et al., 2010).

Nos últimos anos, o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública que atinge a população, principalmente nos países em desenvolvimento, onde se espera que nas próximas décadas, o impacto na população seja de aproximadamente 80% dos mais de 20 milhões de casos novos que são estimados até o ano de 2025 (STEWART e WILD, 2014). É considerado a segunda principal causa de morte no mundo e eram estimados para 2018 uma representação de 9,6 milhões de casos de morte. Os cânceres que mais acometem a população masculina são os de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado, enquanto os que mais acometem a população feminina são os de mama, colorretal, pulmão, colo do útero e o de tireoide (WHO, 2018).

No Brasil, entre 2018 e 2019, a estimativa indica a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano. Com exceção do câncer de pele não melanoma, o qual a estimativa é de aproximadamente 170 mil novos casos, ocorrerão em torno de 420 mil casos novos de câncer. O câncer de próstata em homens e de mama em mulheres serão os mais frequentes (INCA, 2018). No entanto, tumores do SNC estão entre os 10 tipos de cânceres mais frequentes no Brasil para o biênio de 2018-2019 (INCA 2018).

Os tratamentos atuais são intervenções cirúrgicas, o uso de quimioterápicos e a radioterapia. Porém o tipo de tratamento é planejado a partir da detecção do tipo tumoral, estágio e terapias utilizadas para o mesmo. As terapias paliativas, que são consideradas primordiais, também são utilizadas, visando uma melhora na qualidade de vida do paciente e de suas famílias (WHO, 2018).

Gliomas

Os gliomas são considerados os tipos mais frequentes de tumores primários do SNC, englobando uma grande variedade de tipos tumorais e de características histológicas de malignidade. A origem celular dos gliomas ainda é desconhecida, porém estudos sugerem que se inicie em células estaminais ou progenitoras neurais neoplasticamente transformadas. Porém, a classificação histológica de gliomas é baseada essencialmente nas semelhanças morfológicas das células tumorais com células gliais não neoplásicas e a presença de características arquitetônicas determinadas (RIEMENSCHNEIDER et al., 2010). São caracterizados por apresentarem um crescimento infiltrativo extenso, neurovascularização e resistência a diversas terapias combinadas (MA et al., 2018). Além de apresentarem baixas taxas de incidência e altas taxas de mortalidade (LENTING et al., 2017).

No contexto mundial, os gliomas representam cerca de 30% de todos os tumores do SNC diagnosticados nos Estados Unidos e 81% dos tumores malignos do SNC em adultos jovens. Sendo o glioblastoma responsável pela maioria dos gliomas, representando 54,4% de todos os gliomas presentes no SNC. Quanto ao gênero, a taxa de incidência dos gliomas é bem maior em homens (7,14 por 100.000 pessoas) do que em mulheres (5,06 por 100.000 pessoas) (OSTROM et al., 2013). Os gliomas malignos podem se desenvolver em qualquer idade, porém apresentam o seu pico de incidência em pacientes entre 50 e 60 anos (STUPP et al., 2010). No Brasil, para o biênio de 2018-2019, a estimativa de tumores do SNC é de 5.810 novos casos em homens e 5.510 casos em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,62 casos novos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

Os gliomas foram inicialmente classificados, segundo a OMS, em diferentes grupos, levando em consideração parâmetros como: a localização tumoral, o tipo celular e o seu grau de malignidade (LOUIS et al., 2007). Porém em 2016, houve uma reclassificação dos tumores do SNC, nessa foram adicionadas neoplasias recém conhecidas e excluídas as entidades variantes e padrões que já não teriam mais tanta importância diagnóstica e/ou biológica. Também foram utilizados, pela primeira vez, parâmetros moleculares, sendo possível assim, a elaboração de diagnósticos de tumores do SNC estruturados na era molecular (LOUIS et al., 2016).

Segundo a OMS, em 2007, a classificação dos gliomas quanto a sua histologia compreendia o agrupamento de todos os tumores astrocíticos. Todavia, na nova

classificação, conforme a Figura 1, são agrupados todos os gliomas difusamente infiltrantes, tanto os astrocitários quanto os oligodendrogliais, baseando-se não apenas no seu padrão e comportamento de crescimento, mas também mais incisivamente nas suas características genéticas compartilhadas nos genes isocitrato desidrogenase (IDH) 1 e 2 (LOUIS et al., 2016).

Os gliomas ainda foram classificados, pela OMS, quanto ao seu grau de malignidade celular (LOUIS et al., 2007). Os tumores classificados como de grau I, são considerados histologicamente benignos e podem ser curados através de ressecção cirúrgica e na sua maioria as crianças são as mais atingidas. Já os tumores presentes em adultos, são os infiltrativos e geralmente apresentam do grau II ao IV. Os tumores de grau II apresentam uma leve proliferação celular, possuindo um pleomorfismo celular moderado e tornam a ressecção cirúrgica mais difícil devido a sua capacidade de se infiltrar no cérebro circundante. Os tumores de grau III, por sua vez, têm um alto grau de proliferação, apresentam hiperplasticidade e são malignos. Tumores que apresentam grau IV, como o GBM, são excepcionalmente agressivos e malignos, possuem um aumento da atividade mitótica, uma alta capacidade de angiogênese, além de apresentarem necrose e serem resistentes à quimioterapia (FANG et al., 2012).

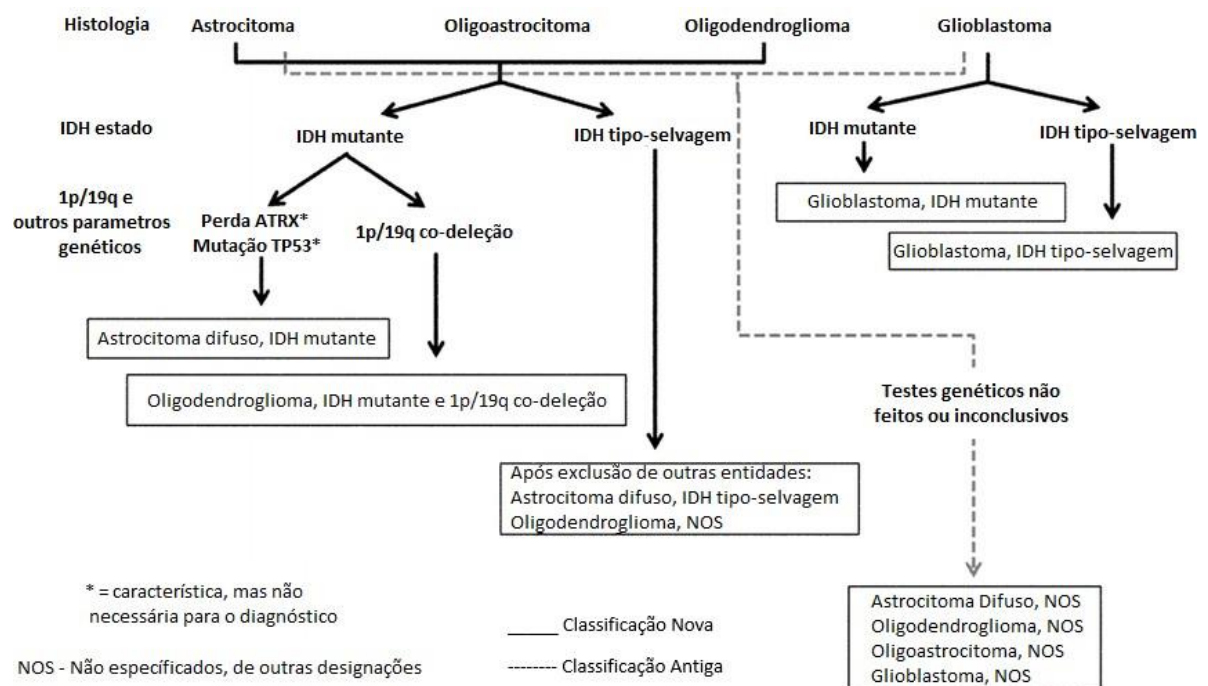


Figura 1 – Classifica  o dos gliomas (adaptado de LOUIS et al., 2016)

Glioblastoma

O GBM é o tumor cerebral mais comum e agressivo em adultos e continua sendo o menos tratável (CARAGHER et al., 2019). Os GBM são os tumores mais frequentes do SNC, responsáveis por aproximadamente 80% de todos os tumores malignos do cérebro (MESSALI et al., 2014).

É considerado um astrocitoma (originado de astrócitos) de grau mais avançado ou de grau IV, sendo identificado como um tumor muito agressivo (MEIR et al., 2010). Esses tumores são caracterizados por possuírem uma população de células heterogêneas, que são geneticamente instáveis, além de apresentar uma grande capacidade de infiltração e angiogênese e alta resistência à quimioterapia (WEN et al., 2008). O GBM possui uma baixa capacidade de metástase, contudo apresenta uma grande habilidade de infiltração pelo tecido cerebral (MEIR et al., 2010). A gradual deterioração neurológica, em consequência do seu rápido crescimento e sua alta capacidade infiltrativa, leva os pacientes à morte em um curto intervalo de tempo (WU et al., 2013).

O GBM pode manifestar-se em qualquer idade, porém seu pico de incidência é entre os 55 a 60 anos (OHGAKI; KLEIHUES, 2005). Além disso, a proporção de incidência é maior em homens do que em mulheres (THAKKAR et al., 2014). Representa 50% de todos os gliomas em todas as faixas etárias (ROCK et al., 2014).

Ainda que exista uma variedade terapêutica mais avançada contra o GBM, o mesmo ainda permanece sendo uma doença com alto índice de mortalidade e com um prognóstico insatisfatório, conferindo aos pacientes uma sobrevida média de aproximadamente 14 a 15 meses após a realização do diagnóstico (THAKKAR et al., 2014). Por mais que o GBM seja raro e com uma incidência global baixa (10 por 100.000 pessoas), a problemática de apresentar um prognóstico extremamente ruim e uma baixa sobrevida, acaba tornando-o um problema fundamental de saúde pública (THAKKAR et al., 2014).

Com o objetivo de aperfeiçoar o diagnóstico e tratamento dos pacientes, a caracterização de perfis moleculares de tumores cerebrais vem sendo utilizada (JANSEN et al., 2010). Através das características histopatológicas e apresentação clínica, os gliomas malignos são classificados e divididos em subtipos. O GBM é considerado o mais comum e biologicamente agressivo (FURNARI et al., 2007) e é dividido em dois subtipos, caracterizando o tumor como primário ou secundário

(MAHER et al., 2006). O GBM primário já se manifesta clinicamente como um tumor de grau IV, já o GBM secundário evolui a partir dos tumores de menores graus, pode levar de 5 a 10 anos para atingir o maior grau (MAHER et al., 2006). Além disso com os contínuos e recentes avanços foi possível demonstrar correlatos dessas definições. O GBM primário é marcado por mutação e amplificação do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), superexpressão do duplo minuto de camundongos 2 (MDM2), deleção do p16 e perda de heterozigosidade (LOH) do cromossomo 10q contendo fosfatase e homólogo da tensina (PTEN) e mutação do promotor telomerase transcriptase reversa (TERT). Já o GBM secundário é marcado por superexpressão do fator de crescimento derivado de plaquetas A (ALDAPE et al., 2015). Com isso, a identificação dessas alterações moleculares auxilia em uma melhor visão para a melhoria de estratégias terapêuticas já existentes.

Sintomatologia, Diagnóstico e Sobrevida

É possível observar em pacientes com tumores cerebrais primários, convulsões súbitas, ou uma apresentação subaguda, com sintomas focais ou não focais progressivos no transcorrer de algumas semanas a vários meses. Os pacientes com déficits neurológicos focais progressivos, provavelmente apresentam o crescimento de um tumor em uma região específica do cérebro. Já os sintomas não focais equivalem a vômitos, cefaleias, fadigas, alterações cognitivas, desequilíbrio, transtorno de humor e distúrbio da marcha. Os pacientes também podem apresentar um déficit neurológico agudo que se assemelha a um acidente vascular encefálico, porém esses sintomas aparecem com uma frequência bem menor (CHABNER; LONGO, 2015). Um outro sintoma desencadeado é o aumento da pressão intracraniana, que vai se dar devido a um aumento muito pequeno do volume do tumor, essa situação pode resultar em coma e morte (BEHIN et al., 2003).

A avaliação laboratorial é realizada através da punção lombar, para que seja feita a análise do líquido cérebro espinhal, quando há uma suspeita de metástase para o SNC (CHABNER; LONGO, 2015). Exames de neuroimagem também são realizados através de tomografia computadorizada ou ressonância magnética. Outras alternativas são o uso de espectroscopia por ressonância magnética e a tomografia por emissão de pósitrons, as quais são úteis em situações específicas, como

orientação cirúrgica e para fazer a diferenciação entre tumor recorrente e necrose relacionada com o tratamento (CHABNER; LONGO, 2015).

As melhores formas de avaliar o prognóstico do paciente são a idade, classificação histológica do tumor e estado do paciente (BEHIN et al., 2003). A sobrevida do paciente se dá conforme o grau de malignidade do tumor, nos de grau II a sobrevida é de 5 a 10 anos, nos de grau III de 2 a 3 anos, já nos de grau IV secundários de 9 a 15 meses e nos de grau IV primários de 9 a 12 meses. A sobrevida do paciente está diretamente relacionada com a agressividade do tumor (FURNARI et al., 2007).

Estresse Oxidativo no Desenvolvimento do Glioma

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos (oxidantes ou espécies reativas de oxigênio – ERO) e sua eliminação pelos sistemas antioxidantes, que irão atuar de maneira protetiva. Esse desequilíbrio resultará em danos às biomoléculas e células (ĎURAČKOVÁ, 2010). As ERO são produzidas durante processos metabólicos intracelulares e compreendem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SOSA et al., 2013) dentre outras. Estudos sugerem que as células cancerígenas quando comparadas com as células normais, encontram-se sob um maior estresse oxidativo, pois apresentam um aumento da atividade metabólica, um mau funcionamento mitocondrial e, conseqüentemente, um aumento na produção de ERO (WU; KASSIE; MERSCH-SUNDERMANN, 2005). Além disso, essas espécies podem desempenhar papel de mensageiras nas vias de transdução de sinal celular, promovendo assim o crescimento e a proliferação celular, contribuindo para o desenvolvimento do câncer (BEHREND; HENDERSON; ZWACKA, 2003).

No GBM ocorre um aumento nos níveis basais de ERO, que irão atuar como mediadores químicos regulando a transdução do sinal e protegendo as células malignas da apoptose. Com isso, alternativas terapêuticas com potencial antioxidante poderiam reduzir o estresse oxidativo, atuando na prevenção de danos celulares e na alta taxa de mutação acompanhada de uma instabilidade cromossômica, o que reduziria o ambiente imunossupressor (SALAZAR-RAMIRO et al., 2016).

Com isso, torna-se evidente que a regulação dos mecanismos de defesa de radicais livres celulares é de extrema importância, pois protege o organismo contra as lesões oxidativas. Eles incluem os sistemas enzimáticos antioxidantes como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx), que atuarão eliminando as ERO conferindo proteção ao organismo dos efeitos nocivos causados pelas mesmas (OZBEN, 2007). Em vista disso, a modulação nos mecanismos redox, vem sendo de extremo interesse na busca de novas terapêuticas para o câncer.

Tratamentos dos Gliomas

A primeira abordagem terapêutica é a cirurgia e obtenção do tecido para um diagnóstico mais preciso. A ressecção do tumor é de valor prognóstico, podendo ser benéfica ao reduzir o tumor, contanto que não comprometa a função neurológica do paciente. Quando a ressecção não é viável, realiza-se uma biópsia estereotáxica de série (STUPP et al., 2014). A intervenção cirúrgica ainda é fundamental para o diagnóstico e prevenção dos sintomas do tumor. A neuroendoscopia e ressecção guiada por fluorescência, são técnicas novas de cirurgia que têm se tornado bastante importantes no tratamento dos gliomas (VAN MEIR et al., 2010).

Posteriormente, o paciente é submetido à radioterapia, considerada tratamento padrão após a ressecção ou biópsia (STUPP et al., 2014). Por décadas a radioterapia vêm sendo fundamental no tratamento dos tumores cerebrais. Embora esse método ainda apresente efeitos indesejáveis, ele tem passado por constantes aperfeiçoamentos. Através de técnicas guiadas por imagem, há uma tentativa em focar o feixe de luz e adaptá-lo aos contornos irregulares dos tumores, permitindo assim que se minimize a exposição desse feixe para as estruturas adjacentes (VAN MEIR et al., 2010).

O quimioterápico TMZ tem sido administrado concomitantemente com a radioterapia, sendo considerado o padrão atual de tratamento para pacientes de até 70 anos de idade acometidos por GBM (STUPP et al., 2014). O TMZ é um agente alquilante de DNA conhecido por induzir parada no ciclo celular em G2/M e eventualmente levar a apoptose (ALONSO et al., 2007). É possível observar uma melhora significativa na sobrevida dos pacientes tratados com TMZ, com uma média de 2 a 5 anos de sobrevivência. Inicialmente o TMZ é administrado por 7 dias

simultaneamente com a radioterapia, após a radiação são realizados 6 ciclos, que compreende 5 dias de administração do TMZ em um intervalo de 4 em 4 semanas (STUPP et al., 2014). Pacientes com GBM tendem a receber uma dose de 150 mg/m² por dia (LEE, 2016). Ainda que o tratamento com TMZ aumente a sobrevida média dos pacientes, existe um rápido desenvolvimento de resistência a esse quimioterápico (TIEK et al., 2018).

Além das alternativas terapêuticas já mencionadas, estudos buscam por medicamentos que bloqueiem uma ou mais vias de proliferação que estão alteradas, como por exemplo, o anticorpo bevacizumabe, que tem ação anti-angiogênica. Porém esses tratamentos ainda são considerados paliativos, mesmo sendo combinados com a cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia (BEHIN et al., 2003).

Fármacos originados de Produtos Naturais

Os produtos naturais, há milhares de anos, vêm desempenhando um papel relevante em todo o mundo na prevenção e cura de doenças. Sendo originados de diversas fontes, incluindo um grande número de plantas e microrganismos (NEWMAN et al., 2000). Entre os anos de 1983 e 1994, foram aprovados 520 novos medicamentos, dentre eles 39% eram de produtos naturais ou derivados desses produtos e 60% a 80% de antibacterianos e anticancerígenos eram derivados de produtos naturais (HARVEY, 2000). Os produtos naturais e/ou estruturas de produtos naturais continuam desempenhando um papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2012). Ao longo do período de 1940 a 2014, na área do câncer foram aprovadas 175 pequenas moléculas, 85 eram produtos naturais ou derivados deles (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A toxicidade de fármacos bem estabelecidos consiste em um dos principais problemas na terapêutica do câncer, sendo necessária a busca de métodos alternativos para o tratamento de neoplasias malignas. Neste contexto, as plantas apresentam-se como fontes importantes de compostos quimiopreventivos (KEUM et al., 2005). Cabe destacar que, na área de anticancerígenos, agentes vegetais como a vimblastina, vincristina, etoposídeo, paclitaxel, docetaxel, topotecano e irinotecano, estão entre os mais eficientes quimioterápicos atualmente disponíveis (NEWMAN; CRAGG et al., 2014).

Taninos

Os taninos são pertencentes a um grupo dos polifenóis (CHUNG et al., 2010) originados do metabolismo secundário das plantas (BUTLER et al., 1984) e são caracterizados por serem polímeros fenólicos com uma alta solubilidade em água e por possuírem capacidade de precipitar proteínas (HASLAM, 1989). Estão presentes na natureza, predominantemente nas plantas, apresentando um grande valor nutritivo. Possuem um alto peso molecular, que compreende um intervalo de 500 a 3.000 unidades de massa atômica (MANGAN, 1988) e apresentam na sua estrutura grupos hidroxila-fenólicos em quantidades razoáveis para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (DESHPANDE et al., 1986). A ingestão de dietas ricas em alimentos que apresentam taninos, e a ingestão de chá verde são ligadas a atividades anticâncer, anti-inflamatória e cicatrizantes (KILKUSKIE et al., 1992).

Diversas doenças degenerativas, entre elas o câncer, doença de Parkinson, aterosclerose, esclerose múltipla e o processo de envelhecimento, estão relacionadas com altas concentrações intracelulares de radicais livres, os quais podem acarretar em estresse oxidativo (SIMÕES, 2007). Pesquisas demonstram que vários taninos atuam como captadores de radicais, interceptando oxigênio ativo e formando radicais estáveis, e assim, por sua vez reduzindo o estresse oxidativo (SIMÕES, 2007). Os potenciais anticancerígenos e antimutagênicos dos taninos podem estar relacionados à sua atividade antioxidante, que conseqüentemente torna-se importante na proteção do dano oxidativo (CHUNG et al., 2010).

Ácido Tânico

O AT é caracterizado como sendo um polifenol, que compreende uma molécula de glicose central, e possui a fórmula molecular $C_{76}H_{52}O_{46}$. Como demonstrado na Figura 2, apresenta cinco cadeias formadas por duas moléculas de ácido gálico ligadas por esterificação a molécula de glicose (GALI et al., 1992).

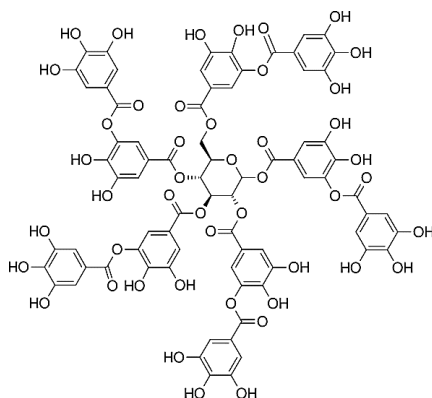


Figura 2. Estrutura química do composto Ácido Tânico

O AT é um tanino produzido a partir do metabolismo secundário das plantas e se encontra na categoria dos ácidos fenólicos. Esse composto está presente em diversos alimentos, como lentilhas, chocolates, café, chá preto e chá verde, uvas, vinho tinto entre outros (KUO et al., 1992).

Possui uma importante ação antioxidante devido a capacidade de quelar e sequestrar radicais livres (SAH et al., 1994). Estudos apontam os mecanismos envolvidos nos efeitos do AT, conferindo a ele diversas propriedades medicinais, como ação anticancerígena, atuando no controle de células tumorais (HL-60 de leucemia humana) e induzindo apoptose (CHEN et al., 2009), bem como ação neuroprotetora, exercendo um papel antioxidante e/ou anti-inflamatório em modelo animal de isquemia cerebral (SEN et al., 2015) e de acidente vascular cerebral (ASHAFAQ et al., 2017).

Além disso, Zhang e colaboradores (2018) demonstraram que o AT induz a morte celular por apoptose em células de glioma humano (Hs 683), através da ativação de pró-caspase 3 e caspase 9 além da clivagem em poli (ADP-ribose) polimerase. Esse resultado corrobora com o aumento do número de células sub-G1, indicativo de fragmentação de DNA e, com isso, morte celular apoptótica (WILLIAMS et al., 2012). O TA também foi descrito como indutor de parada no crescimento de células na fase G1, levando à morte celular por apoptose em células Jurkat T, sugerindo um mecanismo relacionado com a inibição da atividade do proteassomo (NAM et al., 2001).

4 MANUSCRITO

Tannic acid elicits selective antitumoral activity *in vitro* and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme

Tannic acid as a selective antiglioma agent

Natália P. Bona^a; Nathalia S. Pedra^b; Juliana H. Azambuja^c; Mayara S. P. Soares^b; Luíza Spohr^b; Nicolly E. Gelsleichter^c; Bernardo de M. Meine^a; Fernanda G. Sekine^b; Lorenzo T. Mendonça^a; Francine H. de Oliveira^d; Elizandra Braganhol^c; Roselia M. Spanevello^b; Elita F. da Silveira^b; Francieli M. Stefanello^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Biociências - Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Sarmiento Leite 245, Porto Alegre, RS, Brazil.

^dDepartamento de Patologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

*Address reprint requests to: Francieli Moro Stefanello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, CEP: 96010-900, Phone: 55 53 32757355, Fax: 55 53 32757354

E-mail: fmstefanello@gmail.com

Abstract

Glioblastoma is the most common and devastating tumor affecting the central nervous system and is treated using surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ). Considering the infiltrative capacity, high proliferation rate, chemoresistance and the low survival of these patients, it is urgent to find new therapeutic alternatives that improve this prognosis. Herein, we focused on tannic acid (TA), a polyphenol with antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities. In this work, the antitumor and antioxidant effects of TA on rat (C6) glioblastoma cells and their cytotoxicity relative to primary astrocyte cultures were evaluated *in vitro*. Cells were exposed to a range of TA of 6.25 to 75 μ M for 24, 48 and/or 72 h. In addition, colony formation, migration and cell adhesion were analyzed and flow cytometry was used to analyze cell death (apoptosis or necrosis) and cell cycle. Next, the action of TA was evaluated in a preclinical glioblastoma model performed on Wistar rats. In this protocol, the animals were treated with a dose of 50 mg/kg/day TA for 15 days. Our results demonstrated that TA induced *in vitro* selective antiglioma activity, not demonstrating cytotoxicity in primary astrocyte culture. In addition, it induced cell death by apoptosis and cell cycle arrest, reducing formation and size of colonies, cell migration/adhesion and showing to be a potential antioxidant. Interestingly, the antiglioma effect was also observed *in vivo*, as TA decreased tumor volume by 55%, accompanied by an increase in the area of intratumoral necrosis and infiltration of lymphocytes without causing systemic damage. To the best of our knowledge, this is the first study to report TA activity in a GBM preclinical model. Thus, this natural compound is promising as a treatment for glioblastoma.

Keywords: cancer; tannic acid; glioblastoma; selectivity; antioxidant; animal model.

1. Introduction

Glioblastoma is the most malignant and highly recurrent primary brain tumor type, and accounts for approximately 80% of all malignant primary brain tumors (Van Meir et al., 2010; Messali et al., 2014). According to the World Health Organization, glioblastoma is classified as grade IV glioma, based on its malignancy and morphology (Louis et al., 2016). It is the brain tumor with the highest incidence and lethality, and although its metastatic potential is low, it demonstrates a great capacity for cerebral tissue infiltration (Van Meir et al., 2010). Treatment of glioblastoma is typically multimodal, involving surgical resection whenever possible, followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ) (Butowski et al., 2006). However, the efficacy of these therapeutic strategies is limited, with chemoresistance being the main barrier to treatment success. During treatment, tumor cells gradually lose their sensitivity to chemotherapeutics, developing acquired chemoresistance, which eventually leads to tumor progression and recurrence (Lin et al., 2018). GBM therapy remains complex and as a result, this malignancy is associated with a poor prognosis. Patient survival from shortly after the time of diagnosis is 14 to 15 months (Ohka et al., 2012).

Tannins are phenolic compounds of great economic and ecological interest that result from the secondary metabolism of plants (Kuo et al., 1992). Tannic acid (TA) is a hydrolysable tannin found in various foods and beverages, such as grapes, red wine, coffee, and green tea, among others (Kuo et al., 1997). A number of studies have examined the mechanisms underlying the medicinal properties of TA, which has been reported to have anticancer effects, controlling the proliferation of tumor cells (including HL-60 human leukemia cells) and inducing their apoptosis (Chen et al., 2009). TA has also been extensively studied in diseases of the central nervous system, as in cerebral ischemia, where it has demonstrated an antioxidant role against the negative effects caused by the pathology (Sen et al., 2015). It also had a neuroprotective effect as a potent antioxidant and anti-inflammatory agent in an experimental animal model of stroke (Ashfaq et al., 2017). In addition, studies present TA as an important free radical scavenger (Gülçin et al., 2010).

It is well known that oxidative stress is involved in tumor development and progression (Ashfaq et al., 2017). Imbalances in reactive oxygen species (ROS) formation can lead to damage to DNA, proteins, and lipids and gene dysregulation,

which in turn can promote the onset or progression of cancer, including the development of glioblastoma. Therefore, modulation of homeostasis redox is an important consideration in the choice of therapeutic approach (Sanchez-Perez et al., 2017). Considering that cancer is linked to high intracellular free radical concentrations, leading to oxidative stress (Simões et al., 2001; Sanchez-Perez et al., 2017) and the adversities in glioblastoma therapy (Lin et al., 2018), the objective of the present study was to investigate the effect of TA *in vitro* and in glioblastoma preclinical model.

2. Materials and methods

Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fungizone (amphotericin B), penicillin/streptomycin, 0.5% trypsin/EDTA solution, and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA). TA, dimethylsulfoxide (DMSO), and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

Animals

For the primary culture of astrocytes, three independent experiments were performed using 6 Wistar rats, male or female, with 1 to 3 days old. For the preclinical model of glioma, 20 male Wistar rats with 60 days of age (250-300g) were used. The study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee on Animal Experimentation of institution, under protocol number CEEA 31292-2018. The use of the animals is in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Research Animals in Sciences (DBCA) and according to the National Council for Animal Control and Experimentation (CONCEA)

Cell Culture

C6 rat glioma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). The cells were cultured in DMEM supplemented with 5% FBS maintained at 37°C containing 5% CO₂. The primary astrocyte cultures were performed as previously described by our group (Da Frola et al., 2009). The cortex of neonatal rats were mechanically removed and dissociated in pH 7.4 balanced salt

solution free of calcium and magnesium. Subsequently, the tissue was dissociated and centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min, and the resulting pellet was suspended in DMEM (pH 7.6) supplemented with 10% FBS. Cells were plated (96 wells) and maintained under standard culture conditions for approximately 25 days, with medium being periodically replaced until adequate confluence was reached.

Cell treatment

A stock solution was made by dissolving TA in DMSO. The stock solution was then diluted in 5% FBS supplemented DMEM to obtain solutions of 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, and 75 μM . For cytotoxicity evaluation, the C6 glioma cells were seeded in 96-well plates at 5×10^3 cells/well and exposed to TA at the above mentioned concentrations for 24, 48, or 72 h. In the clonogenic assay, C6 cells were seeded in 6-well plates at 3×10^2 cells/well and treated with 37.5 μM TA for 48 h. For the cell migration assay, C6 cells were seeded in 12-well plates at 2×10^4 cells/well and treated with 6.25 μM TA for 24 h. In the cell adhesion assay, C6 cells were seeded in 96-well plates at 4×10^4 cells/well and exposed to 6.25 μM TA for 24 h. Finally, for cell cycle and cell death analysis, C6 cells were seeded in 6-well plates at 1×10^5 cells/well and treated with 37.5 μM TA for 48 h. Cells exposed to DMSO at a final concentration of 0.05% served as the control.

Cytotoxicity assays

The MTT assay (Mosmann et al., 1983) was performed to determine cell viability. The medium was removed after treatment and a solution of MTT mixed with DMEM (0.5 mg/mL) was added. The C6 and astrocyte cultures were then incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for 90 min. Absorbance at 492 nm was then measured with a microplate reader (SpectraMax 190, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). SRB assay was used for cell density determination based on the ability of the dye to bind to basic amino acids present in cellular proteins (Pauwels et al., 2003). First, the medium containing the treatment was removed and 50% trichloroacetic acid was used to fix cells, after, the cells were incubated at 4°C for 45 min. After incubation, the dye was added, and cells were incubated in the dark at room temperature for 30 min. Absorbance at 530 nm was determined using a microplate reader (SpectraMax190). The results are expressed as percentage of the control cells.

TA and TMZ treatment

The cytotoxic effects of TA and standard drug TMZ on C6 cells were assessed by optical microscopy. The cells were seeded in 6-well plates at 1×10^5 cells/well and exposed to 75 μ M TA and 75 μ M TMZ for 24, 48, 72, 96 and 120 h. Photographs were taken after this period and a visual comparison of the effects of the treatments was made. Additionally, cellular proliferation was evaluated by the SRB assay at 120 h after exposure to TA treatment. The results are expressed as percentages of the control value.

Clonogenic assay

Colony-forming capacity was analyzed by the clonogenic assay, performed as described previously (Franken et al., 2006). Cells were seeded and treated with 37.5 μ M TA for 48h, then replated and incubated for 10 days. After incubation time, cells were fixed with methanol and 1% crystal violet was added. A microscope was used to count colony formation and the colonies length were determined with ImageJ software. The results are expressed as the number and size of colonies formed by the treated cells in relation to the control group.

Cell migration

The *in vitro* scratch assay was used to evaluate cell migration capability (Kaczmarek et al., 2005). A pipette tip was used to create a scratch at the bottom of the plaque on the cell monolayer. The debris was removed and treatment-free DMEM supplemented with 0.5% FBS was added. Pictures were taken at times of 0, 6, 12 and 24h to observe risk closure. Quantitative analysis of the cell-free area was performed using ImageJ software, after which, percentage inhibition of cell migration was determined.

Cell adhesion assay

Following the cell migration assay, the treatment-free medium was removed and the cells were trypsinized, re-plated (96-well) and incubated for 2 h at 37°C. After incubation, the cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 5 min. Any residue was removed and the cells were stained with crystal violet for 10 min. Finally, the dye was removed, 10% acetic acid was added and the absorbance was measured at 590 nm in a microplate reader.

Cell cycle analysis

The cell suspension was centrifuged at 1000 x *g* for 7 min and the supernatant was removed. The cells were then washed, fixed with 70% ethanol and incubated at 4°C for 2 h in a solution of 1% Triton X-100, 2 mg/mL RNase, and 2 mg/mL propidium iodide (PI) in PBS. After 30 min, data were collected using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA).

Cell death analysis

The cell death was quantified using an annexin V-FITC/PI double-staining kit (Molecular Probes, Oregon, USA). After treatment, medium and cells were collected and centrifuged for 10 min at 2000 x *g*. The cell pellet was washed with PBS and incubated for 15 min with a binding buffer containing PI and FITC-conjugated annexin V, following the manufacturer's instructions. Apoptotic and necrotic cells were quantified using a FACS Calibur flow cytometer. The cells were classified as viable (annexin-V-/PI-), early apoptotic (annexin-V+/PI-), late apoptotic (annexin-V+/PI+), or necrotic (annexin-V-/PI+).

Oxidative stress parameters

Protein determination

Protein concentration was determined using the method of Lowry et al. (1951).

ROS level determination

Production of intracellular ROS was determined by the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay (Dos Santos et al., 2017). The cells were seeded into 96-well plates at 5×10^3 cells/well and treated with TA at the above mentioned concentrations for 48 h, before being incubated with DCFH-DA for 30 min. Fluorescence was then measured at 525 nm in a microplate reader (SpectraMax190). ROS production is expressed as percentages of the control value.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined as described by Misra and Fridovick (1972), using an assay based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation. Absorbance was measured at 480 nm in a microplate reader (SpectraMax190) and results are expressed as percentages of the control value.

Quantification of total sulfhydryl content

Sulfhydryl content was determined according to the method described by Aksenov and Markesbery (2001), which involves the addition of 5,5-dithio-*bis*-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). In the presence of thiols, DTNB is reduced, forming an oxidized disulfide and the yellow derivative TNB. The results were obtained by measuring absorbance at 412 nm in a microplate reader (SpectraMax190) and are expressed as percentages of the control value.

Catalase (CAT) activity

CAT activity was measured following the method described by Aebi (1984), which is based on the decomposition of H₂O₂ monitored in a spectrophotometer (SpectraMax190) at 240 nm. CAT activity is expressed as percentages of the control value.

Glioma Implantation

C6 cells were cultured after reaching 90% confluency at a ratio of 1×10^6 cells, resuspended in 3 μ L of DMEM and infused at a rate of 0.5 μ L/min in the right striatum of the animals (coordinates relative to bregma, 3.0 mm lateral, 0.5 later and 6 mm depth). The animals were pre-anesthetized with intraperitoneal (i.p.) administration of ketamine and xylazine.

In vivo protocol

Five days after glioma implantation, the animals were divided into two groups: (1) Glioblastoma + Vehicle, (2) Glioblastoma + TA (50 mg/kg/day). The treatment was given intragastrically for 15 days (Figure 7A). After 21 days of tumor implantation, the animals were euthanized and the brain was removed, sectioned and fixed in formalin for further analysis. Blood samples were collected by cardiac puncture and the serum was separated for biochemical analysis. The weight of the animals was monitored every 3 days.

Pathological analysis and tumor quantification

Three brain sections of each hematoxylin and eosin (HE) animal (4 μ m thick in paraffin blocks) were analyzed by a pathologist. For quantification of tumor size,

images were captured using a microscope attached to a camera ($\times 2$ magnification; Nikon Eclipse TE300) and the tumor area (mm^2) was quantified using ImageJ software. Total tumor volume (mm^3) was calculated by multiplying the slice section and adding the segmented area (Da Silveira et al., 2017).

Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ standard errors of the means from at least three independent experiments performed in triplicate. Statistical analyses were performed using Student's t-test, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-hoc test, or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test. Differences were considered significant when associated with P values <0.05 .

3. Results

TA selectively decreases the proliferation and viability of C6 glioma cells

C6 rat glioma cells were exposed to 6.25 - 75 μM of TA for 24, 48 and/or 72 h. As shown in Figure 1, TA reduced cell proliferation (Figure 1A – C) and viability (Figure 1D – F) in a concentration- and time-dependent manner. In addition, 72 h of exposure to 75 μM TA reduced cell proliferation and viability to 70% and 50%, respectively, when compared to the control group. Furthermore, TA demonstrated selective activity against tumor cells, since it had no effect on the proliferation of primary astrocytes (Figure 1G and H). In addition, the (IC_{50}) of TA (72 h of exposure) was found to be 35.05 μM in the cell proliferation test.

Comparative effect of TMZ and TA

Cell growth was analyzed at 24, 48, 72, 96, and 120 h (Figure 2A, B, C, D, and E, respectively). We observed that within the first 24 h, TA decreased cell density and that this effect persisted up to 120 h. In contrast, TMZ only reduced cell density after 120 h. As regards cell proliferation, it was possible to observe a reduction of 72.91% with TA and 55.84% with TMZ (Figure 2F). It is important to note that whereas the IC_{50} of TA was found to be 35.05 μM that of TMZ is 993.5 μM (Azambuja et al., 2018).

TA decreases C6 glioma cell colony formation and size

As depicted in Figure 3A and D, exposure of C6 glioma cells to 37.5 μM TA for 48 h reduced colony formation by 70% compared with the control treatment (Figure

3C). In addition, colony size was 51% smaller than the control group after 48 h of treatment (Figure 3D).

TA inhibits the migration and decreases the adhesion of C6 glioma cells

To evaluate the influence of TA on glioma cell migration, a monolayer scratch assay was performed, with images being captured 0, 6, 12, and 24 h after scratching (Figure A). It was expected that over time, the cells not exposed to TA would move so as to close the wound, while those treated with this compound would remain relatively immobile. Wound closure at 24 h was measured as 53% in the control group, and TA inhibited cell migration by 81% (Figure 4A and B). After analysis of migration, the adhesive ability of the cells was tested. In the treated group, only 38.5% of cells re-adhered to the wells, revealing TA to be an efficient inhibitor of cell adhesion (Figure 4C). We used 6.25 μ M of TA at 24 h to assess the migratory capacity of cells, since this concentration and time did not present cellular cytotoxicity.

TA increases the sub-G1 population of GBM cells and promotes their apoptosis and necrosis

Figure 5A shows the changes in cell cycle distribution following administration of 37.5 μ M TA for 48 h. Compared with the control treatment, TA resulted in a significant increase in the number of cells in the sub-G1 phase (Figure 5A), suggestive of apoptosis. Consequently, there was a significant reduction in the population of cells in G1 and S phases. In addition, the number of viable cells was lower in the TA group than the control group (Figure 5B). Of the treated cells, 8.7% were apoptotic, 3.7% were necrotic, and 7.3% were late apoptotic, although no statistically significant difference was observed in this respect compared with the untreated cells.

TA changes oxidative stress parameters in C6 glioma cells

At concentrations of 12.5 μ M and higher, TA significantly reduced ROS levels compared with the control treatment, with the greatest reduction (64.52%) being observed using a 75 μ M solution (Figure 6A). In contrast, TA significantly increased sulfhydryl content, by 36.28% at 25 μ M and 66.08% at 75 μ M (Figure 6B). Regarding antioxidant enzymes, SOD (Figure C) and CAT (Figure D) activity was increased in cells treated with TA at concentrations of 25 μ M and above, with the largest increase (approximately 88%) being observed with 75 μ M TA.

TA inhibits the growth of GBM in vivo

To verify whether the *in vitro* antiglioma potential of TA was reproducible *in vivo*, we performed tumor implantation in rats (Figure 7). According to Figure 7B and C, it was possible to observe that TA treated animals had a significant reduction in tumor size ($227.6 \pm 58.16 \text{ mm}^3$) when compared to the control ($410.7 \pm 60.64 \text{ mm}^3$). In addition, control animals presented pathological characteristics very close to the human glioblastoma. Thus, results showed that TA enhanced the area of necrosis and lymphocytic infiltration (Figure 7B and Table 2). In addition, it is important to highlight that the treatment with TA did not demonstrate renal and hepatic toxicity (Table 1). However, TA significantly reduced glucose levels, not altering total cholesterol and triglyceride levels (Table 1). Finally, the treatment with TA did not alter the weight of the animals when compared to control (Figure 7D).

4. Discussion

Due to its highly invasive nature and tendency to infiltrate surrounding brain tissue, therapeutic options for glioma are limited (Van Meir et al., 2010). Therefore, the search for new therapies is of great relevance to improving the prognosis and quality of life of patients with this tumor. Natural products are an important source of potential anticancer drugs because of their efficiency and low toxicity in comparison to their synthetic counterparts (Yu et al., 2013). TA, the focus of this study, is a polyphenol that has several biological properties, including antitumor (Nie et al., 2016), antioxidant, antibacterial (Krishnappa et al., 2017), and antimutagenic effects (Hassan et al., 2016).

In the present study, TA was shown to exert a selective antiglioma effect, since it did not alter the proliferation of astrocytes. Recently, researchers have demonstrated using MTT assays that TA reduces the viability of cultured glioblastoma cells; however, its cytotoxicity towards normal cells has not been tested (Zielinska-Przyjemska et al., 2017). In addition, another recent study demonstrated the antiglioma effect of TA on human glioblastoma cells (Hs 683), indicating a concentration/time dependent action (Zhang et al., 2018). It has also been established using both *in vitro* and *in vivo* models that TA exerts an antitumor effect on other types of cancers, including breast cancer (Tikoo et al., 2011). In addition, the anticancer activity of phenolic acids has been confirmed using a variety of cell lines, including HeLa cervical carcinoma, HT29 and HCT116 colon cancer, MCF7 breast cancer, and Jurkat T-cell leukemia cells, the

viability of each of which is decreased by such compounds (Kumnerdkhonkaen et al., 2018).

The clonogenic assay is considered a "gold standard" cell sensitivity test, in which the treatment under investigation is evaluated in relation to the structure and function of the cells subjected to the treatment, with cell survival being determined based on the time taken for the cells after exposure to the treatment (Plumb, 2004). Our results demonstrated that TA reduced colony number and size, indicating that this treatment inhibited the ability of cells to form colonies, thereby interfering with cell survival corroborating once again the antglioma potential of TA.

It is understood that current treatment for glioblastoma is only palliative, with TMZ prolonging patient survival by a maximum of 8 months, an unsatisfactory therapeutic outcome (Uzzaman et al., 2007). Our data demonstrated that TA administration effectively reduced cell density, since TMZ administration began to show effect after 120 h of exposure to treatment, which is proven from the cell proliferation test, where we can infer that in time of 120 h TA has a greater reduction compared to TMZ. Glioblastoma is a highly invasive tumor, a characteristic that heightens its malignancy and migratory capacity. Our results showed that compared to the control treatment, TA significantly inhibited the migration of glioblastoma cells and reduced the adhesive capacity. This is in agreement with previous studies demonstrating the inhibition of cell migration by natural products (Pedra et al., 2018; Zhang et al., 2014).

The induction of cancer cell apoptosis has attracted great interest in the search for new cancer therapies. In our study, TA was found to promote apoptosis, as evidenced by increased cell death, suggesting that this phenolic compound has anticancer properties. In this context, Zhang and colleagues (2018) demonstrated that TA induces cell death by apoptosis in human glioma cells (Hs 683), suggesting that the mechanism involved in this outcome is the activation of pro-caspase 3 and caspase 9 in addition to cleavage in poly (ADP-ribose) polymerase. This result is supported by the increased number of sub-G1 cells observed, indicative of DNA fragmentation and therefore apoptotic cell death (Williams et al., 2012). Besides, researches have reported that TA induces stop in G1 cell growth, leading to cell death by apoptosis in Jurkat T cells, probably by inhibition of proteasome activity (Nam et al., 2001). Recently, the potential importance of polyphenols as therapeutic agents for the treatment of bladder cancer has been appraised, with cell cycle analysis showing that

such compounds trigger marked growth arrest and subsequent apoptosis (Coccia et al., 2016).

Oxidative stress is a feature common to several types of cancer cells. It is characterized by uncontrolled ROS formation (Coccia et al., 2016), compromising cellular metabolism and leading to the promotion of cellular malignancy and tumor initiation and progression (Acharya et al., 2010). The regulation of oxidative stress is an important factor in the development of new antineoplastic therapies (Gorrini et al., 2013). Our results demonstrated that TA reduced ROS production and increased thiol content and antioxidant enzyme activities, indicating that it exerts potent antioxidant effects on cells of the glioblastoma cell line. In keeping with this, prior research has shown that overexpression of SOD and CAT inhibits cancer cell growth, and thus constitutes a therapeutic strategy for the treatment of cancer (Whang et al., 2008). In addition, data from our group demonstrate the increase of antioxidant enzymes in TMZ chemoresistant glioblastoma cell lines (Azambuja et al., 2017). A similar effect on the modulation of oxidative stress parameters was also noted in a recent study in which the action of natural products against glioblastoma was assessed (Erukainure et al., 2018). In addition, phenolic compounds have been shown to possess notable and promising antioxidant activity in several studies (Da Rocha et al., 2018). Herein, we have uncovered a possible antitumor mechanism of TA by modulating the redox state of the tumor cell.

The effect of TA on *in vivo* models of brain tumors is unclear. Thus, our study evaluated whether treatment with this natural compound may be a potent pharmacological target for the treatment of gliomas. From the promising result obtained from *in vitro* tests that demonstrated a selective cytotoxic profile for C6 glioma cells, since it did not demonstrate cytotoxicity in astrocyte primary culture, *in vivo* assays were initiated. According to the results, TA was efficient in reducing volume of glioma when compared to control animals. In addition, the histopathological analysis showed that TA increased inflammatory infiltrate and necrosis area. Interestingly, animals treated with TA did not show any toxicity profile at both renal and hepatic damage levels. Furthermore, as far as we are aware, this is the first description of antiglioma activity of TA *in vivo*.

5. Conclusion

The present study revealed that TA had a promising cytotoxic effect on rat glioblastoma cells, promoting their death by apoptosis. In addition, it exhibited antioxidant activity. Our data also reported the potential action of TA in a preclinical model of glioma (Figure 8). Thus, we proposed that this natural compound constitutes an important therapeutic agent for individuals with glioblastoma.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, CNPq and FAPERGS.

Conflicts of interest statement

The authors declare no conflicts of interest in relation to this study.

References

- Acharya, A., Das, I., Chandhok, D., & Saha, T. (2010). Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3, 23-34. <http://dx.doi.org/10.4161/oxim.3.1.10095>.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- Aksenov, M. Y., & Markesbery, W. R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 302, 141-145. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6).
- Ashafaq, M., Tabassum, H., & Parvez, S. (2017). Modulation of behavioral deficits and neurodegeneration by tannic acid in experimental stroke challenged Wistar rats. *Molecular Neurobiology*, 54, 5941-5951. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0096-8>.
- Azambuja, J. H., da Silveira, E. F., de Carvalho, T. R., Oliveira, P. S., Pacheco, S., do Couto, C. T., ... & Braganhol, E. (2017). Glioma sensitive or chemoresistant to temozolomide differentially modulate macrophage protumor activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861, 2652-2662. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.007>.
- Azambuja, J. H., Gelsleichter, N. E., Beckenkamp, L. R., Iser, I. C., Fernandes, M. C., Figueiró, F., & Sévigny, J. (2018). CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. *Molecular Neurobiology*, 1-20. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-1240-4>.
- Borges, K. S., Brassesco, M. S., Scrideli, C. A., Soares, A. E. E., & Tone, L. G. (2011). Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 310-314. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572011000200024>.
- Butowski, N. A., Sneed, P. K., & Chang, S. M. (2006). Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma. *Journal of Clinical Oncology*, 24, 1273-1280. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.04.7522>.
- Chen, K. S., Hsiao, Y. C., Kuo, D. Y., Chou, M. C., Chu, S. C., Hsieh, Y. S., & Lin, T. H. (2009). Tannic acid-induced apoptosis and-enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. *Leukemia Research*, 33, 297-307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2008.08.006>.

Coccia, A., Mosca, L., Puca, R., Mangino, G., Rossi, A., & Lendaro, E. (2016). Extra-virgin olive oil phenols block cell cycle progression and modulate chemotherapeutic toxicity in bladder cancer cells. *Oncology Reports*, 36, 3095-3104. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2016.5150>.

Da Frota, M. L. C., Braganhol, E., Canedo, A. D., Klamt, F., Apel, M. A., Mothes, B., ... & Moreira, J. C. F. (2009). 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*, 27, 13-20. <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9134-3>.

Da Rocha, P. D. S., Campos, J. F., Nunes-Souza, V., do Carmo Vieira, M., de Araújo Boleti, A. P., Rabelo, L. A., ... & de Picoli Souza, K. (2018). Antioxidant and protective effects of schinus terebinthifolius raddi against doxorubicin-induced toxicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184, 869-884. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2589-y>.

Da Silveira, E. F., Azambuja, J. H., de Carvalho, T. R., Kunzler, A., da Silva, D. S., Teixeira, F. C., ... & Cunico, W. (2017). Synthetic 2-aryl-3-((piperidin-1-yl) ethyl) thiazolidin-4-ones exhibit selective in vitro antitumoral activity and inhibit cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. *Chemico-biological Interactions*, 266, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.02.001>.

Dos Santos, L. M., Da Silva, T. M., Azambuja, J. H., Ramos, P. T., Oliveira, P. S., Da Silveira, E. F., ... & Tavares, R. G. (2017). Methionine and methionine sulfoxide treatment induces M1/classical macrophage polarization and modulates oxidative stress and purinergic signaling parameters. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 424, 69-78. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2843-6>.

Erukainure, O. L., Ashraf, N., Naqvi, A. S., Zaruwa, M. Z., Muhammad, A., Odusote, A. D., & Elemo, G. N. (2018). Fatty Acids Rich Extract From *Clerodendrum volubile* Suppresses Cell Migration; Abates Oxidative Stress; and Regulates Cell Cycle Progression in Glioblastoma Multiforme (U87 MG) Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 251. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00251>.

Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1, 2315.

Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12, 931. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>.

Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.008>.

Hassan, A. M., El-Aziem, S. H. A., Barakat, I., & Kassem, S. M. (2016). Antimutagenic Effects of Tannic Acid on Somatic and Germ Cells of Rats. *Egyptian Journal of Genetics And Cytology*, 40. <https://doi.org/10.1267/THRO05040735>.

Kaczmarek, E., Erb, L., Koziak, K., Jarzyna, R., Wink, M. R., Guckelberger, O., ... & Robson, S. C. (2005). Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides. *Thrombosis and Haemostasis*, 93, 735-742. <https://doi.org/10.1160/TH04-09-0576>.

Krishnappa, N. P., Basha, S. A., Negi, P. S., & Prasada Rao, U. J. (2017). Phenolic acid composition, antioxidant and antimicrobial activities of green gram (vigna radiata) exudate, husk, and germinated seed of different stages. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e13273. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13273>.

Kumnerdkhonkaen, P., Saenglee, S., Asgar, M. A., Senawong, G., Khongsukwiwat, K., & Senawong, T. (2018). Antiproliferative activities and phenolic acid content of water and ethanolic extracts of the powdered formula of Houttuynia cordata Thunb. fermented broth and Phyllanthus emblica Linn. fruit. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 130. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2185-x>.

Kuo, M. L., Lee, K. C., & Lin, J. K. (1992). Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 270, 87-95. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90119-M](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90119-M).

Lin, J., Zuo, J., Cui, Y., Song, C., Wu, X., Feng, H.,.... & Qiu, G. (2018). Characterizing the molecular mechanisms of acquired temozolomide resistance in the U251 glioblastoma cell line by protein microarray. *Oncology Reports*, 39, 2333-2341. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6322>.

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., ... & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131, 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.

Lowry, OH., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*, 193, 265-75.

Messali, A., Villacorta, R., & Hay, J. W. (2014). A review of the economic burden of glioblastoma and the cost effectiveness of pharmacologic treatments. *Pharmacoeconomics*, 32, 1201-1212. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0198-y>.

Mignolet, A., Wood, B. R., & Goormaghtigh, E. (2018). Intracellular investigation on the differential effects of 4 polyphenols on MCF-7 breast cancer cells by Raman imaging. *Analyst*, 143, 258-269. <https://doi.org/10.1039/C7AN01460K>.

Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170-3175.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Nam, S., Smith, D. M., & Dou, Q. P. (2001). Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 10, 1083-1088.

Nie, F., Liang, Y., Jiang, B., Li, X., Xun, H., He, W., ... & Ma, X. (2016). Apoptotic effect of tannic acid on fatty acid synthase over-expressed human breast cancer cells. *Tumor Biology*, 37, 2137-2143. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4020-z>.

Ohka, F., Natsume, A., & Wakabayashi, T. (2012). Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. *Neurology Research International*, 2012, 13. <https://doi.org/10.1155/2012/878425>.

Pauwels, B., Korst, A. E., de Pooter, C. M., Pattyn, G. G., Lambrechts, H. A., Baay, M. F., ... & Vermorken, J. B. (2003). Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 51, 221-226. <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0557-9>.

Pedra, N. S., Galdino, K. D. C. A., da Silva, D. S., Ramos, P. T., Bona, N. P., Soares, M. S. P., ... & de Queiroz Souza, A. S. (2018). Endophytic Fungus Isolated From *Achyrocline satureioides* Exhibits Selective Antiglioma Activity—The Role of Sch-642305. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00476>.

Plumb, J. A. (2004). Cell sensitivity assays: clonogenic assay. In *Cancer Cell Culture*, 159-164. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-406-9:159>.

Sanchez-Perez, Y., Soto-Reyes, E., Garcia-Cuellar, C. M., Cacho-Diaz, B., Santamaria, A., & Rangel-Lopez, E. (2017). Role of Epigenetics and Oxidative Stress in Gliomagenesis. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, 16, 1090-1098. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180110124645>.

Sen, H. M., Ozkan, A., Guven, M., Akman, T., Aras, A. B., Sehitoglu, I., & Karaman, H. I. O. (2015). Effects of tannic acid on the ischemic brain tissue of rats. *Inflammation*, 38, 1624-1630. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0138-9>.

Simões, CMO Farmacognosia: da planta ao medicamento. UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2001.

Tikoo, K., Sane, M. S., & Gupta, C. (2011). Tannic acid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity and potentiates its anti-cancer activity: potential role of tannins in cancer chemotherapy. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 251, 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.12.012>.

Uzzaman, M., Keller, G., & Germano, I. M. (2007). Enhanced proapoptotic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand on temozolomide-resistant glioma cells. *Journal of Neurosurgery*, 106, 646-651. <https://doi.org/10.3171/jns.2007.106.4.646>.

Van Meir, E. G., Hadjipanayis, C. G., Norden, A. D., Shu, H. K., Wen, P. Y., & Olson, J. J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 60, 166-193. <https://doi.org/10.3322/caac.20069>.

Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & Therapy*, 7, 1875-1884. <https://doi.org/10.1002/path.3022>.

Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*, 226, 352-364. <https://doi.org/10.1002/path.3022>.

Yu, J., Nag, S. A., & Zhang, R. (2013). Advances in translational pharmacological investigations in identifying and validating molecular targets of natural product anticancer agents. *Current Cancer Drug Targets*, 13, 596-609. <https://doi.org/10.2174/15680096113139990032>.

Zhang, Z., Lv, J., Lei, X., Li, S., Zhang, Y., Meng, L..... & Li, Z. (2014). Baicalein reduces the invasion of glioma cells via reducing the activity of p38 signaling pathway. *PLoS One*, 9, e90318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090318>.

Zhang, J., Chen, D., Han, D. M., Cheng, Y. H., Dai, C., Wu, X. J., ... & Heng, X. Y. (2018). Tannic acid mediated induction of apoptosis in human glioma Hs 683 cells. *Oncology Letters*, 15, 6845-6850. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8197>.

Zielińska-Przyjemska, M., Kaczmarek, M., Krajka-Kuźniak, V., Łuczak, M., & Baer-Dubowska, W. (2017). The effect of resveratrol, its naturally occurring derivatives and tannic acid on the induction of cell cycle arrest and apoptosis in rat C6 and human T98G glioma cell lines. *Toxicology in Vitro*, 43, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.004>.

Tables

Table 1 Biochemical parameters in animals with glioma implant control and treated (TA)

	Control	TA
Glucose (mg/dL)	185.50±12.45	139.40±2.93 **
Total cholesterol (mg/dL)	71.00±4.59	63.43±4.56
Triglycerides (mg/dL)	92.14±20.90	84.14±11.91
ALT (U/L)	49.43±5.90	45.86±5.86
AST (U/L)	275.80±24.72	257±22.51
Urea (mg/dL)	49.63±2.80	41.83±3.19
Creatinine (mg/dL)	0.36±0.02	0.35±0.01

Five days after glioma implantation, the animals were divided into two groups, control and TA (tannic acid) and treated for 15 days. Values are the means ± standard errors of the means. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. ** $P < 0.01$ versus the control group

Table 2 Histological characteristics of implanted gliomas

	Control	TA
Coagulative necrosis	6/7	7/7
Intratumoral hemorrhage	4/7	5/7
Lymphocytic infiltration	4/7	7/7
Peritumoral edema	7/7	7/7
Vascular proliferation	6/7	7/7

Five days after glioma implantation, the animals were divided into two groups, control and TA (tannic acid) and treated for 15 days. Histological variables (coagulative necrosis, intratumoral hemorrhage, lymphocytic infiltration, peritumoral edema and vascular proliferation) were considered present or absent.

Legend and Figures

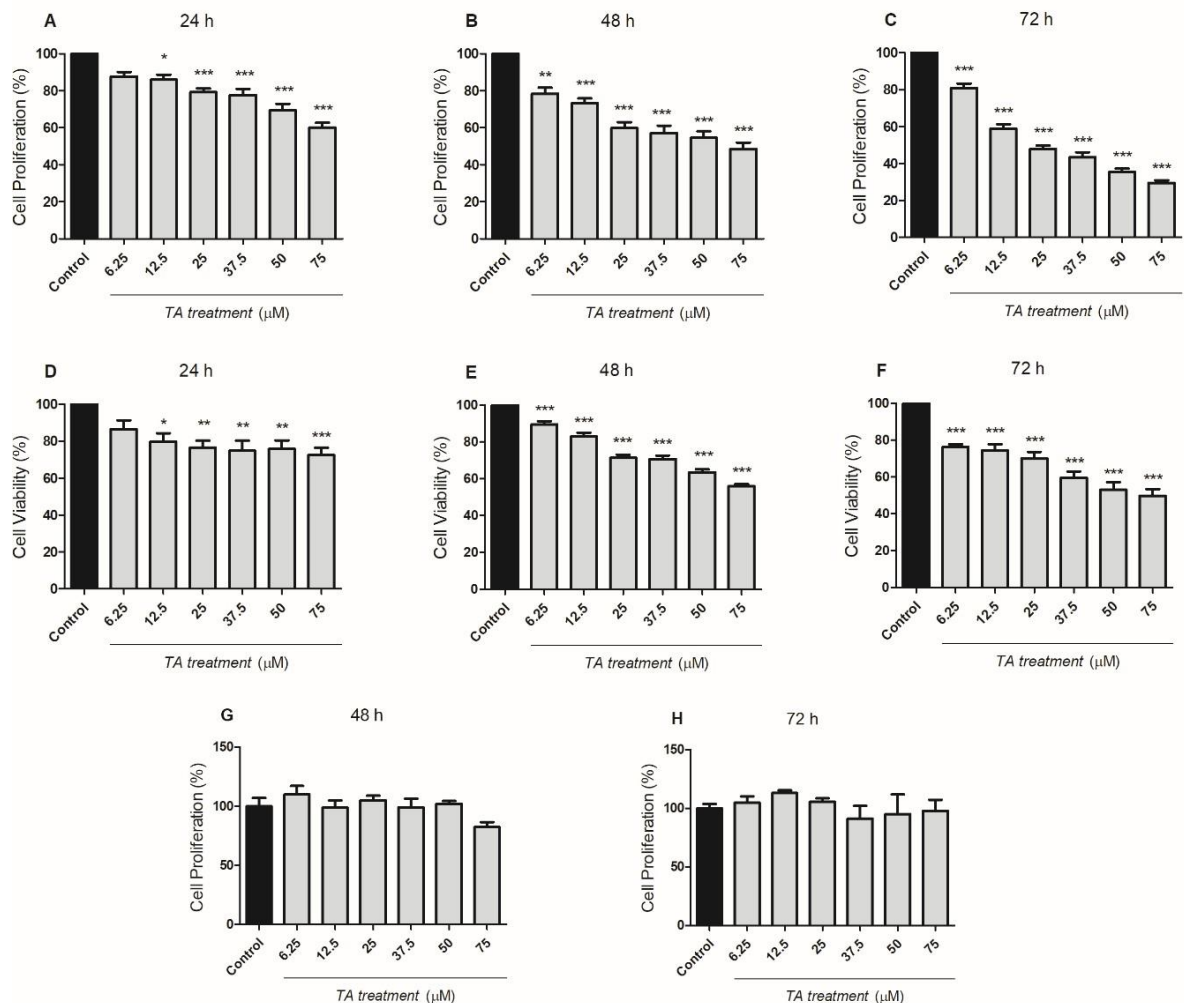


Figure 1 Effect of tannic acid (TA) on the proliferation (A–C) and viability (D–F) of C6 rat glioma cells after 24 (A and D), 48 (B and E), and 72 h (C and F). The effect of TA on the proliferation of primary astrocytes was also observed after 48 (G) and 72 h (H). Values are the means $\pm$ standard errors of the means from at least three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus the control group

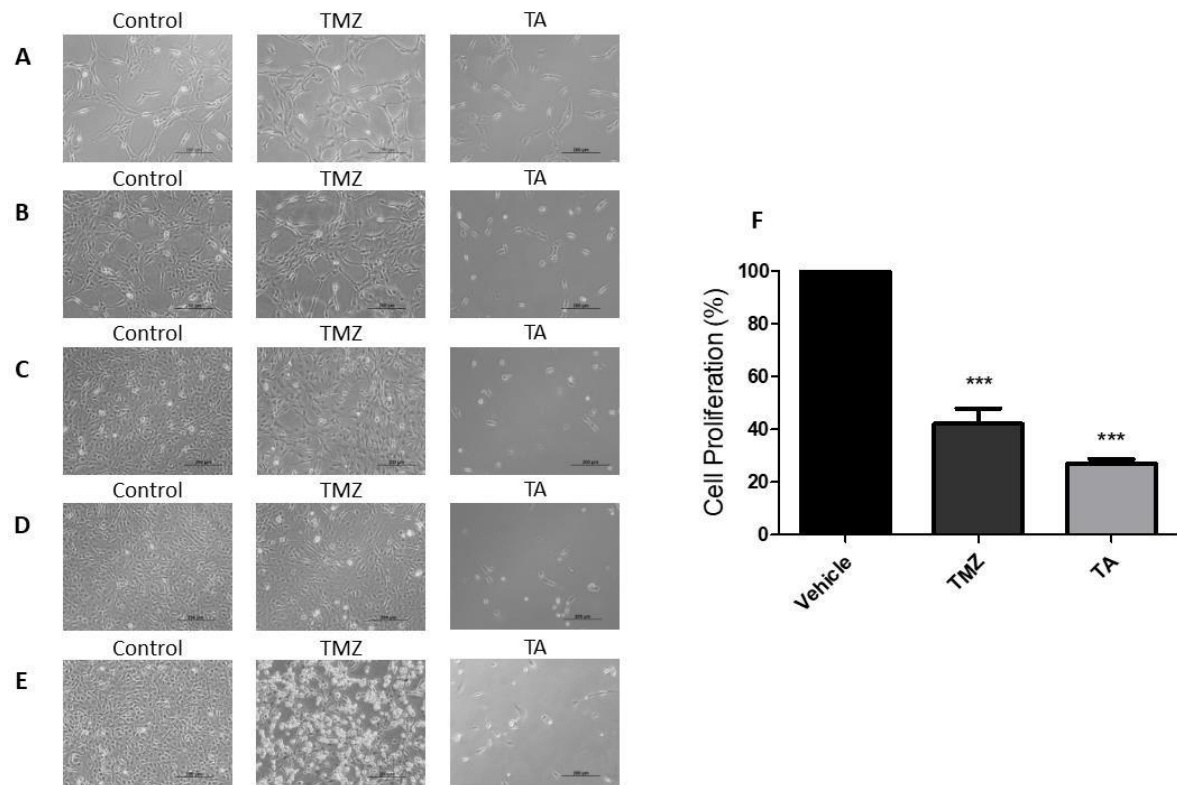


Figure 2 Analysis of C6 glioma cell density following exposure to 75 μ M tannic acid (TA) or 75 μ M temozolomide (TMZ) for 24 (A), 48 (B), 72 (C), 96 (D), and 120 h (E). Images were taken using an Olympus inverted microscope at 40x magnification. Effect of the tannic acid (TA) and temozolomide (TMZ) on proliferation (F) of glioma C6 cells after 120 h. Values are the means $\pm$ standard errors of the means from at least three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. *** $P < 0.001$ versus the control group

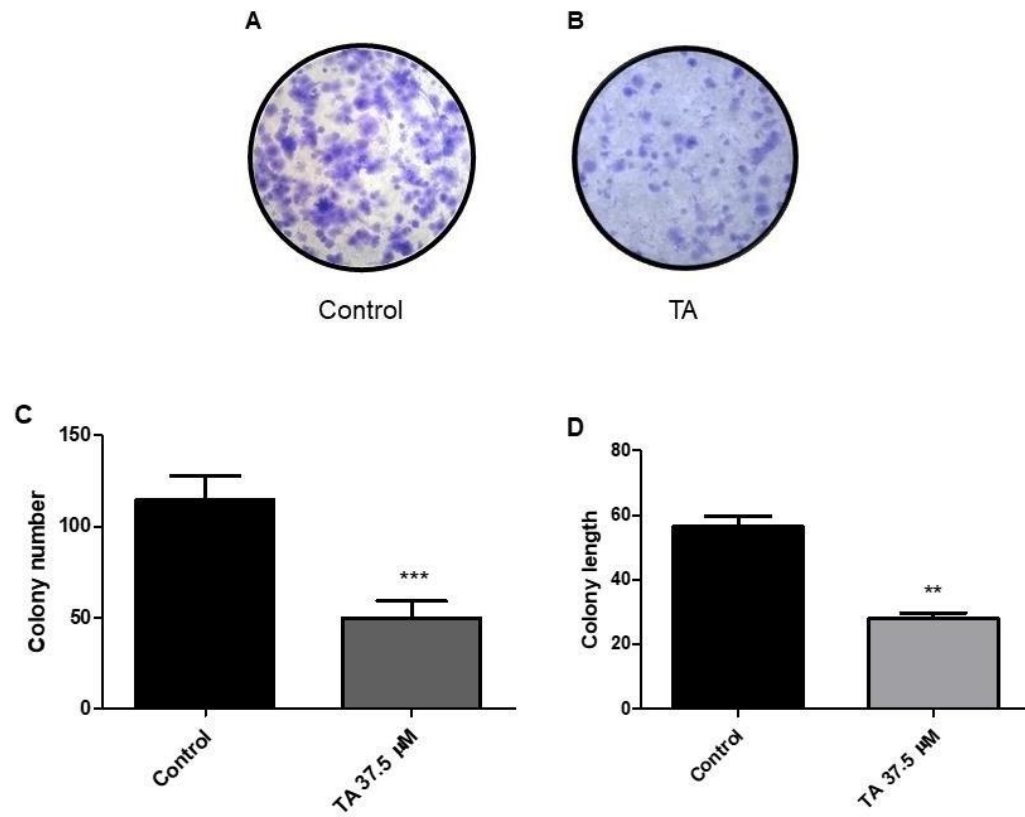


Figure 3 Clonogenic assay of untreated C6 cells (A) and C6 cells treated with 37.5 μ M tannic acid (TA) (B). Graphic representation of colony counts (C) and colony sizes (D) after 48 h of treatment. Data were analyzed by Student's *t*-test. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the control group. Three independent experiments were performed in triplicate

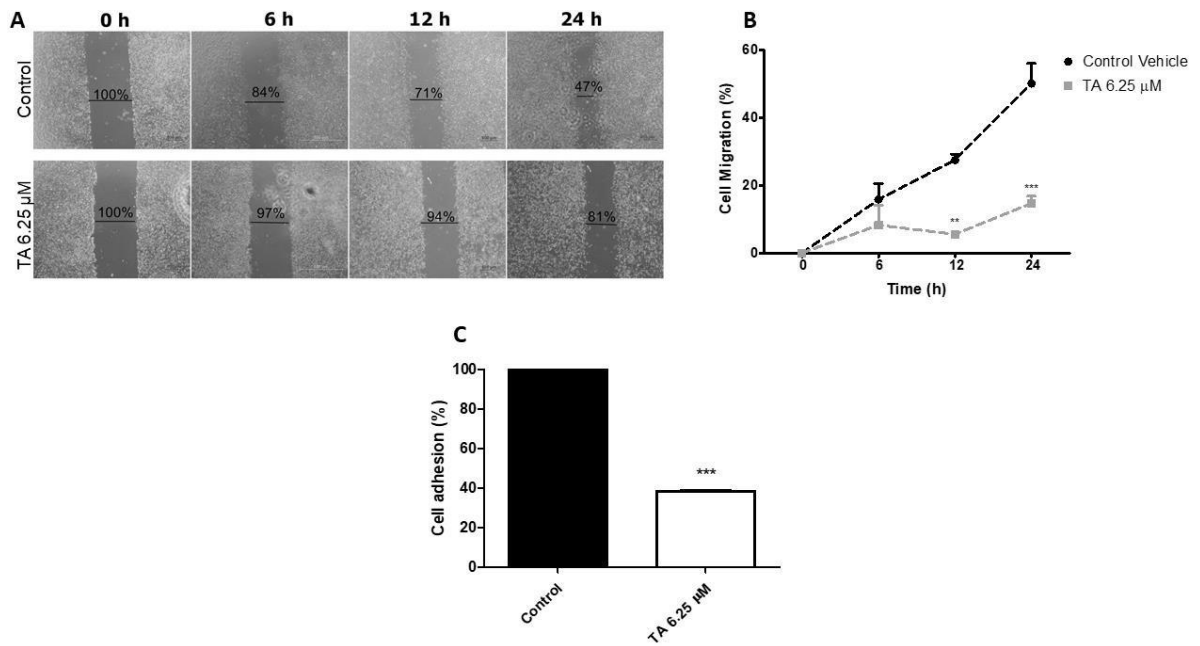


Figure 4 Representative micrographs of the migration of C6 rat glioma cell sat 0, 6, 12, and 24 h (A) (40× magnification). Percentage cell migration after different treatments and times (B) was analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post-hoc* test. Adhesion of tannic acid (TA) treated C6 cells at 24 h (C). Data were analyzed by Student's *t*-test. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the control group. Three independent experiments were performed in triplicate

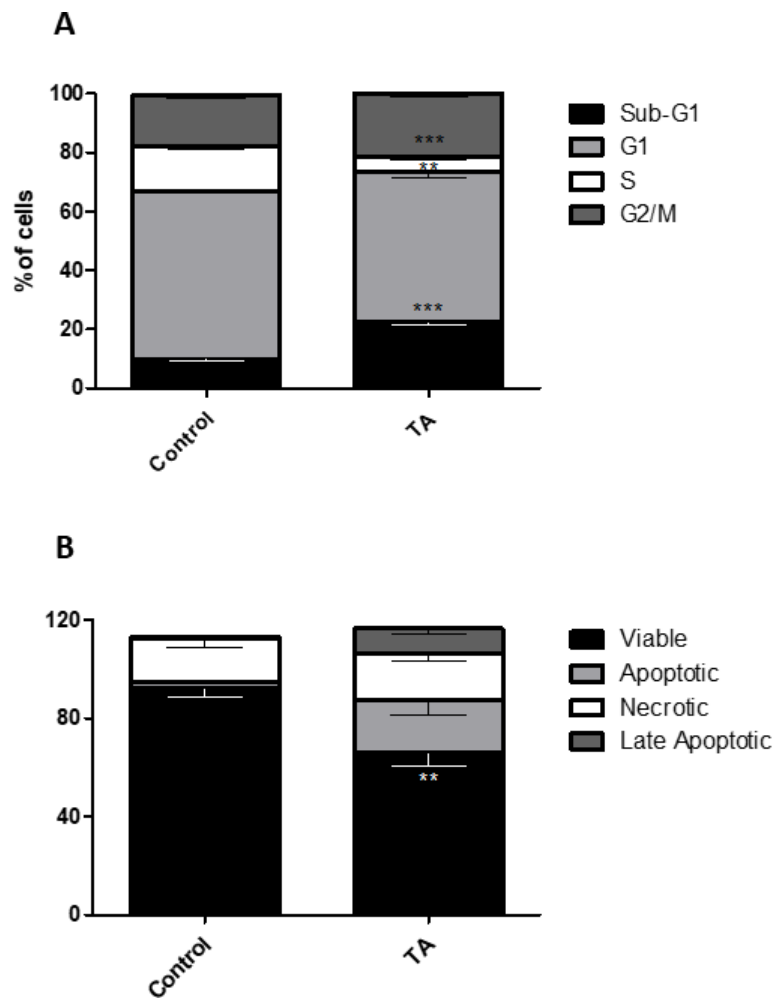


Figure 5 C6 glioma cell were exposed for 48h to 37.5 μ M tannic acid (TA). Cell cycle analysis flow cytometry and propidium iodide staining was used. The percentage of cells in the sub-G1, G1, S, and G2/M (A) phases is shown. Cell death was analyzed by flow cytometry with annexin V-FITC/propidium iodide double staining (B). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the control group. Three independent experiments were performed in triplicate

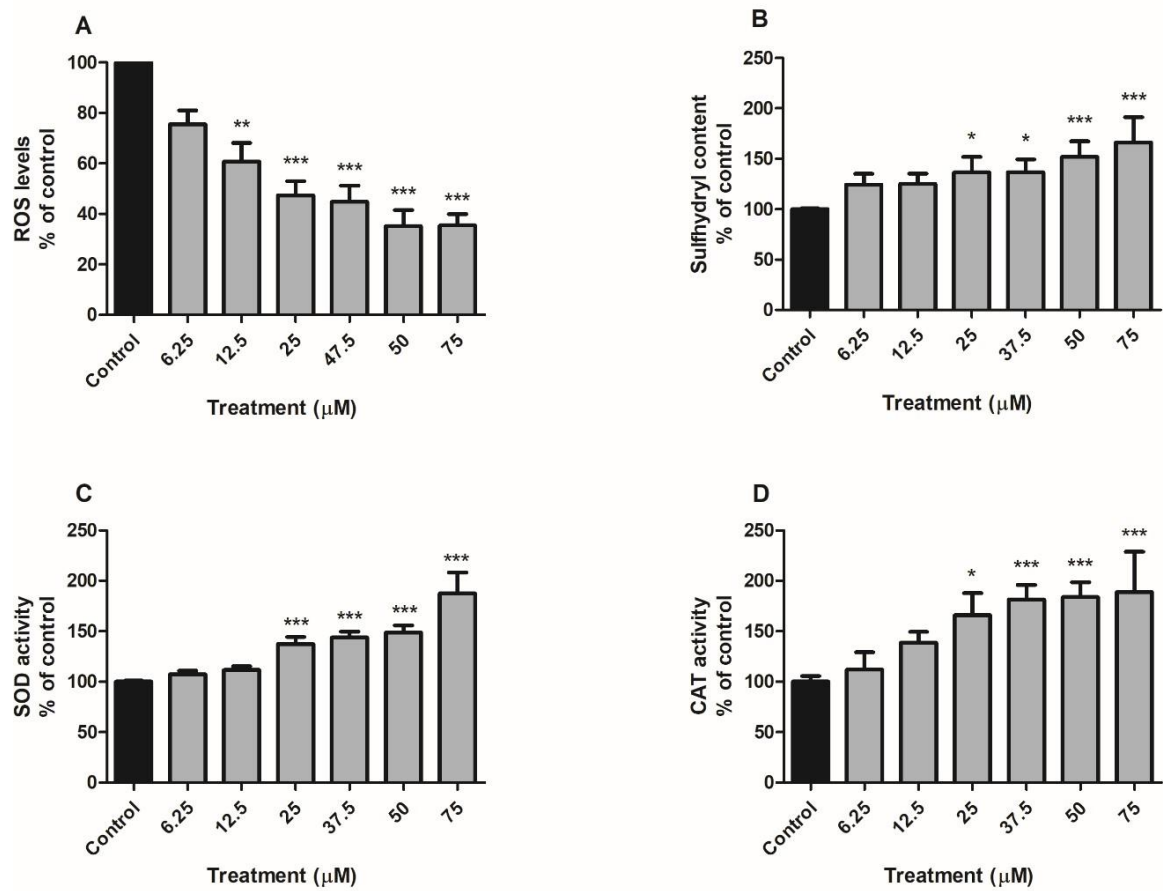


Figure 6 Oxidative stress parameters in C6 glioma cells exposed to tannic acid (TA) for 48 h. (A) Production of reactive oxygen species (ROS); (B) total sulfhydryl content; (C) superoxide dismutase (SOD) activity; (D) catalase (CAT) activity. Data are expressed as means $\pm$ standard errors of the means and were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Three independent experiments were performed. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus the control group

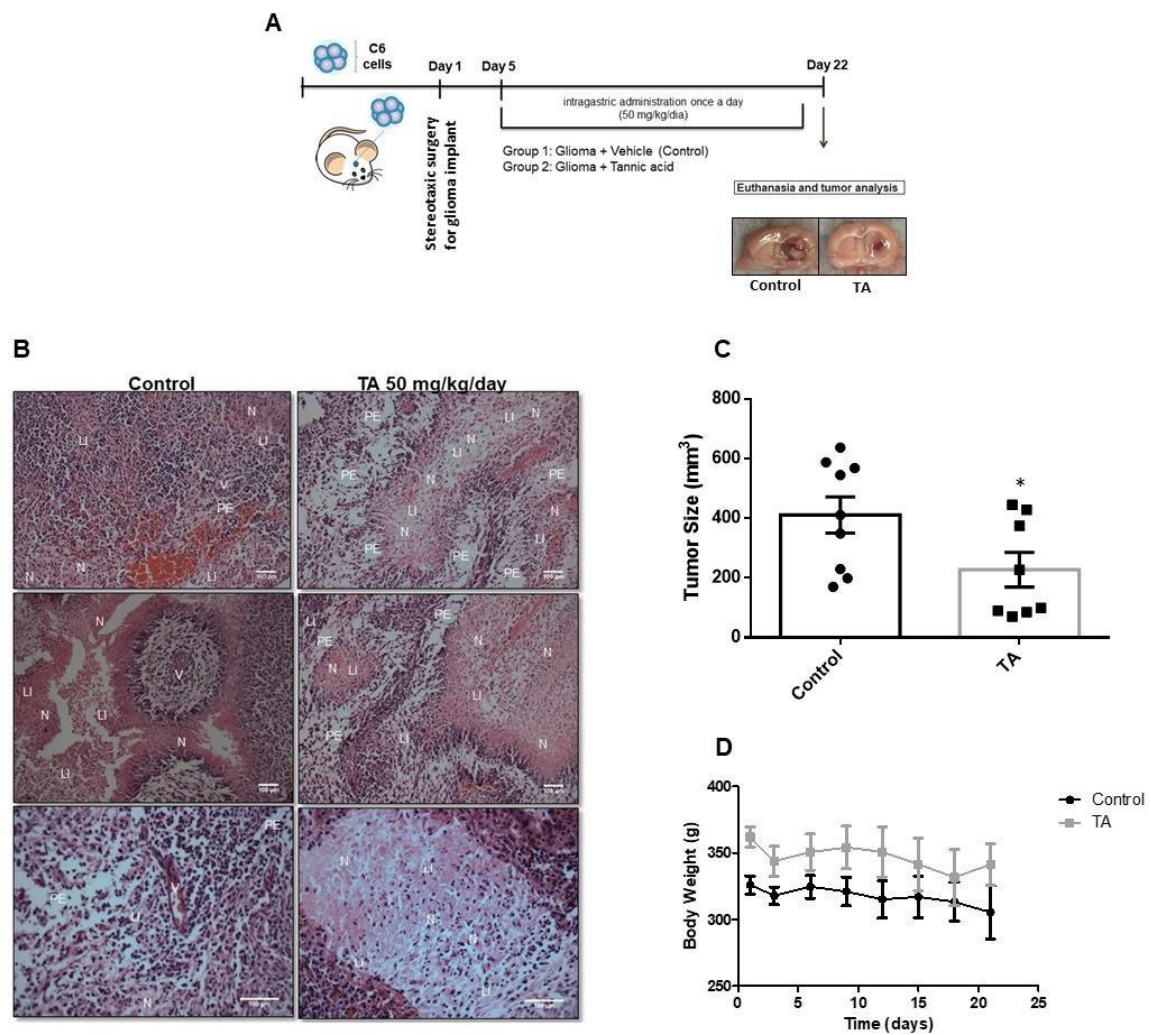


Figure 7 C6 glioma cells were implanted intracerebroventricularly in adult rats and treatment was started 5 days later and was given for 15 days. On the 22nd day the animals were euthanized and the brain was collected (A). The brain was sectioned three times, stacked and analyzed by HE. The HE images were captured using a camera coupled to a microscope (B) and the total volume (mm^3) was determined using the ImageJ software (C). Body weight of the animals submitted to the glioma implant were analyzed every 3 days ($n = 8$) (D). Data were analyzed by Student's *t*-test. * $P < 0.05$ versus the control group

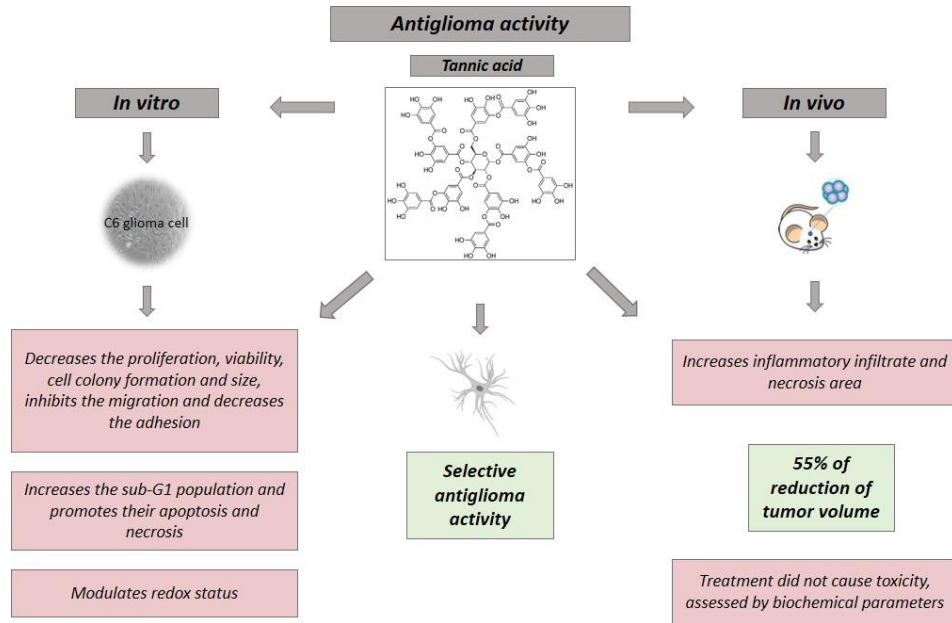


Figure 8 Overview of anti-glioma activity of tannic acid *in vitro* and *in vivo*

5 CONCLUSÃO

Em nosso estudo foi possível observar o efeito citotóxico do AT frente a linhagem de glioma de rato C6. É importante ressaltar a seletividade desse efeito, visto que o composto não demonstrou citotoxicidade em cultivo primário de astrócitos. Além disso, o AT foi capaz de diminuir a formação e o tamanho das colônias em linhagem de glioma, assim como de inibir a migração e diminuir a adesão das células tumorais. O AT foi capaz de aumentar a população celular em sub-G1 e promover morte celular por apoptose e necrose. Em comparação com o fármaco padrão TMZ, foi possível observar que o AT reduziu a proliferação celular de forma mais pronunciada. Ainda, esse composto demonstrou um efeito antioxidante frente a linhagem de glioma de rato C6, visto que diminuiu o nível de ERO e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes.

Por fim, o AT demonstrou um efeito antiglioma em modelo pré-clínico de glioblastoma, pois reduziu significativamente o tamanho do glioma nos animais tratados quando comparados ao controle. Além disso, o tratamento com AT não demonstrou nenhum tipo de toxicidade para os animais, conferindo uma segurança do seu uso na dose utilizada.

Com base em nossos resultados, foi possível demonstrar a ação antiglioma do AT tanto *in vitro* como em modelo pré-clínico de GBM, sendo assim uma alternativa promissora no tratamento dessa patologia. Esse estudo corrobora com outros da literatura que relatam as atividades anticâncer dos taninos, porém é o primeiro trabalho demonstrando o efeito do AT em um modelo pré-clínico de GBM.

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, Sameer, et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 1; p. 25-41, 2013.

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.

ALDAPE K, Zadeh G, Mansouri S, et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta Neuropathol**, v. 129, n.6, p. 829-848, 2015.

ALONSO, Marta M., et al. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. **Cancer Research**, v. 67, n. 24, p. 11499-11504, 2007.

ASHAFAQ, Mohammad; TABASSUM, Heena; PARVEZ, Suhel. Modulation of behavioral deficits and neurodegeneration by tannic acid in experimental stroke challenged Wistar rats. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 8, p. 5941-5951, 2017.

BEHIN, Anthony et al. Primary brain tumours in adults. **The Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 323-331, 2003.

BEHREND, L.; HENDERSON, G.; ZWACKA, R. M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 6, p. 1441-1444, 2003.

BRAY, Freddie, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BUZZINI, Pietro, et al. Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8 n.12, p.1179-1187, 2008.

CARAGHER, Seamus; CHALMERS, Anthony J.; GOMEZ-ROMAN, Natividad. Glioblastoma's Next Top Model: novel culture systems for brain cancer radiotherapy research. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 44, 2019.

CARAGHER, Seamus; CHALMERS, Anthony J.; GOMEZ-ROMAN, Natividad. Glioblastoma's Next Top Model: novel culture systems for brain cancer radiotherapy research. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 44, 2019.

CHABNER, Bruce A.; LONGO, Dan L. **Manual de Oncologia de Harrison**. AMGH Editora, 2015.

CHEN, Kuo-Shuen, et al. Tannic acid-induced apoptosis and-enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells. **Leukemia Research**, v. 33, n. 2, p. 297-307, 2009.

CHUNG, King-Thom, et al. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CRAGG, Gordon M.; GROTHAUS, Paul G.; NEWMAN, David J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014.

DESHPANDE, Rohit; HOYER, Wayne D.; DONTU, Naveen. The intensity of ethnic affiliation: A study of the sociology of Hispanic consumption. **Journal of Consumer Research**, v. 13, n. 2, p. 214-220, 1986.

ŘURAČKOVÁ, Zdeňka. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, n. 59, p. 459-469, 2010.

FANG, Xueping et al. Targeted tissue proteomic analysis of human astrocytomas. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 8, p. 3937-3946, 2012.

FURNARI, Frank B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, v. 21, n. 21, p. 2683-2710, 2007.

GALI, Hala U., et al. Hydrolyzable tannins: Potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 51, n. 3, p. 425-432, 1992.

GROSSMAN, STUART A.; ELLSWORTH, S. G. Published glioblastoma clinical trials from 1980 to 2013: Lessons from the past and for the future. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, p. suppl e13522, 2016.

HARVEY, Alan. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HASLAM, Edwin. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. **CUP Archive**, 1989.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

JANSEN, Michael; YIP, Stephen; LOUIS, David N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 717-726, 2010.

KILKUSKIE, Robert E., et al. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 12, p. 1529-1534, 1992.

KUO, Min-Liang; LEE, Kuen-Chen; LIN, Jen-Kun. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 270, n. 2, p. 87-95, 1992.

LENTING, Krissie, et al. Glioma: experimental models and reality. **Acta Neuropathologica**, v.133, n. 2, p. 263-282, 2017.

LEE, Sang Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198-210, 2016.

LOPES, George KB; SCHULMAN, Herbert M.; HERMES-LIMA, Marcelo. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions¹. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1472, n. 1-2, p. 142-152, 1999.

LÓPEZ-GÓMEZ, Miriam et al. Cancer in developing countries: the next most preventable pandemic. The global problem of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 1, p. 117-122, 2013.

LOUIS, David N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

MA, Qianquan, et al. Cancer stem cells and immunosuppressive microenvironment in glioma. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2924, 2018.

MAHER, Elizabeth A. et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11502-11513, 2006.

MANGAN, J. L. Nutritional effects of tannins in animal feeds. **Nutrition Research Reviews**, v. 1, n. 1, p. 209-231, 1988.

MESSALI A, Villacorta R, Hay JW. A Review of the economic burden of Glioblastoma and the cost effectiveness of pharmacologic treatments. **Pharmacoeconomics**, v. 32, n. 12, p. 1201, 2014.

MRUGALA, Maciej M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. **Discovery Medicine**, v. 15, n. 83 p. 221-230, 2013.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.; SNADER, Kenneth M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

OHGAKI H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathol**, v. 109, n. 1, p.93–108, 2005.

OSTROM, Quinn T. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro-oncology**, v. 15, n. suppl 2, p. ii1-ii56, 2013.

OZBEN, Tomris. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p. 2181-2196, 2007.

PERELSHTAIN, Ilana, et al. Tannic acid NPs–synthesis and immobilization onto a solid surface in a one-step process and their antibacterial and anti-inflammatory properties. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1916-1920, 2014.

RIEMENSCHNEIDER, Markus J. et al. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. **Acta Neuropathologica**, v. 120, n. 5, p. 567-584, 2010.

SAHINER, Nurettin; SAGBAS, Selin; AKTAS, Nahit. Single step natural poly (tannic acid) particle preparation as multitalented biomaterial. **Materials Science and Engineering: C**, v. 49, p. 824-834, 2015.

SALAZAR-RAMIRO, Aleli, et al. Role of redox status in development of glioblastoma. **Frontiers in Immunology**, n. 7, p. 156, 2016.

SANT'ANA, A. E. G. Em Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil. **Araújo, EL**, 2002.

SEN, Halil Murat, et al. Effects of tannic acid on the ischemic brain tissue of rats. **Inflammation**, v. 38 n. 4, p. 1624-1630, 2015.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SOSA, Venus, et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

STEWART, Bernard W.; WILD, C. P. World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. **World Health Organization**, v. 505, 2014.

STUPP, R., et al. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 25, n. suppl_3, p. iii93-iii101, 2014.

THAKKAR, Jigisha P., et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 2014.

TIEK, Deanna M., et al. Alterations in Cell Motility, Proliferation, and Metabolism in Novel Models of Acquired Temozolomide Resistant Glioblastoma. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7222, 2018.

TOMASETTI, Cristian; LI, Lu; VOGELSTEIN, Bert. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n.6331, p. 1330-1334, 2017.

VAN MEIR, Erwin G. et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166-193, 2010.

WEN, Patrick Y.; KESARI, Santosh. Malignant gliomas in adults. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 5, p. 492-507, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em <<https://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 10 de jan. 2019.

WU, Xin-Jiang; KASSIE, Fekadu; MERSCH-SUNDERMANN, Volker. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n.1, p. 115-124, 2005.

WU, Xiuwei, et al. Effects of Rab27a on proliferation, invasion, and anti-apoptosis in human glioma cell. **Tumor Biology**, v. 34, n. 4, p. 2195-2203, 2013.

ANEXOS

Anexo A - Carta de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

08/02/2019

SEI/UFPel - 0278125 - Parecer



PARECER N°
PROCESSO N°

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
104/2018/CEEA/REITORIA
23110.031292/2018-18

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação das atividades antitumoral e antioxidante de produtos naturais em modelo pré - clínico de glioblastoma multiforme**” processo número 23110.031292/2018-18, de responsabilidade de Francieli Moro Stefanello- que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/09/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino	
Vigência da autorização	15/09/2018 a 01/07/2020	
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar	
Nº de animais	296	
Idade	80 RN	216 com 60 dias
Sexo	Machos e Fêmeas	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel	

Código para cadastro CEEA 31292-2018

SEI/UFPel - 0278125 - Parecer

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 14/09/2018, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0278125** e o código CRC **5A02D3A7**.