

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



Dissertação

**Extrato hidroalcoólico de *Butia odorata* sobre linhagens de glioma C6 e U87MG:
explorando possíveis mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios**

Juliane Torchelsen Saraiva

Pelotas, 2024

Juliane Torchelsen Saraiva

**Extrato hidroalcoólico de *Butia odorata* sobre linhagens de glioma C6 e U87MG:
explorando possíveis mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios**

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 à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello

Coorientadora: Dr^a. Nathalia Stark Pedra

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S243e Saraiva, Juliane Torchelsen

Extrato hidroalcoólico de *Butia odorata* sobre linhagens de glioma C6 e U87MG [recurso eletrônico] : explorando possíveis mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios / Juliane Torchelsen Saraiva ; Francieli Moro Stefanello, orientadora ; Nathalia Stark Pedra, coorientadora. — Pelotas, 2024.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Câncer. 2. Antiglioma. 3. Glioblastoma. 4. Frutos. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Pedra, Nathalia Stark, coorient. III. Título.

CDD 616.9948

Elaborada por Maria Beatriz Vaggetti Vieira CRB: 10/1032

Juliane Torchelsen Saraiva

**Extrato hidroalcoólico de *Butia odorata* sobre linhagens de glioma C6 e U87MG:
explorando possíveis mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios**

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: 03/09/2024

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **FRANCIELI MORO STEFANELLO**
Data: 08/10/2024 19:25:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Francieli Moro Stefanello (Orientadora)

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

Documento assinado digitalmente
 **ELESSANDRA DA ROSA ZAVAREZE**
Data: 09/10/2024 14:29:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Elessandra da Rosa Zavareze

Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Documento assinado digitalmente
 **ROBERTO FARINA DE ALMEIDA**
Data: 14/10/2024 07:57:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Roberto Farina de Almeida

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

**Dedico este trabalho à minha família. Sem vocês
nada seria possível.**

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço profundamente aos meus pais Ubirajara e Marlene, e à minha irmã, Maiara, por estarem sempre ao meu lado, me motivando e oferecendo o suporte necessário em cada etapa da minha vida. Ao meu namorado Andrei, sou imensamente grata por todas as palavras de carinho e amor, por compartilhar comigo os momentos felizes e me amparar nos períodos difíceis. Não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão. À Cláudia e Andressa, mesmo que às vezes distantes fisicamente, agradeço de coração por sempre torcerem e acreditarem em mim.

À minha amiga Fran, minha parceira desde a Iniciação Científica, sou grata por todo apoio, pela paciência em ouvir minhas lamentações, e, principalmente, pelas risadas que tornaram nossos dias no laboratório mais leves. Ao William, que se tornou um grande colega e parceiro de laboratório, agradeço por toda ajuda. Aos demais colegas dos laboratórios Biomarcadores e Neurocan, agradeço por todas as trocas de conhecimento e pelo auxílio ao longo dessa trajetória.

À minha coorientadora Nathalia, que me acompanha desde o TCC, agradeço pelos ensinamentos, pelo apoio constante e por ser uma pessoa tão atenciosa. À minha orientadora Francieli, que é uma das minhas maiores inspirações profissionais e pessoais, obrigado por todos os conhecimentos compartilhados e por estar sempre disponível para me auxiliar.

Por fim, agradeço à CAPES pelo suporte financeiro e à Universidade Federal de Pelotas por me proporcionar a oportunidade de me tornar mestre em uma instituição pública e de qualidade.

Muito obrigado!

“A ciência é a poesia da realidade” Richard Dawkins.

Resumo

SARAIVA, Juliane Torchelsen. **Extrato hidroalcoólico de *Butia odorata* sobre linhagens de glioma C6 e U87MG: explorando possíveis mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios**. Orientadora: Francieli Moro Stefanello. 2024. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

O fruto de *Butia odorata* (BO), uma planta nativa da América do Sul, vem ganhando destaque por conta de sua elevada constituição bioativa, que inclui flavonoides, ácidos fenólicos e carotenoides. Esses compostos são amplamente relatados na literatura por exercerem propriedades benéficas à saúde humana, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antitumorais. Aliado a isso, os gliomas são tumores heterogêneos que afetam o sistema nervoso central, sendo o glioblastoma (GBM) o tipo de glioma que apresenta o maior grau de malignidade. O tratamento dessa patologia consiste em cirurgia, radioterapia e quimioterapia, entretanto a sobrevida média dos pacientes permanece apenas entre 14 e 18 meses. Dessa forma, enfatiza-se a pesquisa por alternativas terapêuticas a fim de melhorar o prognóstico dos pacientes. Assim, o objetivo deste trabalho foi explorar o efeito antiglioma *in vitro* do extrato hidroalcoólico padronizado de BO sobre as linhagens de glioma de rato (C6) e humano (U87MG). Para isso, as células foram expostas a diferentes concentrações do extrato (125 a 2000 µg/mL) nos tempos de 0, 2, 4, 6, 24, 48 e/ou 72 h. Em seguida, avaliou-se a viabilidade, proliferação celular, formação de colônias, parâmetros redox nas linhagens C6 e U87MG, bem como a migração celular e expressão relativa de mRNA de genes relacionados à gliomagenese na linhagem C6. Primeiramente, o extrato de BO reduziu significativamente a viabilidade e proliferação celular nos períodos de 24, 48 e 72 h, bem como a formação de colônias no tempo de 72 h, tanto na linhagem C6 como na U87MG. Em sequência, o extrato não promoveu alterações significativas em astrócitos em 72 h de tratamento, sugerindo um efeito citotóxico seletivo. Com relação aos parâmetros redox, após 72 h de tratamento com o extrato, em ambas as linhagens foi observada uma redução das espécies reativas de oxigênio e de nitritos, uma elevação da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, bem como um aumento no conteúdo de sulfidrilas. Ademais, com relação a linhagem C6, o extrato na concentração de 750 µg/mL reduziu a migração celular, bem como modulou de forma mais relevante na concentração de 2000 µg/mL a expressão de genes envolvidos no contexto do GBM, como *metaloproteinase de matriz 2*, *O6-metilguanina-DNA-metiltransferase*, *caspase 3*, *fator nuclear kappa B* e *interleucina 6*. Esses resultados sugerem que o extrato de BO exerce um potencial efeito antitumoral sobre modelo *in vitro* de glioma, atuando principalmente em vias relacionadas ao estado redox e inflamação.

Palavras-chave: câncer; antiglioma; glioblastoma; frutos.

Abstract

SARAIVA, Juliane Torchelsen. **Hydroalcoholic extract of *Butia odorata* on C6 and U87MG glioma cell lines: exploring possible antioxidant and anti-inflammatory mechanisms.** Advisor: Francieli Moro Stefanello. 2024. 79 f. Dissertation (Master degree) – Post-graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal University of Pelotas.

The fruit of *Butia odorata* (BO), a plant native to South America, has been gaining attention due to its high bioactive composition, which includes flavonoids, phenolic acids, and carotenoids. These compounds are widely reported in the literature for their beneficial properties for human health, including anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor effects. Additionally, gliomas are heterogeneous tumors that affect the central nervous system, with glioblastoma (GBM) being the type of glioma that presents the highest degree of malignancy. The treatment of this pathology typically involves surgery, radiotherapy, and chemotherapy; however, the average patient survival remains only between 14 and 18 months. Therefore, emphasis is placed on the search for therapeutic alternatives to improve the prognosis of patients. This study aimed to investigate the in vitro antiglioma effect of a standardized hydroalcoholic extract of BO on rat (C6) and human (U87MG) glioma cell lines. For this purpose, the cells were exposed to different concentrations of the extract (125 to 2000 µg/mL) at times of 0, 2, 4, 6, 24, 48, and/or 72 h. Then, cell viability, proliferation, colony formation, and redox balance parameters were evaluated on the C6 and U87MG cell lines, as well as cell migration and the relative mRNA expression of genes related to gliomagenesis in the C6 cell line only. First, the BO extract significantly reduced cell viability and proliferation at 24, 48, and 72 h, as well as colony formation at 72 h, in both C6 and U87MG cell lines. Additionally, the extract did not promote significant changes in astrocytes at 72 h of treatment, suggesting a selective cytotoxic effect. Regarding the redox balance parameters, after 72 h of treatment with the extract, a reduction in reactive oxygen species and nitrites, an increase in the activity of superoxide dismutase and catalase enzymes, and an increase in sulfhydryl content were observed in both cell lines. Furthermore, in the C6 cell line, the extract at a concentration of 750 µg/mL reduced cell migration, and, more significantly, at a concentration of 2000 µg/mL modulated the expression of genes involved in the context of GBM, such as *matrix metalloproteinase 2*, *O6-methylguanine-DNA-methyltransferase*, *caspase 3*, *nuclear factor kappa B*, and *interleukin 6*. These results suggest that the BO extract exerts a potential antitumor effect in an in vitro glioma model, primarily through mechanisms involving redox regulation and inflammation.

Keywords: cancer; antiglioma; glioblastoma; fruits.

Lista de Figuras

Figura 1 – Diferenças entre um cérebro saudável e com GBM.....	21
--	----

Lista de abreviaturas e siglas

BHE	Barreira hemato-encefálica
BO	<i>Butia odorata</i>
C6	Linhagem de glioma de rato
CAT	Catalase
Casp-3	Caspase 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGCG	Epigallocatequina-galato
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GBM	Glioblastoma
g	Gramas
h	Horas
HaCAT	Linhagem de queratinócito humano
HNO	Nitrila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO•	Radical hidroxila
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IDH	Enzima isocitrato desidrogenase
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Keap1	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch
kg	Quilograma
L929	Linhagem de fibroblasto murino
mg	Miligrama
MGMT	O6-metilguanina-DNA-metiltransferase
mL	Mililitro
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2

MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido nítrico
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TERT	Transcriptase reversa de telomerase
TMZ	Temozolomida
U87MG	Linhagem de glioma humano
μg	Micrograma
μL	Microlitro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Produtos naturais	16
3.2 Frutos amarelos e <i>Butia odorata</i>	16
3.3 Câncer e dados epidemiológicos	19
3.4 Gliomas	20
3.4.1 Contribuição do estresse oxidativo e inflamação nos gliomas	22
3.4.2 Sintomatologia, diagnóstico e tratamento.....	24
3.4.3 Importância do uso de linhagens celulares de glioma.....	25
4 MANUSCRITO	26
5 DISCUSSÃO	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS.....	69
Anexos	77

1 INTRODUÇÃO

A busca por compostos naturais, incluindo de agentes antineoplásicos derivados de plantas, vem sendo realizada há décadas (Asma *et al.*, 2022). Estudos destacam os efeitos antitumorais desses compostos, que atuam por diferentes mecanismos de ação, como a indução de apoptose, a inibição da angiogênese e a supressão do crescimento tumoral (Persano *et al.*, 2023). Além disso, extratos vegetais têm demonstrado efeitos promissores contra tumores, mais especificamente em modelos *in vivo* e *in vitro* de glioma (Da Silveira *et al.*, 2022; Bona *et al.*, 2024).

Nesse contexto, os frutos amarelos se destacam por suas altas concentrações de compostos fenólicos totais, vitaminas e carotenoides (Irías-Mata *et al.*, 2018). Mais especificamente, os frutos da espécie *Butia odorata* (BO) possuem uma ampla composição de moléculas bioativas, que proporcionam benefícios à saúde humana (Barbosa *et al.*, 2021). Estudos anteriores com extratos de frutos amarelos demonstraram propriedades biológicas, como a redução da viabilidade celular, ativação de caspases e indução de parada de ciclo celular (Medina *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2017).

Aliado a isso, o câncer refere-se a um grupo de enfermidades marcadas pelo crescimento descontrolado de células, resultando na formação de tumores que podem se espalhar para outras regiões do corpo (Inca, 2022). Essa doença é a principal causa de óbitos em países desenvolvidos e está diretamente ligada à combinação dos impactos gerados pela exposição a múltiplos fatores de risco, como o tabagismo, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas e a ingestão de alimentos ultraprocessados (Sun *et al.*, 2020). Atualmente, o câncer é considerado um dos desafios mais complexos enfrentados pelo sistema de saúde brasileiro, devido à sua abrangência epidemiológica, além de seu impacto social e econômico (Inca, 2019).

Dentre os tipos de cânceres existentes, os gliomas são os tumores mais comuns que acometem o sistema nervoso central (SNC). O glioblastoma (GBM), classificado como um glioma do tipo-adulto de maior grau de malignidade, é reconhecido como o tumor cerebral mais mortal (Biserova *et al.*, 2021). A tumorigênese dos gliomas é considerada complexa devido ao envolvimento de diferentes vias relacionadas com o

estresse oxidativo, inflamação, entre outras (Fan *et al.*, 2020; Ostrowski; Pucko, 2022). O tratamento para os gliomas geralmente envolve ressecção cirúrgica quando viável, seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ). No entanto, apesar dessas intervenções, o prognóstico desses pacientes continua sendo desanimador, com uma sobrevida que varia de 14 a 18 meses (Biserova *et al.*, 2021). Portanto, é essencial explorar alternativas terapêuticas a fim de melhorar as perspectivas desses pacientes. Dessa forma, considerando a problemática do prognóstico sombrio dos pacientes associado ao tratamento insatisfatório do glioma, o extrato de BO se torna um alvo promissor de pesquisa nesse âmbito.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antiglioma *in vitro* do extrato hidroalcoólico de BO.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antitumoral do extrato de BO em linhagem de glioma de rato (C6) e humano (U87MG) através dos ensaios de viabilidade celular, proliferação celular e clonogênico;
- Avaliar a atividade citotóxica do extrato de BO em cultivo primário de astrócitos através dos ensaios de viabilidade e proliferação celular;
- Avaliar o efeito do extrato de BO sobre parâmetros redox nas linhagens C6 e U87MG;
- Avaliar o efeito do extrato de BO sobre a migração celular na linhagem C6;
- Avaliar o efeito do extrato de BO sobre a expressão de genes relacionados à tumorigênese do glioma na linhagem C6.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produtos naturais

A investigação de agentes antineoplásicos originários de fontes naturais data de muitas décadas, entretanto a pesquisa científica nessa área começou por volta de 1950. Entre os primeiros quimioterápicos derivados de plantas, destacam-se os alcaloides da vinca, derivados da camptotecina, da podofilotoxina e análogos do taxol (Asma *et al.*, 2022). Mais especificamente, a árvore da espécie *Taxus brevifolia* produz o metabólito secundário paclitaxel, considerado um potente agente antineoplásico, que teve seu uso aprovado para o tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo de mama, ovário, pulmão e sarcoma de Kaposi (Gallego-Jara *et al.*, 2020).

Além disso, a espécie *Catharanthus roseus* é uma das plantas terapêuticas mais investigada mundialmente; extratos dessa planta são ricos em compostos que exercem diversas atividades biológicas, como antioxidante, antimicrobiana, antidiabética e antitumoral. As moléculas vincristina e vimblastina são alcaloides originários das folhas de *C. roseus*, sendo comumente usadas no tratamento de diferentes tipos de câncer, como câncer testicular, linfoma de Hodgkin e leucemia (Kumar; Singh; Singh, 2022). Com base nisso, evidencia-se a importância da investigação de compostos naturais com potencial antitumoral.

3.2 Frutos amarelos e *Butia odorata*

Os frutos amarelos se destacam devido às suas altas concentrações de compostos fenólicos totais, vitaminas e carotenoides (Irías-Mata *et al.*, 2018). Os carotenoides, particularmente, são responsáveis pela coloração amarelo-alaranjada desses frutos e podem atuar na proteção das células contra danos causados por radicais livres (Xavier; Pérez-Gálvez, 2016). Ressalta-se que a América do Sul apresenta uma gama de frutas nativas, que vêm se popularizando por conta de suas características bioativas e nutricionais. Dentre as espécies nativas existentes, os frutos denominados de butiás pertencem à família Arecaceae e consistem em palmeiras do

gênero *Butia* spp. que podem atingir cerca de 10 metros de altura (Antunes *et al.*, 2024).

Os frutos de butiá apresentam algumas características específicas, como formatos ovóides a globulares com diâmetros na faixa de 1,7 a 4,2 centímetros, bem como coloração variável de amarelo claro a laranja-avermelhado (Morais *et al.*, 2022; Antunes *et al.*, 2024). Tendo em vista suas características organolépticas, os frutos de butiá são comumente utilizados na indústria para o preparo de sucos, licores, geleias e polpas (Hoffmann *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2021). Ainda, esses frutos despertam o interesse industrial por conta da sua rica composição nutricional de moléculas bioativas, como fenólicos totais, carotenoides, vitaminas e minerais, nos quais possuem alta capacidade antioxidante e, conseqüentemente, exercem benefícios à saúde humana (Barbosa *et al.*, 2021).

O gênero *Butia* spp. é composto por 20 espécies que se encontram na América do Sul, mais especificamente no Brasil e Uruguai (Hoffmann *et al.*, 2017). Dentre essas, Hoffmann *et al.* (2017) demonstraram que a espécie de BO possui uma rica composição de compostos fenólicos, incluindo os ácidos gálico, cafeico, clorogênico, hidroxibenzoico e cumárico, bem como flavonoides: catequina, epicatequina, quercetina e oleturina. Já os principais carotenoides encontrados são a β -criptoxantina, β -caroteno e luteína. Esses compostos são amplamente relatados na literatura por conta de suas propriedades biológicas, incluindo efeitos antioxidantes e neuroprotetores, bem como auxílio na prevenção de doenças cardiovasculares e de cânceres (Hoffmann *et al.*, 2017; Boeing *et al.*, 2020).

Além disso, cabe salientar que Boeing *et al.* (2020) analisaram o extrato hidroalcoólico de BO (80:20 v/v) detectando 13 compostos fenólicos, especialmente a (+) catequina ($259 \pm 18 \text{ mg kg}^{-1}$), (-) epicatequina ($211 \pm 12 \text{ mg kg}^{-1}$) e rutina ($161 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1}$) em maior concentração. Esses compostos fenólicos são da classe dos flavonoides, provenientes do metabolismo secundário de plantas que atuam como mecanismo de defesa contra agentes estressores, como radiação UV e infecções (Liu *et al.*, 2021), e exercem diferentes efeitos biológicos benéficos, incluindo ação antitumoral (Sharifi-Rad *et al.*, 2020; Farhan, 2022).

Ainda, Boeing *et al.* (2020) relataram que o extrato hidroalcoólico de BO exerce efeitos antineoplásicos sobre diferentes linhagens tumorais, entretanto não promove alteração na viabilidade de linhagens saudáveis, demonstrando efeito citotóxico seletivo. Ainda, Ramos *et al.* (2020) observaram que o extrato de BO promove efeitos hipolipemiantes e anti-inflamatórios em ratos submetidos ao modelo de hiperlipidemia induzido por tiloxapol, porém não exerce alterações significativas sobre as enzimas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, indicando que este tratamento não promove toxicidade *in vivo*.

Outros extratos de plantas com frutos amarelos são conhecidos por sua rica composição bioativa e por exercerem alguns efeitos biológicos. Dentre eles, o extrato dos frutos amarelos de *Psidium cattleianum*, popularmente conhecido por araçá, possui uma maior concentração de fenóis totais e flavonoides em comparação ao fruto vermelho dessa espécie (Munieweg *et al.*, 2023). Medina *et al.* (2011) demonstraram que o extrato de araçá amarelo reduziu seletivamente a viabilidade de linhagens de câncer de cólon (Caco-2) e de mama (MCF-7), sem causar alterações significativas em fibroblastos (3T3) (Medina *et al.*, 2011). Além disso, os extratos aquosos das folhas e raízes de *Campomanesia adamantium* (guabiroba) são ricos em flavonóis glicosilados e ácido elágico, respectivamente, e apresentam atividade antileucêmica *in vitro* através da ativação de caspases 3 (casp-3) e 9, induzindo a parada do ciclo celular na fase S (Campos *et al.*, 2017).

Diante do panorama dos tumores cerebrais, para que os compostos naturais atinjam o cérebro e exerçam sua ação neuroprotetora é indispensável que sejam capazes de ultrapassar a BHE (Sánchez-Martínez *et al.*, 2022). Dessa forma, os compostos fenólicos já foram descritos por sua capacidade de permear a BHE e, com isso, desempenhar atividades biológicas em modelos *in vivo* de doenças neurodegenerativas, bem como no GBM (Zhai *et al.*, 2021; Nájera-Maldonado *et al.*, 2024). Além disso, outras características cruciais para que as substâncias naturais sejam apropriadas para o consumo humano incluem a baixa toxicidade e um perfil favorável de efeitos colaterais (Zhai *et al.*, 2021). Assim, o emprego de plantas e frutos

no âmbito medicinal torna-se uma alternativa promissora de tratamento tendo em vista sua baixa toxicidade (Morais *et al.*, 2022).

3.3 Câncer e dados epidemiológicos

Atualmente, o câncer pode ser definido como uma doença caracterizada pela proliferação incontrolável de células transformadas (Brown *et al.*, 2023). As células tumorais possuem capacidade de desprendimento do tumor e, quando atingem algum vaso sanguíneo ou linfático, podem deslocarem-se para o restante do organismo, formando as metástases (Inca, 2022). Quando se observa tumores sólidos microscopicamente, evidencia-se a presença do microambiente tumoral, que pode ser dito como um sistema complexo composto por células tumorais cercadas por diferentes tipos celulares não malignos, que estão inseridos em uma matriz extravascular modificada (De Visser; Joyce, 2022). Ressalta-se que essas células neoplásicas são capazes de alterar vias moleculares com o objetivo de contornar os mecanismos protetores que atuam contra a formação de tumores (Senga; Grose, 2021).

Ademais, o câncer é considerado um sério problema global, que contribui significativamente para as mortes por doenças não transmissíveis em todo o mundo. É uma das principais causas de morte em adultos entre 30 e 69 anos em grande parte dos países, e impõe custos sociais e econômicos (Bray *et al.*, 2024). Mundialmente, em 2022 foram registrados cerca de 20 milhões de novos casos de câncer, juntamente com 9,7 milhões de mortes atribuídas a essa doença. Estimativas indicam que aproximadamente uma em cada cinco pessoas desenvolverá câncer ao longo da vida, enquanto cerca de 1 em cada 9 homens e 1 em cada 12 mulheres morrem por conta dessa doença (Bray *et al.*, 2024). No Brasil, para o triênio de 2023 a 2025 são esperados 704 mil novos casos de câncer (Santos *et al.*, 2023).

Dentre os diferentes tipos de câncer existentes, os gliomas de alto grau, mais especificamente o GBM, destaca-se no presente estudo. Dados epidemiológicos mostraram que no Brasil os tumores do SNC ocupam a décima primeira posição entre os tipos de câncer mais frequentes, com taxas mais elevadas observadas na Região Sul (Inca, 2022). Embora os cânceres que afetam o SNC não estejam entre os mais

incidentes no Brasil, é estimado para cada ano do triênio de 2023 a 2025 que ocorram 11.490 casos, sendo 6.110 novos casos em homens e 5.380 novos casos em mulheres (Inca, 2022; Santos *et al.*, 2023). Especificamente na Região Sul, as taxas de incidência são de 8,54 a cada 100 mil homens e de 7,12 a cada 100 mil mulheres (Inca, 2022). Apesar dessa baixa frequência, esses tumores refletem um cenário desafiador no contexto da neuro-oncologia devido ao seu prognóstico grave e resposta insuficiente ao tratamento convencional (Biserova *et al.*, 2021).

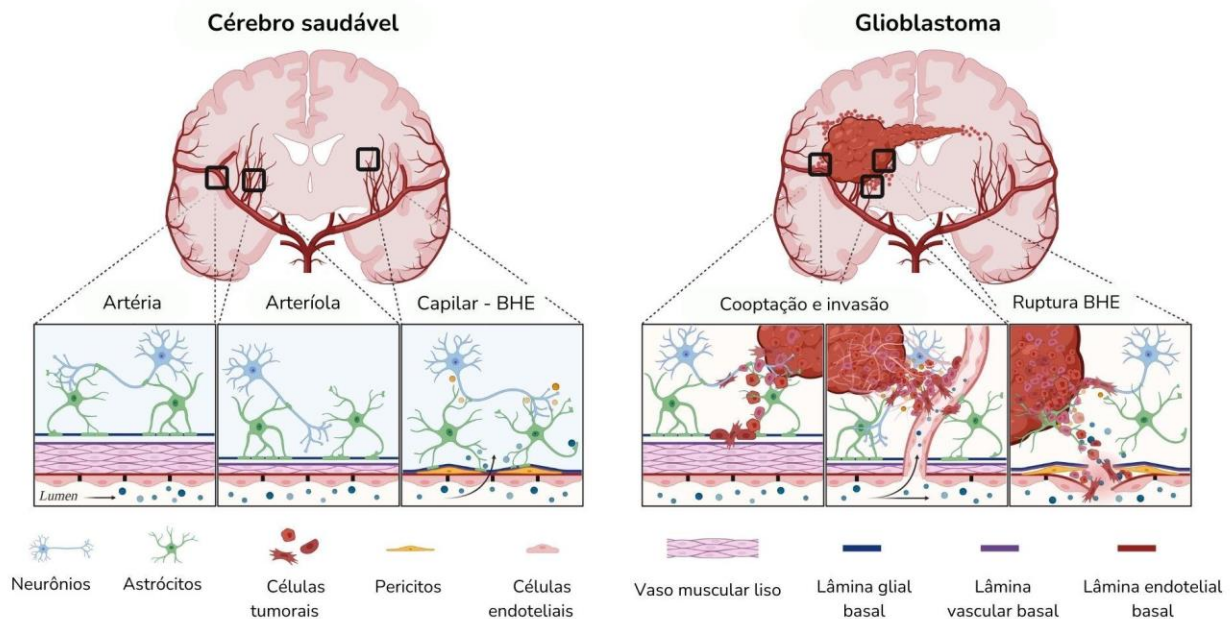
3.4 Gliomas

Os gliomas são descritos como uma classe heterogênea de tumores do SNC que atingem o cérebro e a medula espinhal (Biserova *et al.*, 2021). Salienta-se que a origem do GBM ainda está em investigação, entretanto uma das hipóteses sugere que essa neoplasia pode se iniciar em diferentes tipos de células precursoras, incluindo as neurais, as de oligodendrócitos e as astrocitárias (Ah-Pine *et al.*, 2023). Além disso, há evidências de que mutações condutoras nas células-tronco neurais da zona subventricular cerebral desempenham um papel importante no desenvolvimento de GBM, inferindo-as como possíveis células originárias (Ah-Pine *et al.*, 2023).

O atual sistema de classificação proposto pela Organização Mundial da Saúde distingue os gliomas de acordo com o padrão de crescimento, podendo ser do tipo difuso ou circunscrito, bem como a faixa etária (glioma difuso tipo-adulto ou tipo-pediátrico) e grau de malignidade (1 a 4) com base nas alterações genéticas apresentadas pelo paciente (Louis *et al.*, 2021). Nessa classificação foi registrado o estado mutacional da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) como característica definidora de astrocitomas do tipo-adulto, mantendo o termo “glioblastoma” especificamente para tumores IDH tipo-selvagem (Louis *et al.*, 2021; Whitfield; Huse, 2022). Assim, os gliomas difusos do tipo-adulto de maior malignidade podem ser diferenciados em astrocitoma de grau 4 (IDH mutante) e GBM (neoplasia de grau 4 que apresenta IDH tipo-selvagem) (Louis *et al.*, 2021). Ainda, o GBM pode ser categorizado em primário, ou seja, sem lesão precursora de tumores astrocíticos, ou secundário, proveniente de astrocitoma pré-existente (Biserova *et al.*, 2021).

O GBM é caracterizado por ser a forma mais agressiva e letal dentre os gliomas, culminando em uma perspectiva extremamente desfavorável dos pacientes (Louis *et al.*, 2021). De acordo com o Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos de 2016 a 2020, evidenciou-se que o GBM foi o tipo de tumor cerebral mais comum, compreendendo a 50,9% dentre os tumores malignos do SNC (Ostrom *et al.*, 2023). Esse tipo tumoral possui uma alta capacidade de invasão (Figura 1), onde as células cancerosas são capazes de penetrar e/ou migrar para os vasos sanguíneos para favorecer o crescimento tumoral por meio da cooptação, bem como deslocar as extremidades dos astrócitos e afetar a estabilidade dos pericitos, resultando em capacidade de evasão celular (Guyon *et al.*, 2021; Ah-Pine *et al.*, 2023).

Figura 1 – Diferenças entre um cérebro saudável e com GBM



Fonte: Adaptado de (Guyon *et al.*, 2021).

A natureza complexa do GBM envolve diversos marcadores moleculares e cascatas de sinalização (Biserova *et al.*, 2022). O GBM possui como principais características a proliferação microvascular e/ou necrose, mutação do promotor do

gene que codifica a transcriptase reversa da telomerase (TERT) e superexpressão do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Whitfield; Huse, 2022). A mutação do gene TERT é responsável por promover o crescimento tumoral, ao passo que a amplificação de EGFR conduz a elevação da sinalização pró-divisão e pró-sobrevivência celular (Whitfield; Huse, 2022). Ainda, a proliferação irrestrita do GBM é promovida através da supressão de mecanismos normais de controle celular, como a proteína supressora tumoral p53, além da regulação de componentes relacionados à morte celular por apoptose, como é o caso das casp-3 e 9 (Zhai *et al.*, 2021).

3.4.1 Contribuição do estresse oxidativo e inflamação nos gliomas

Em condições fisiológicas, os compostos oxidantes se formam constantemente como produtos do metabolismo, enquanto os antioxidantes controlam a produção e evitam a formação excessiva desses compostos (Ighodaro; Akinloye, 2018). Entretanto, quando há um desequilíbrio entre a produção das espécies oxidantes e a capacidade de defesa antioxidante, ocorre o processo denominado de estresse oxidativo (Shi *et al.*, 2023). Dentre essas espécies oxidantes destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), além de espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico (NO), dióxido nítrico (NO_2) e nitrila (HNO), nos quais influenciam na sinalização de funções fisiológicas em condições normais (Ramírez-Expósito; Martínez-Martos, 2019).

A formação desses compostos pode ocorrer dentro das células de glioma, com a produção de ERO como o $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$ e H_2O_2 ocorrendo principalmente nas mitocôndrias. As células de glioma apresentam uma alta demanda por ferro e produzem H_2O_2 em concentrações elevadas. Essas espécies reativas podem danificar o DNA mitocondrial, levando à disfunção da cadeia respiratória e culminando em níveis ainda maiores dessas espécies nas células (Ostrowski; Pucko, 2022).

Ainda, o desequilíbrio do estado redox pode culminar em vários fatores deletérios, como oxidação de proteínas, peroxidação de membranas celulares, bem como mutações genéticas, nos quais favorecem a carcinogênese (Ramírez-Expósito; Martínez-Martos, 2019). O estado de estresse oxidativo pode ativar a expressão de

fatores de transcrição e, conseqüentemente, levar a ativação de vias associadas à inflamação, bem como ao aumento da proliferação, invasão e quimiorresistência de células tumorais (Shi *et al.*, 2023). Ainda, as ERO estão envolvidas em diversas etapas do desenvolvimento dos gliomas, incluindo na migração celular (Ostrowski; Pucko, 2022).

Baseado no exposto, evidencia-se a importância de regular os mecanismos de defesa contra essas espécies reativas, visando proteger o organismo de danos oxidativos. Dessa forma, as defesas antioxidantes auxiliam na neutralização de espécies reativas, e, dentre as defesas enzimáticas, incluem-se a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Além disso, há a contribuição das defesas antioxidantes não-enzimáticas, como a glutathione, vitamina C e E, que contribuem na redução dos níveis de ERO (Ramírez-Expósito; Martínez-Martos, 2019).

Somado a isso, a inflamação pode ser descrita como uma resposta do organismo frente a danos teciduais causados por lesões físicas, infecções, dentre outros tipos de traumas. Essa resposta inflamatória promove alterações celulares e respostas imunológicas, resultando na reparação do tecido danificado e proliferação celular local. Entretanto, quando a causa da inflamação persiste, essa pode se tornar crônica e conduzir ao desenvolvimento de diferentes tipos de doenças, incluindo o câncer (Singh *et al.*, 2019).

Ressalta-se que a inflamação está ligada a diversas etapas da tumorigênese dos gliomas, como a proliferação celular, perda do controle do ciclo celular, metástase e angiogênese, bem como os linfócitos que invadem o tecido cerebral secretam diferentes tipos de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 β (Fan *et al.*, 2020). Ademais, o estado inflamatório está intimamente relacionado com o estresse oxidativo, uma vez que é responsável por promover a geração de ERO e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) que causam danos ao DNA, aumentando as chances de desenvolvimento de câncer (Fan *et al.*, 2020). Diante disso, considerar os parâmetros de equilíbrio redox bem como a marcadores de inflamação no GBM é de suma importância como alvo para novas terapias.

3.4.2 Sintomatologia, diagnóstico e tratamento

A manifestação clínica de indivíduos portadores de GBM varia de acordo com algumas características do tumor, como tamanho e localização cerebral. Os gliomas podem causar sintomas clínicos inespecíficos, como dores de cabeça, náuseas e vômitos, convulsões, confusão mental, desequilíbrio e alterações cognitivas (Leo; Frodey; Ruggieri, 2020; Schaff; Mellinghoff, 2023).

O diagnóstico de gliomas pode ser realizado através de ressonância magnética com contraste de gadolínio e de tomografia computadorizada (Weninger *et al.*, 2023; Hosseini *et al.*, 2023). Algumas técnicas avançadas de ressonância magnética permitem o fornecimento de informações fisiológicas que não podem ser obtidas através de uma ressonância magnética convencional, como é o caso da imagem ponderada em difusão e imagem de perfusão com contraste dinâmico (Hosseini *et al.*, 2023).

Atualmente, o tratamento padrão para o GBM constitui-se de uma terapia multimodal, na qual a primeira abordagem consiste em ressecção cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia combinada com o quimioterápico TMZ, sendo esse fármaco um agente alquilante de DNA que ultrapassa a barreira hematoencefálica (BHE). O mecanismo de ação do TMZ é baseado na adição de grupos metil em guaninas e adeninas, levando à interrupção do ciclo celular e indução de apoptose (Hotchkiss; Sampson, 2022). No entanto, comumente os pacientes apresentam quimiorresistência, resultando em uma resposta inadequada ao tratamento (Wu *et al.*, 2021; Tiek *et al.*, 2022).

Apesar de avanços no campo da ressecção cirúrgica, o prognóstico de portadores de gliomas ainda permanece ruim, uma vez que pacientes com gliomas de baixo grau apresentam taxas de sobrevida de 5 anos de até 80%, porém no caso de gliomas de alto grau as taxas de sobrevida de 5 anos permanecem abaixo de 5% (Ostrom *et al.*, 2019; Whitfield; Huse, 2022). Considerando isso, torna-se importante a busca por alternativas terapêuticas a fim de contornar os problemas descritos.

3.4.3 Importância do uso de linhagens celulares de glioma

Modelos *in vitro* são eficazes na investigação de vias relacionadas à progressão tumoral, bem como no desenvolvimento preliminar de novos tratamentos e diagnósticos. As linhagens celulares são ferramentas fundamentais no ramo da pesquisa oncológica básica, uma vez que expandiram o conhecimento sobre genes e vias desreguladas de diferentes tipos de câncer, sendo importantes na avaliação de agentes antineoplásicos, além de servir como uma alternativa ao uso de modelos animais (Allen *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2023).

Dentre as linhagens de glioma existentes, a linhagem de rato C6 é frequentemente utilizada em pesquisas terapêuticas. Essa linhagem serve como alvo molecular na investigação de novos agentes farmacológicos e em estudos sobre crescimento, invasão, imunologia e angiogênese (Giakoumettis; Kritis; Foroglou, 2018). É importante destacar que é fidedigna aos padrões dos gliomas e, quando utilizada em modelos animais, reproduz o ambiente de glioma humano (Giakoumettis; Kritis; Foroglou, 2018). Além disso, a linhagem U87MG de glioma humano é extensivamente utilizada em modelos experimentais de gliomas, devido às suas elevadas características de proliferação, migração e invasão celular (Li *et al.*, 2017). Uma importante característica do genoma da linhagem U87MG é o elevado número de anormalidades cromossômicas, frequentemente observadas em linhagens de células cancerígenas e em tumores primários (Clark *et al.*, 2010).

Cabe destacar, ainda, que ambas as linhagens de glioma têm sido amplamente empregadas em diversos estudos experimentais com enfoque nos potenciais efeitos antitumorais de extratos ou compostos isolados de origem natural, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Pedra *et al.*, 2018; Da Silveira *et al.*, 2022; Bona *et al.*, 2024; Simões *et al.*, 2024). Esses estudos ressaltam a relevância e a necessidade contínua de pesquisa pré-clínica nesse contexto, considerando a agressividade dos gliomas e a insatisfação dos tratamentos atualmente disponíveis (Simões *et al.*, 2024).

Por fim, salienta-se que ainda não foram relatados estudos *in vitro* do extrato de BO sobre linhagens de glioma. Considerando o exposto, evidencia-se a importância de investigar o potencial antiglioma do extrato desse fruto.

4 MANUSCRITO

Os resultados incluídos nesta dissertação são apresentados na forma de manuscrito. Os elementos Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências do manuscrito seguem a estrutura conforme as normas da revista ao qual foi submetido.

**Antitumor effect of *Butia odorata* hydroalcoholic extract on C6 and U87MG glioma cell lines:
impact on redox status and inflammation signaling**

Juliane Torchelsen Saraiva¹; Francieli da Silva dos Santos¹; Natália Pontes Bona¹; Larissa Menezes da Silveira¹; William Sanabria Simões¹; Giulia Bueno de Oliveira da Silva¹; Júlia Araújo da Silva¹; William Borges Domingues²; Mariana Cavalcanti Nascimento²; Vinicius Farias Campos²; Roselia Maria Spanevello³; Nathalia Stark Pedra³; Francieli Moro Stefanello^{1*}

¹Programa 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.

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Laboratório de Genômica Estrutural, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

³Programa 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.

*Corresponding author: Francieli Moro Stefanello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil, 96010-900, Phone: 55 53 32757355, Fax: 55 53 32757354, E-mail: fmstefanello@gmail.com and francieli.stefanello@ufpel.edu.br

Author's email address:

Juliane Torchelsen Saraiva: julianetorchelsen@gmail.com

Francieli da Silva dos Santos: tessmerfran@gmail.com

Natália Pontes Bona: nataliapbona@gmail.com

Larissa Menezes da Silveira: larissamenezes1999@gmail.com

William Sanabria Simões: williamsimoest@gmail.com

Giulia Bueno de Oliveira da Silva: giuliadasilvas2002@gmail.com

Júlia Araújo da Silva: juliaaraujodsilva@gmail.com

William Borges Domingues: williamwwe@yahoo.com.br

Mariana Cavalcanti Nascimento: marianacbiotec@gmail.com

Vinicius Farias Campos: fariascampos@gmail.com

Roselia Maria Spanevello: rspanevell@gmail.com

Nathalia Stark Pedra: nathaliastark@hotmail.com

Francieli Moro Stefanello: fmstefanello@gmail.com

ORCID:

Juliane Torchelsen Saraiva: <https://orcid.org/0009-0008-7124-5183>

Francieli da Silva dos Santos: <https://orcid.org/0009-0002-9887-8825>

Natália Pontes Bona: <https://orcid.org/0000-0001-5944-1968>

Larissa Menezes da Silveira: <https://orcid.org/0000-0001-7693-3235>

William Sanabria Simões: <https://orcid.org/0009-0000-5291-3336>

Giulia Bueno de Oliveira da Silva: <https://orcid.org/0009-0006-9221-9406>

Júlia Araújo da Silva: <https://orcid.org/0009-0003-8914-0105>

William Borges Domingues: <https://orcid.org/0000-0002-4351-2271>

Mariana Cavalcanti Nascimento: <https://orcid.org/0009-0009-6602-0067>

Vinicius Farias Campos: <https://orcid.org/0000-0003-2119-293X>

Roselia Maria Spanevello: <https://orcid.org/0000-0002-5117-2000>

Nathalia Stark Pedra: <https://orcid.org/0000-0001-8662-7661>

Francieli Moro Stefanello: <https://orcid.org/0000-0001-5945-3723>

Abstract

Among the spectrum of gliomas, glioblastoma stands out as the most aggressive brain tumor affecting the central nervous system. In addressing this urgent medical challenge, exploring therapeutic alternatives becomes imperative to enhance the patient's prognosis. In this regard, *Butia odorata* (BO) fruit emerges as a promising candidate due to its array of bioactive compounds, including flavonoids, phenolic acids, and carotenoids, known for their antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor properties. Thus, this study aimed to investigate the impact of standardized hydroalcoholic extract of BO on rat C6 and human U87MG glioma cell lines. Cells were exposed to varying extract concentrations (125-2000 µg/mL) for intervals of 0, 2, 4, 6, 24, 48, or 72 h. Then, cell viability, proliferation, colony formation, redox equilibrium parameters, cell migration, and the relative mRNA expression of genes related to gliomagenesis were evaluated. Our findings revealed a reduction in viability and proliferation and colony formation, reactive oxygen species, and nitrite levels in both glioma cell lines upon exposure to the extract. Conversely, an increase in sulfhydryl content and the activity of superoxide dismutase and catalase were observed in both glioma cell lines. No significant changes in viability and proliferation were observed in astrocytes. Furthermore, in the C6 cells only, the extract reduced the migration and downregulated the relative mRNA expression of *matrix metalloproteinase-2*, *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*, *nuclear factor-kappa B*, *interleukin-6* genes, and upregulated *caspase-3* gene. These results underscore the promising antiglioma potential of BO extract, attributed to its diverse bioactive composition.

Keywords: Cancer; Glioblastoma; Fruits; Catechin; Antioxidant; Anti-inflammatory.

1. Introduction

Gliomas, which account for approximately 25% of all primary brain tumors, are the most prevalent tumors affecting the central nervous system (CNS), notorious for their high mortality rates and propensity for recurrence [1, 2]. Among gliomas, glioblastoma (GBM) stands out as the most lethal type, accounting for about 69% of diagnosed cases and providing patients with an average survival of only 14-18 months [3]. Classified by the World Health Organization as a grade 4 neoplasm with IDH wild-type characteristics, GBM exhibits distinct histopathological features including diffuse infiltration, vascular proliferation, and necrosis [4, 5]. This brain tumor presents different genetic mutations, such as mutation of the promoter of the gene encoding telomerase reverse transcriptase, which results in the promotion of tumor growth, and overexpression of the epidermal growth factor receptor gene, which leads to increased pro-survival and pro-cell division signaling [6]. Other biomarker found in GBM include amplification of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) [7].

Currently, the gold standard treatment for GBM involves multimodal therapy. This approach typically begins with surgical resection of the tumor, followed by a combination of radiotherapy and chemotherapy using temozolomide (TMZ) [8]. Its mechanism of action involves the addition of methyl groups to guanines and adenines, resulting in cell cycle arrest and apoptosis induction [8]. However, one of the predominant challenges in TMZ treatment is the emergence of resistance, which significantly compromises patient recovery [9]. It should be noted that the treatment of GBM is hindered by several challenges, including tumor heterogeneity and its invasive nature in surrounding tissues [10, 11]. Additionally, the delivery of therapeutic agents to the CNS is impeded by the blood-brain barrier (BBB), limiting drug access to the brain and hindering the development of new treatments [11, 12].

Moreover, oxidative stress plays a crucial role in the emergence of several brain malignancies, including GBM [13]. It occurs when there is an imbalance between the levels of oxidizing agents and the antioxidant defense system [14]. Damage from oxidative stress to cellular macromolecules can cause genomic instability and DNA mutation, driving the formation of tumors [15]. Beyond that, reactive species induce inflammatory cells to damage tissues, which can aid in cancer progression [15]. Continuous oxidative stress triggers inflammation by activating transcription factors such as NF- κ B. This activation modifies the expression of growth factors, pro-inflammatory cytokines, and tumor suppressor genes, culminating in the survival of cancer cells [16]. Due to the brain's high metabolism and oxygen consumption, it is particularly susceptible to oxidative stress and, consequently, the development of cancer [13].

Alternative therapies have been extensively investigated. Phenolic compounds, abundant in many fruit species, possess hydroxyl groups attached to an aromatic ring that act as scavengers of free radicals

conferring antioxidant activity that is part of the health-beneficial potential [17]. In this sense, the fruit of *Butia odorata* (BO) becomes a promising research target given its rich composition of phenolic compounds, principally catechin, epicatechin, and rutin, such as carotenoids, and ascorbic acid [18, 19]. It is worth noting that these compounds possess some bioactive properties, such as increased cellular protection against damage caused by oxidation, as well as anti-inflammatory and antitumoral effects [18-20]. However, no reports describe the possible effects of BO extract treatment against glioma cells. Considering the challenges of the treatment of GBM associated with the high invasiveness of this tumor, this study aimed to investigate the antitumoral potential of a hydroalcoholic BO extract against C6 rat glioma cells and U87MG human glioma cells, focusing on the possible involvement of the antioxidant and anti-inflammatory response in its mechanism.

2. Materials And Methods

2.1. Extract Preparation

BO fruit was collected in Capão do Leão, Brazil (altitude of 13 m, 52°21'24" W, 31°52'00" S). After the harvest, the fruits were immediately frozen at -20°C until the extract preparation. Unprocessed frozen fruits were crushed, pits were removed, and the fruit pulp only (80 g) was sonicated for 30 min at 25 °C in 240 mL 70:30 v/v ethanol-water, after which the crude extract was filtered with cotton. This process was repeated four more times. Posteriorly, ethanol was removed by rotary evaporation under reduced pressure, the remaining extract was lyophilized, and stored at -80°C [19].

2.2. Animals And Ethical Procedures

Three Wistar rats (1 to 2 days old) were provided by the Central Animal Facility of the Federal University of Pelotas (UFPel) for the primary culture of astrocytes. This study was previously approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the institution (under protocol number 31292-2018). The use of animals follows the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Research Animals in Sciences (DBCA) and the National Council for Animal Control and Experimentation (CONCEA).

2.3. Cell culture

The C6 rat (CCL-107) and U87MG (HTB-14) human glioma cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing sodium bicarbonate (NaHCO_3), 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), penicillin/streptomycin, fungizone (0.1%) and supplemented

with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). The cells were maintained at 37°C containing 5% CO₂ under a humidified atmosphere until adequate confluence was reached [21].

2.4. Primary Astrocyte Cultures and Plating

The primary astrocyte cultures were performed as described by Gottfried et al. [22]. The cortex of newborn rats was mechanically removed and dissociated in a balanced saline buffer free of calcium and magnesium salts (CMF) pH 7.4. The tissue was homogenized, the cell pool was centrifuged at 1000 rpm for 10 min and the pellet was resuspended in DMEM pH 7.6 supplemented with 10% FBS. Subsequently, the cells were seeded in 96-well plates (at a density of 3×10^4 cells/wells). The cultures were maintained at 37°C containing 5% CO₂ under a humidified atmosphere for approximately 15 days. Periodic medium changes were performed every 5 days until adequate confluence was reached.

2.5. Treatment with BO Extract and Plating of C6 and U87MG

A stock solution was made by dissolving 0.01 g of the lyophilized BO extract in 1 mL of sterile water. The stock solution was diluted in DMEM with 10% FBS to obtain concentrations of 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, and 2000 µg/mL, which were determined based on a prior concentration curve analysis. Primary astrocyte cultures were prepared as described above and treated with BO extract (125-2000 µg/mL) for 72 h, and only 3(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays were performed as described below. Cells exposed only in DMEM medium with 10% FBS were used as controls.

2.6. MTT Assay

The MTT colorimetric test measures cell viability by assessing dehydrogenase activity in metabolically active cells, converting MTT into formazan crystals [23]. After the treatment with BO extract (125 to 2000 µg/mL) at 24, 48, and 72 h, the cells were gently washed with CMF. An MTT solution (0.5 mg/mL) was added, and the plates were incubated for 90 min under standard cell culture conditions. Finally, the precipitate formed was eluted with dimethylsulfoxide (DMSO), and absorbance at 492 nm was determined in a microplate reader (SpectraMax 190, Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The results were expressed as percentages of the control value.

2.7. SRB Assay

Cell proliferation was determined using the Sulforhodamine B (SRB) assay, as described by Pauwels et al. [24]. After treatment with BO extract (125-2000 µg/mL) for 24, 48, and 72 h, the medium

was removed, the cells were fixed using trichloroacetic acid (TCA) (50%), and the cells were incubated at 4°C for 45 min. Subsequently, the cells were washed five times with distilled water to eliminate TCA. An SRB solution (0.4% in 1% acetic acid) was applied, and plates were incubated for 30 min at room temperature while shielded from light. The cells were washed five times with acetic acid (1%) until any unincorporated dye was completely removed. Finally, the dye was dissolved using a Tris solution (10 mM), and absorbance at 530 nm was measured using a microplate reader (SpectraMax 190). The results were expressed as percentages of the control value.

2.8. Clonogenic Assay

Clonogenic assay was determined as described by Franken et al. [25]. C6 and U87MG cell lines were treated with BO extract (1500 µg/mL and 750 µg/mL, respectively). After 72 h, the medium was removed, the cells were seeded at low density (3×10^2 cells/wells), and incubated in an oven under standard cell culture conditions for 10 days in the absence of treatment. After, the cells were fixed with cold absolute methanol and stained with crystal violet (1%) to visualize the colonies. The number and length of colonies were determined using an inverted microscope (40x) and ImageJ software (RRID:SCR_003070; National Institutes of Health, USA). The results were expressed as percentages of the control value.

2.9. Redox Equilibrium Parameters

2.9.1. Sample Preparation and Protein Determination

The preparation of cell lysate was determined as described by Simões et al. [26]. After 72 h of treatment with BO extract (500-2000 µg/mL for C6; 125-2000 µg/mL for U87MG), the supernatant was stored. The cells were subjected to two sterile water washes and cell lysis was accomplished using a cell scraper and mechanical force. The lysate was centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and the lysate was used for a series of assays to redox equilibrium parameters. The quantification of protein levels was conducted utilizing the method described by Lowry et al. [27] to assess redox equilibrium parameters in the C6 and U87MG cell lysate.

2.9.2. Reactive Oxygen Species (ROS) Levels Determination

Production of intracellular ROS is based on the oxidation of 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) to dichlorofluorescein (DCF) [28]. After 72 h of treatment with BO extract (500-2000 µg/mL for C6; 125-2000 µg/mL for U87MG), the cells were incubated with 1 mM DCFH-DA for 30 min. Fluorescence was then measured at 488 and 525 nm in a microplate reader (SpectraMax190). ROS levels were expressed as percentages of the control values.

2.9.3. Nitrites Levels Determination

Nitrite levels in C6 and U87MG cell supernatants were determined as stated by Stuehr and Nathan [29]. Absorbance was measured in a microplate reader (SpectraMax190) at 540 nm. Nitrite levels were expressed as percentages of the control values

2.9.4. Total Sulfhydryl Content (SH) Determination

SH levels in C6 and U87MG cell lysate were determined according to the method described by Aksenov and Markesbery [30]. Absorbance was measured in a microplate reader (SpectraMax190) at 412 nm. SH levels are presented as a percentage of the control values.

2.9.5. Superoxide Dismutase (SOD) Activity

The SOD activity in C6 and U87MG cell lysate was determined as described previously by Misra and Fridovich [31]. Absorbance was measured in a microplate reader (SpectraMax190) at 480 nm. SOD activity was expressed as percentages of the control values.

2.9.6. Catalase (CAT) Activity

The CAT activity in C6 and U87MG cell lysate was measured following the method described by Aebi [32]. Absorbance was measured in a microplate reader (SpectraMax190) at 240 nm. CAT activity was expressed as percentages of the control values.

2.10. Cell Migration Assay

This assay was conducted as described by Bona et al. [21]. After plating, slits were made in the cell monolayer of each well with the aid of a P200 pipette tip. DMEM was removed, cells were washed with CMF to remove cell debris, and C6 cells were treated with BO extract (750 µg/mL). Slit closure was monitored under an inverted microscope (10x) at time intervals of 0, 2, 4, 6, and 24 h after scraping the cell monolayer. The quantitative analysis of the cell-free slit was measured using ImageJ software and the inhibition of cell migration was expressed in the percentage of closure. The results were expressed as percentages of the control value.

2.11. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

After 72 h of treatment with BO extract (1000 and 2000 µg/mL), total mRNA was extracted from 1 mL of C6 cells (n = 5 for each experimental group) using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA) for the determination of matrix metalloproteinase-2 (*MMP-2*), O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (*MGMT*), caspase-3 (*Casp-3*), *NF-κB*, and interleukin-6 (*IL-6*) genes. The isolated total RNA was quantified, and its purity was assessed using a NanoVue spectrophotometer (GE, Fairfield, CT, USA). The cDNA synthesis was carried out using the High-Capacity Reverse Transcription kit (AppliedBiosystems™), following the manufacturer's instructions. The primer sequences used are described in Table 1. Gene expression fold changes were normalized using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [35] with *GAPDH* as a housekeeping gene.

2.12. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted utilizing GraphPad Prism 9.5.0 software. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test, or Student's t-test was employed for data analysis. Results are presented as means $\pm$ standard errors, with significance denoted by $P < 0.05$.

3. Results

3.1. BO Extract Selectively Decreases the Viability and Proliferation of C6 and U87MG Cell Lines

The treatment with BO extract (125-2000 $\mu\text{g/mL}$) reduced the viability of C6 cells after 24, 48, and 72 h (Fig 1a-c). This decrease was more pronounced after 72 h of treatment, as there was a significant reduction in viability at concentrations of 500, 750, 1000, 1500, and 2000 $\mu\text{g/mL}$ by 30.54%, 44.45%, 46.27%, 53.45%, and 57.86%, respectively, compared to the control ($P < 0.05$, Fig 1c). Similarly, it was observed that extract significantly reduced the cell proliferation of the C6 cells at all treatment periods, but this effect was more prominent after 72 h, with a reduction in proliferation at concentrations of 500-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 34.49%, 50.14%, 52.13%, 61.68%, and 73.64%, respectively, compared to the control ($P < 0.001$, Fig 1f).

Regarding U87MG cells, it was observed that the BO extract reduced cell viability after 24, 48, and 72 h (Fig 2a-c). After 72 h of treatment was a reduction in viability at concentrations of 500-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 34.10%, 53.69%, 57.51%, 60.92%, and 60.68%, respectively, compared to the control ($P < 0.01$, Fig 2c). Regarding cell proliferation, it was observed that after 72 h of treatment with the extract, there was a reduction in viability at concentrations of 125-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 23.10%, 28.23%, 44.01%, 61.48%, 67.23%, 73.86%, and 73.61%, respectively, compared to the control ($P < 0.05$, Fig 2f).

On the other hand, treatment with the extract (125-2000 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h did not promote significant changes in the viability and proliferation of primary astrocyte cultures compared to the control ($P>0.05$, Fig 3a and 3b), suggesting a selective effect of the extract against glioma cells.

3.2. BO Extract Reduces the Colony Number and Length of C6 and U87MG Cell Lines

The treatment with BO extract (1500 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h significantly reduced both the colony number and length of C6 cells by 75.34% ($P<0.001$, Fig 4b and c) and 61.60% ($P<0.01$, Fig 4b and d), respectively, compared to control. Similarly, U87MG cells exposed to the extract (750 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h had a significant reduction in the number and length of colonies by 81.36% ($P<0.01$, Fig 5b and c) and 45.60% ($P<0.01$, Fig 5b and d), respectively, compared to the control.

3.3. BO Extract Exerts Antioxidant Activity on C6 and U87MG Cell Lines

Since 125 and 250 $\mu\text{g/mL}$ concentrations showed no significant effects in the MTT and SRB tests of C6 cells after 72 h, they were not used in the oxidative stress parameters. Treatment with BO extract for 72 h significantly decreased the levels of ROS in cells at concentrations of 500, 750, 1000, 1500, and 2000 $\mu\text{g/mL}$ by 67.46%, 62.69%, 60.38%, 61.82%, and 67.23%, respectively, compared to the control ($P<0.01$, Fig 6a). Similarly, the extract significantly reduced the levels of nitrites at concentrations of 500-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 70.17%, 78.12%, 83.76%, 88.18%, and 91.59%, respectively, compared to the control ($P<0.05$, Fig 6b). Regarding antioxidant enzyme activity, it was observed that the extract significantly increased SOD activity at concentrations of 500-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 455.8%, 702.6%, 961.6%, 1193%, and 2317%, respectively, compared to the control ($P<0.001$, Fig 6c), as well as significantly increased CAT activity at concentrations of 1000-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 1659%, 2031%, and 2741%, respectively, compared to the control ($P<0.01$, Fig 6d). Additionally, there was a significant increase in SH content after treatment with the extract at concentrations of 1000-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 643.8%, 1189%, and 1925%, respectively, compared to the control ($P<0.05$, Fig 6e).

Regarding the U87MG cells, considering that concentrations of 125-2000 $\mu\text{g/mL}$ exerted significant changes in the MTT and SRB tests after 72 h, all of these were used for oxidative stress analyses. Treatment with BO extract for 72 h significantly reduced the ROS levels in cells at concentrations of 125-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 38.32%, 59.13%, 60.91%, 66.25%, 65.78%, 55.11%, and 68.77%, respectively, compared to the control ($P<0.001$, Fig 7a). Similarly, it was observed that the extract significantly decreased nitrite levels at concentrations of 125-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 54.61%, 61.62%, 60.89%, 57.95%, 59.36%, 60.57%, and 66.04%, respectively, compared to the control ($P<0.001$, Fig 7b). On the other hand, extract significantly increased SOD activity at concentrations of 125-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 23.50%,

22.21%, 35.48%, 75.64%, 260.9%, 668.5%, and 718.1%, respectively, compared to the control ($P<0.05$, Fig 7c), as well as a significant increase in CAT activity at concentrations of 1000-2000 $\mu\text{g/mL}$ by 677.5%, 1648% and 2222%, respectively, compared to the control ($P<0.001$, Fig 7d). Furthermore, there was a significant increase in SH content after treatment with the extract, more prominently at concentrations of 1000-2000 $\mu\text{g/mL}$ at 92.63%, 146.9%, and 144.6%, respectively, compared to the control ($P<0.01$, Fig 7e).

3.4. BO Extract Attenuates the Migratory Capacity of C6 Cells

Figures 8a and 8b show the closing percentages of C6 cells after treatment with BO extract at a non-cytotoxic concentration (750 $\mu\text{g/mL}$) at 0, 2, 4, 6, and 24 h. It was possible to observe that the extract inhibited C6 cell migration by 2.76%, 10.83%, 20.81%, and 44.49%, respectively, compared to the control. Moreover, the extract significantly reduced the cell migration capacity of C6 at 4 h ($P<0.01$), 6 h ($P<0.001$), and 24 h ($P<0.001$) compared to the control (Fig 8b), demonstrating alterations in wound healing between the control and treatment groups.

3.5. BO Extract Modulates the mRNA Expression of *MMP-2*, *MGMT*, *Casp-3*, *NF- κ B*, and *IL-6* Genes in C6 Cells

In the C6 cells, BO extract treatment for 72 h significantly downregulated the relative mRNA expression of the *MMP-2* and *MGMT* genes at a concentration of 2000 $\mu\text{g/mL}$ (0.54-fold and 0.45-fold, respectively) compared to the control ($P<0.01$, Fig 9a and 9b). However, the extract increased the relative mRNA expression of the *Casp-3* gene in the same concentration by 1.56-fold when compared to untreated cells ($P<0.001$, Fig 9c). The relative mRNA expression of the *NF- κ B* and *IL-6* genes was downregulated in cells exposed to 2000 $\mu\text{g/mL}$ of the extract (0.91-fold and 0.79-fold, respectively) compared to the control ($P<0.001$, Fig 9d and 9e).

4. Discussion

Considering the unfavorable prognosis of patients with GBM associated with the limited therapeutic arsenal for the treatment of this disease, the search for therapeutic approaches capable of overcoming these limitations becomes extremely relevant [26]. Therefore, in this study the in vitro antiglioma effect of the hydroalcoholic extract of BO was investigated.

Firstly, the extract of BO, at all treatment periods, proved to be effective in reducing cell viability and proliferation in the C6 and U87MG cell lines. This effect can be attributed, largely, to the rich bioactive composition present in the fruit. It is worth mentioning that the composition of the extract used

in this study was previously analyzed by Ramos et al. [19]. Phytochemical characterization revealed a wide variety of phenolic compounds, especially from the flavonoid class, with catechin, epicatechin, and rutin being the major compounds identified in the extract [19]. Flavonoids are recognized as secondary metabolites that are present in plants and fruits, where they play important roles in protection and defense against pathogens [36]. These compounds are widely studied in the literature due to their diverse biological capabilities, including antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor actions [37-39].

It is relevant to mention that flavonoids can cross the BBB and that these compounds exert antiglioma effects through the modulation of different signaling pathways, such as the suppression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity and inhibition of extracellular matrix and metalloproteinases regulatory proteins [40]. Among flavonoids, catechins stand out for their ability to modulate cell growth [41], and promote antimetastatic [42], both *in vitro* and *in vivo*. More specifically, catechin promoted an antitumor effect on the human glioma cell line U87MG by modulating the MAPK/ERK signaling pathway [43]. Further, rutin has been shown to suppress tumor progression in GL-15 human glioma cells through modulating pro-tumorigenic STAT3 signaling [44]. Considering the abundant bioactive composition of BO extract combined with the modulation of different signaling pathways promoted by these compounds, it is possible to infer that this extract and the synergistic action of its compounds can exert effects on multiple pathways.

It is important to highlight that the BO extract has already been shown to exert some biological effects, such as reducing microbial activity, moreover, to exerting hypolipidemic and anti-inflammatory effects *in vivo* [45, 19]. More specifically about antineoplastic activity, the ethanolic extract of BO (80:20 v/v) exerted antitumor effects against cervix cell lines (SiHa and C-33a), and did not affect the cell viability of murine fibroblast lines (L929) and human keratinocytes (HaCaT), demonstrating the selective cytotoxic capacity of the extract against tumor lines [20]. These findings are in line with the results obtained in our study. Overall, the BO extract had a more pronounced effect on the viability and proliferation of human glioma cells compared to rat glioma cells. This same effect, exerted by extracts or isolated natural compounds, has been observed in previous studies [21, 26].

Our results demonstrated that the extract, at all concentrations tested, did not alter the viability and cell proliferation of astrocytes, inferring a promising selective cytotoxic effect of the extract against glioma cell lines. It is noteworthy that patients with GBM undergoing conventional treatments often experience serious adverse effects, including post-surgical cognitive loss, inflammation due to chemotherapy, and the development of secondary cancers after radiotherapy [46]. Additionally, the adjuvant use of TMZ appears to increase hematological complications such as thrombocytopenia, lymphopenia, and neutropenia [47]. Treatment with TMZ can be described as palliative since the

chemoresistance developed by tumors restricts its effectiveness, and approximately 90% of recurrent GBMs do not respond to repeated treatment with this chemotherapy drug, consequently, GBM remains an incurable tumor [46]. This demonstrates the importance of researching therapies that are more effective against glioma cells and less toxic to healthy cells [21].

Furthermore, the clonogenic assay, fundamental in oncological research, aims to understand how tumor cells respond and multiply under different treatment conditions [48]. Specifically, it consists of counting cell clones from single cells to determine their ability to generate progeny under different treatments, enabling the evaluation of the effectiveness of treatments [48]. Our results demonstrated that the BO extract significantly reduced the number and length of colonies compared to the untreated group, both in the C6 and U87MG cells. Consistent with this, Sheng [43] demonstrated that the catechin inhibits colony formation in U87MG cells. Additionally, the extract of *Vaccinium virgatum*, a fruit abundant in flavonoids, has been shown to reduce the size of C6 cell colonies [49].

Moreover, oxidative stress is widely recognized as playing a significant role in the tumorigenesis of gliomas. It is also important to note that the development of cancer is frequently associated with mitochondrial dysfunction or damage [50]. Increased production of ROS due to dysfunction of the mitochondrial respiratory chain may be involved in different stages of tumorigenesis, such as transformation, proliferation, angiogenesis, and metastasis [51, 50]. The overproduction of reactive nitrogen species (RNS) is also related to cancer development [17]. Accordingly, controlling the production of ROS and RNS in this context becomes of great value. Therefore, to more specifically investigate possible mechanisms of action of BO extract, we investigated its effect on redox equilibrium parameters in C6 and U87MG cells. The extract reduced the levels of ROS and nitrites, however, there was an increase in SH content and in the activity of antioxidant enzymes, SOD and CAT, which may have contributed to the decrease in ROS levels. It should be noted that the SOD enzyme is responsible for converting the superoxide anion into hydrogen peroxide and oxygen through a catalytic reaction [50]. At the same time, CAT prevents the accumulation of hydrogen peroxide, degrading it into water and oxygen [50]. The superoxide anion can also interact with the nitric oxide radical, resulting in the formation of other RNS, such as peroxynitrite [52]. It is noteworthy that thiol residues (SH) play a crucial role in maintaining the homeostasis of the intracellular redox state [53].

In line with these results, the study described by Vinholes et al. [54] showed that BO extract has a high antioxidant capacity, eliminating reactive species such as superoxide anion, hydroxyl, and nitric oxide. Boeing et al. [20] evaluated the BO extract with different solvents, and it was observed that the extract composed of ethanol-water (80:20 v/v) exhibited a high antioxidant activity when compared to other types of extract used, with this bioactivity being mainly related to the compounds catechin,

epicatechin and rutin. It should be emphasized that antioxidants are effective as free radical scavengers due to their ability to donate hydrogen atoms to neutralize the deleterious effects of ROS [17]. Given the results found, we suggest that the reduction in the levels of ROS and nitrites, as well as the increase in SH levels and the activity of SOD and CAT enzymes, may be due to the antioxidant effects promoted by the bioactive composition of the extract. Among the possible modulation of redox homeostasis by flavonoids, it has been described that quercetin and fisetin can competitively bind to the Keap1 protein at the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) binding site, resulting in its translocation to the nucleus, which in turn triggers positive regulation of antioxidant genes [55]. In addition, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a type of major catechin present in green tea, has been shown to activate the Nrf2 pathway, resulting in a decrease in ROS levels [56].

It is relevant to observe that tumor cell migration, invasion, and metastasis are mediated by epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT influences cell adhesion and motility, increasing migratory capacity [57]. Further, in gliomas, there is increased expression of *MMP-2* and *MMP-9*, which are membrane-associated enzymes involved in the degradation of the extracellular matrix. This contributes to EMT and consequently tumor migration and glioma invasion [58, 57]. MMPs can promote angiogenesis, through the expression of vascular endothelial growth factor, and contribute to the development of metastasis [10]. Additionally, ROS plays a crucial role in various stages of glioma development, including cell migration, by positively regulating MMPs 2 and 9 [59]. Considering these points, in this study the effect of BO extract on the migration and the *MMP-2* expression of the C6 cell line was investigated. Our results demonstrated that the extract inhibited cell migration, and decreased the *MMP-2* mRNA expression. This is in line with previous studies demonstrating that extracts of natural origin were able to inhibit cell migration in different glioma cell lines [21, 49]. It was demonstrated that EGCG modulated the invasiveness of human glioma line U251 by inhibiting the expression of *MMP-9* and *MMP-2* [60]. Accordingly, EGCG downregulated the *MMP-2* expression in nasopharyngeal carcinoma cells [61].

It is important to emphasize that the increased activity of MGMT is a significant challenge in treating gliomas. The overexpression of this enzyme activity promotes resistance by repairing DNA lesions caused by TMZ, and it has been reported that patients with MGMT promoter methylation have a longer survival rate compared to patients without this methylation [9]. This condition promotes the silencing of *MGMT* gene expression, resulting in the reversal of chemoresistance [9]. Therefore, using compounds that reduce the expression of this enzyme is a promising strategy to enhance the cytotoxic effects of TMZ and improve the patient's prognosis [9, 62]. To explore the role of BO extract in the resistance of glioma cells, we investigated its effects on *MGMT* expression in the C6 cells. Our results

demonstrated that the extract downregulated the *MGMT* mRNA expression. This result agrees with a previous study, where the combined treatment of quercetin and TMZ was able to reduce *MGMT* levels in the C6 cell line [63]. Furthermore, it was observed that quercetin promoted a reduction in *MGMT* expression in the T98G glioma cells [64].

Moreover, compounds capable of inducing antitumor effects through the activation of apoptosis have received significant attention [65]. Among the various types of caspases, Casp-3 is known as an apoptosis executor. It is responsible for facilitating chromatin condensation, DNA fragmentation, and the cleavage of regulatory and structural proteins, ultimately leading to programmed cell death [65]. Research has already demonstrated that different flavonoids can upregulate *Casp-3* expression in glioma cells [66]. In our study, we investigated the expression of *Casp-3* following treatment with BO extract and observed an upregulation in the mRNA expression of this gene. In line with this finding, it was demonstrated that a combination of EGCG and hydroxychavicol exerted apoptotic effects through Casp-3 activation in 1321N1 and SW1783 glioma cell lines [67].

Furthermore, NF- κ B is a crucial transcription factor involved in various pathological and physiological processes [68]. The NF- κ B pathway can be activated in response to proliferation, cell survival, and inflammation stimuli. Alterations in its expression are associated with cancer development due to the stimulation of tumor cell invasion and the inhibition of apoptosis [68, 5]. Studies have identified elevated NF- κ B activity in the context of GBM and its role in chemoresistance through the transcription of various genes, including *MGMT* [7, 62]. It is also important to note that inflammation within the inflammatory tumor microenvironment is associated with oxidative stress, which is generally linked to the production of ROS and RNS. Consequently, this increases the chances of mutations and, subsequently, tumor initiation [68, 15]. Besides, NF- κ B activation promotes the expression of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor and IL-6, resulting in increased tumor cell proliferation [68]. In this context, IL-6 is a cytokine responsible for regulating various functions, such as cell proliferation, growth, differentiation, and migration. It also plays a role in inflammation and tumorigenesis [69]. Similar to NF- κ B, increased expression of IL-6 has been observed in patients with GBM [70]. Considering these points, we investigated the effects of BO extract on the expression of *NF- κ B* and *IL-6* genes and observed a decrease in mRNA expressions of both genes. These results corroborate the study by Da Silva et al. [71], where the flavonoids quercetin and rutin reduced the *IL-6* mRNA expression in human glioma cell lines U251 and TG1. Additionally, Wang et al. [64] demonstrated that quercetin reduced the relative expression of *NF- κ B*, inducing apoptosis in T98G cells. Based on these findings, it can be postulated that BO extract has promising anti-inflammatory effects.

5. Conclusion

This study highlights BO extract's selective antineoplastic effects on C6 and U87MG glioma cell lines. BO extract was able to modulate different pathways, exerting principally antioxidant and anti-inflammatory properties. These findings support the need to further explore the extract's application in glioma in vivo models to understand its biological effects better and elucidate the mechanisms underlying its antiglioma action.

Data Availability Statement: The datasets generated during this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Funding Statement: This research was supported by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil* (CAPES – Finance Code 001), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul* (FAPERGS).

Author Contributions:

JTS: Experimental design, C6 and U87MG treatment, biochemical analysis, statistical analysis, results interpretation, discussion, and manuscript preparation. **FSS:** U87MG treatment and biochemical analysis. **NPB:** Astrocytes treatment and biochemical analysis. **LMS and WSS:** C6 treatment and biochemical analysis. **GBOS and JAS:** Cell culture development. **WBD, MCN, and VFC:** RT-PCR analysis. **RMS:** Financial resources and supervision. **NSP:** Experimental design, and supervision. **FMS:** Experimental design, results interpretation, financial resources, supervision, and manuscript preparation. All authors reviewed the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Ethics Approval Statement: The use of animal models in this study was conducted following ethical standards. All procedures were approved by the Animal Ethics and Experimentation Committee of the Federal University of Pelotas (UFPel) under protocol number CEEA (31292-2018). Our protocols adhered to the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA), meeting the expectations outlined by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

References

- [1] Lin D et al (2021) Trends in Intracranial Glioma Incidence and Mortality in the United States, 1975-2018. *Front Oncol* 11:748061. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.748061>
- [2] Pellerino A et al (2022) Epidemiology, risk factors, and prognostic factors of gliomas. *Clin Transl Imaging* 1:1-9. <https://doi.org/10.1007/s40336-022-00489-6>
- [3] Biserova K et al (2021) Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. *Cells* 10:621. <https://doi.org/10.3390/cells10030621>
- [4] Louis DN et al (2021) The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 23:1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- [5] Khabibov M et al (2022) Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). *Int J Oncol* 60:69. <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5359>
- [6] Whitfield BT, Huse JT (2022) Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathol* 32:e13062. <https://doi.org/10.1111/bpa.13062>
- [7] Ji J et al (2021) TRIM22 activates NF- κ B signaling in glioblastoma by accelerating the degradation of I κ B α . *Cell Death Differ* 28:367-381. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00606-w>
- [8] Hotchkiss KM, Sampson JH (2021) Temozolomide treatment outcomes and immunotherapy efficacy in brain tumor. *J Neurooncol* 151:55-62. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03598-2>
- [9] Wu S et al (2021) PARP-mediated PARylation of MGMT is critical to promote repair of temozolomide-induced O6-methylguanine DNA damage in glioblastoma. *Neuro Oncol* 23:920-931. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab003>
- [10] Persano F et al (2022) Natural Compounds as Promising Adjuvant Agents in The Treatment of Gliomas. *Int J Mol Sci* 23:3360. <https://doi.org/10.3390/ijms23063360>
- [11] Tomar MS et al (2021) Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1876:188616. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188616>
- [12] Karkon-Shayan S et al (2023) Resveratrol as an antitumor agent for glioblastoma multiforme: Targeting resistance and promoting apoptotic cell deaths. *Acta Histochem* 125:152058. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2023.152058>
- [13] Agrawal K et al (2023) Role of Oxidative Stress in Metabolic Reprogramming of Brain Cancer. *Cancers (Basel)* 15:4920. <https://doi.org/10.3390/cancers15204920>

- [14] Olivier C et al (2021) Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. *Front Mol Biosci* 7:620677. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.620677>
- [15] Susanti I et al (2024) Separation Methods of Phenolic Compounds from Plant Extract as Antioxidant Agents Candidate. *Plants (Basel)* 13:965. <https://doi.org/10.3390/plants13070965>
- [16] Dharshini LCP et al (2023) Regulatory Components of Oxidative Stress and Inflammation and Their Complex Interplay in Carcinogenesis. *Appl Biochem Biotechnol* 195:2893-2916. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04266-z>
- [17] Costa M et al (2021) Polyphenols as Antioxidants for Extending Food Shelf-Life and in the Prevention of Health Diseases: Encapsulation and Interfacial Phenomena. *Biomedicines* 9:1909. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121909>
- [18] Hoffmann JF et al (2017) Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. *Food Chem* 237:638-644. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.154>
- [19] Ramos VP et al (2020) Hypolipidemic and anti-inflammatory properties of phenolic rich *Butia odorata* fruit extract: potential involvement of paraoxonase activity. *Biomarkers* 25:417-424. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2020.1781261>
- [20] Boeing JS et al (2020) Phenolic Compounds from *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick Fruit and Its Antioxidant and Antitumor Activities. *Food Anal Methods* 13:61-68. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01515-6>
- [21] Bona NP et al (2024) Antitumoral Activity of *Cecropia Pachystachya* Leaves Extract in Vitro and in Vivo Model of Rat Glioma: Brain and Blood Effects. *Mol Neurobiol* 61:8234-8252. <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04086-8>
- [22] Gottfried C et al (1999) Regulation of protein phosphorylation in astrocyte cultures by external calcium ions: Specific effects on the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin and heat shock protein 27 (HSP27). *Brain Res* 833:142-149. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01503-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01503-6)
- [23] Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- [24] Pauwels B et al (2003) Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 51:221-226. <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0557-9>

- [25] Franken NAP et al (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature* 1:2315-2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- [26] Simões WS et al (2024) Antitumoral Activity of Electrospray-Nanoencapsulated Tannic Acid on C6 and U87MG Glioblastoma Cell Lines. *BioNanoSci*. <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01497-8>
- [27] Lowry OH et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- [28] Ali SF et al (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicol* 13:637-648
- [29] Stuehr DJ, Nathan CF (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *The journal of experimental medicine* 169:1543-1555
- [30] Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302:141-145. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01636-6)
- [31] Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175
- [32] Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- [33] Solgi T et al (2021) Antiapoptotic and antioxidative effects of cerium oxide nanoparticles on the testicular tissues of streptozotocin-induced diabetic rats: An experimental study. *Int J Reprod Biomed* 19:589-598. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i7.9465>
- [34] Adoga J et al (2022) Type-2 diabetic rat heart: The effect of kolaviron on mTOR-1, P70S60K, PKC- α , NF- κ B, SOD-2, NRF-2, eNOS, AKT-1, ACE, and P38 MAPK gene expression profile. *Biomed Pharmacother* 148:112736. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112736>
- [35] Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [36] Ponte LGS et al (2021) The Hallmarks of Flavonoids in Cancer. *Molecules* 26:2029. <https://doi.org/10.3390/molecules26072029>
- [37] Caparica R et al (2020) Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. *Biomolecules* 10:233. <https://doi.org/10.3390/biom10020233>
- [38] Jo YJ et al (2022) Antioxidant and Skin Whitening Activities of Sub- and Super-Critical Water Treated Rutin. *Molecules* 27:5441. <https://doi.org/10.3390/molecules27175441>

- [39] Josiah SS et al (2022) Neuroprotective effects of catechin and quercetin in experimental Parkinsonism through modulation of dopamine metabolism and expression of IL-1 β , TNF- α , NF- κ B, IkKB, and p53 genes in male Wistar rats. *Neurotoxicol* 90:158-171. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.03.004>
- [40] Do Nascimento RP et al (2022) Neuroimmunomodulatory Properties of Flavonoids and Derivates: A Potential Action as Adjuvants for the Treatment of Glioblastoma. *Pharmaceutics* 14:116. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010116>
- [41] Sun H et al (2020) Anti-cancer activity of catechin against a549 lung carcinoma cells by induction of cyclin kinase inhibitor p21 and suppression of cyclin E1 and P-AKT. *Appl Sci* 10:2065. <https://doi.org/10.3390/app10062065>
- [42] Della Via FI et al (2021) (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and differentiation in leukemia by targeting reactive oxygen species and PIN1. *Sci Rep* 11:9103. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88478-z>
- [43] Sheng ZZ (2020) Anticancer effects of catechin flavonoid in human glioma cells are mediated via autophagy induction, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and targeting MAPK/ERK signaling pathway. *J BUON* 25:1084-1090
- [44] Lima IS et al (2024) Flavonoid Rutin Presented Anti-Glioblastoma Activity Related to the Modulation of Onco miRNA-125b Expression and STAT3 Signaling and Impact on Microglia Inflammatory Profile. *Brain Sci* 14:90. <https://doi.org/10.3390/brainsci14010090>
- [45] Maia D et al (2019) *Butia odorata* Barb. Rodr. extract inhibiting the growth of *Escherichia coli* in sliced mozzarella cheese. *J Food Sci Technol* 56:1663-1668. <https://doi.org/10.3390/nu14194009>
- [46] Delello L et al (2021) Improving temozolomide biopharmaceutical properties in glioblastoma multiforme (GBM) treatment using GBM-targeting nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm* 168:76-89. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.08.011>
- [47] Schreck K, Grossman S (2018) Role of Temozolomide in the Treatment of Cancers Involving the Central Nervous System. *Oncology* 32:555-569
- [48] Qian H et al (2023) High-Content and High-Throughput Clonogenic Survival Assay Using Fluorescence Barcoding. *Cancers* 15:4772. <https://doi.org/10.3390/cancers15194772>
- [49] Da Silveira LM et al (2022) Selective in vitro anticancer effect of blueberry extract (*Vaccinium virgatum*) against C6 rat glioma: exploring their redox status. *Metab Brain Dis* 37:439-449. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00867-5>

- [50] Tong S et al (2023) Identification and validation of a novel prognostic signature based on mitochondria and oxidative stress related genes for glioblastoma. *J Transl Med* 21. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03970-6>
- [51] Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM (2019) The Delicate Equilibrium between Oxidants and Antioxidants in Brain Glioma. *Curr Neuropharmacol* 17:342-351. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180302120925>
- [52] Ighodaro OM, Akinloye OA (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* 54:287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- [53] Aoyama K (2021) Glutathione in the Brain. *Int J Mol Sci* 22:5010. <https://doi.org/10.3390/ijms22095010>
- [54] Vinholes J et al (2017) In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. *Food Biosci* 19:92-100. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.06.005>
- [55] Joma N et al (2023) Flavonoids Regulate Redox-Responsive Transcription Factors in Glioblastoma and Microglia. *Cells* 12:2821. <https://doi.org/10.3390/cells12242821>
- [56] Xie LW et al (2020) Green tea derivative (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) confers protection against ionizing radiation-induced intestinal epithelial cell death both in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 161:175-186. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.012>
- [57] Zhai K et al (2021) Natural Compounds in Glioblastoma Therapy: Preclinical Insights, Mechanistic Pathways, and Outlook. *Cancers (Basel)* 13:2317. <https://doi.org/10.3390/cancers13102317>
- [58] Beylerli O et al (2022) Therapeutic effect of natural polyphenols against glioblastoma. *Front Cell Dev Biol* 10:1036809. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1036809>
- [59] Ostrowski RP, Pucko EB (2022) Harnessing oxidative stress for anti-glioma therapy. *Neurochem Int* 154:105281. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105281>
- [60] Li H et al (2014) Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis, inhibits proliferation and decreases invasion of glioma cell. *Neurosci Bull* 30:67-73. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1394-z>
- [61] Ho HC et al (2019) Epigallocatechin-3-gallate inhibits migration of human nasopharyngeal carcinoma cells by repressing MMP-2 expression. *J Cell Physiol* 234:20915-20924. <https://doi.org/10.1002/jcp.28696>

- [62] Li M et al (2017) BKM120 sensitizes C6 glioma cells to temozolomide via suppression of the PI3K/Akt/NF- κ B/MGMT signaling pathway. *Oncol Lett* 14:6597-6603. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7034>
- [63] Vibhavari R et al (2023) Enhancing temozolomide antiglioma response by inhibiting O6-methylguanine-DNA methyltransferase with selected phytochemicals: in silico and in vitro approach. *3 Biotech* 13:385. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03821-7>
- [64] Wang W et al (2023) Quercetin induces MGMT+ glioblastoma cells apoptosis via dual inhibition of Wnt3a/ β -Catenin and Akt/NF- κ B signaling pathways. *Phytomedicine* 118:154933. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154933>
- [65] Yadav P et al (2021) Caspase-3: A primary target for natural and synthetic compounds for cancer therapy. *Chem Biol Drug Des* 98:144-165. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13860>
- [66] Wong SC et al (2023) Anticancer mechanism of flavonoids on high-grade adult-type diffuse gliomas. *Nutrients* 15:797. <https://doi.org/10.3390/nu15040797>
- [67] Abdul A et al (2022) Inhibitory Mechanism of Combined Hydroxychavicol With Epigallocatechin-3-Gallate Against Glioma Cancer Cell Lines: A Transcriptomic Analysis. *Front Pharmacol* 13:844199. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.844199>
- [68] Yu H et al (2020) Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther* 5:209. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>
- [69] Chu IR et al (2020) Differentiation of tumorigenic C6 glioma cells induced by enhanced IL-6 signaling. *Medicina* 56:625. <https://doi.org/10.3390/medicina56110625>
- [70] Yang Z et al (2020) Allicin inhibits proliferation by decreasing IL-6 and IFN- β in HCMV-infected glioma cells. *Cancer Manag Res* 12:7305-7317. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S259677>
- [71] Da Silva A et al (2020) The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiglioma activity. *Brain Behav Immun* 85:170-185. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.003>

Table 1 Primers for quantitative real-time polymerase chain reaction are listed below, including both the forward and reverse primer sequences used to amplify each target gene

Primer Name	Sequence	Reference
MMP-2 Forward	5'-TTTGGTCGATGGGAGCATGG-3'	NM_031054.2
MMP-2 Reverse	5'-AGTACTCGCCATCAGCGTTC-3'	NM_031054.2
MGMT Forward	5'-AAGATAGAGCTGTCCGGCTG-3'	NM_012861.1
MGMT Reverse	5'-GTCTGGTGAATGAATCTTGCTGG-3'	NM_012861.1
Casp-3 Forward	5'-GTGGAAGTACGATGATATGGC-3'	XM_006253130.5
Casp-3 Reverse	5'-CGCAAAGTGACTGGATGAACC-3'	XM_006253130.5
NF- κ B Forward	5'-TTCAACATGGCAGACGACGA-3'	NM_001276711.2
NF- κ B Reverse	5'-AGGTATGGGCCATCTGTTGAC-3'	NM_001276711.2
IL-6 Forward	5'-TGAAGAACAACCTTACAAGATAAC-3'	[79]
IL-6 Reverse	5'-CATTAGGAGAGCATTGGAA-3'	[79]
GAPDH Forward	5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	[80]
GAPDH Reverse	5'-CGGCATGTCAGATCCACAA-3'	[80]

MMP-2 matrix metalloproteinase-2, *MGMT* O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, *Casp-3* caspase-3; *NF- κ B* nuclear factor kappa B, *IL-6*: interleukin-6, *GAPDH* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Figure captions

Fig. 1 Effect of *Butia odorata* (BO) extract on the cell viability (A-C) and cell proliferation (D-F) of C6 rat glioma cells for 24 (A and D), 48 (B and E), and 72 h (C and F). Illustrative images on the effect of BO extract for 72 h (G). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test and were expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=7-12). * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 significantly different from the control group

Fig. 2 Effect of *Butia odorata* (BO) extract on the cell viability (A-C) and cell proliferation (D-F) of U87MG human glioma cells for 24 (A and D), 48 (B and E), and 72 h (C and F). Illustrative images on the effect of BO extract for 72 h (G). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test and were expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=8-12). * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 significantly different from the control group

Fig. 3 Effect of *Butia odorata* (BO) extract on the cell viability (A) and cell proliferation (B) of primary astrocyte culture for 72 h (A and B). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test and expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=10-12)

Fig. 4 Clonogenic assay of untreated C6 rat glioma cells (A) and treated (B) with *Butia odorata* (BO) extract (1500 μ g/mL) for 72 h. Graphic representation of colony number (C) and length (D). Data were analyzed by Student's t-test and expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=3). ** P <0.01, *** P <0.001 significantly different from the control group

Fig. 5 Clonogenic assay of untreated U87MG human glioma cells (A) and treated (B) with *Butia odorata* (BO) extract (750 μ g/mL) for 72 h. Graphic representation of colony number (C) and length (D). Data were analyzed by Student's t-test and expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=3). ** P <0.01 significantly different from the control group

Fig. 6 Redox equilibrium parameters in C6 rat glioma cells treated with *Butia odorata* (BO) extract for 72 h. (A) Reactive oxygen species levels (ROS); (B) Nitrite levels; (C) Superoxide dismutase activity (SOD); (D) Catalase activity (CAT); (E) Sulfhydryl content. Results are expressed as a percentage of control (control value of ROS: 7527.31 μ mol DCF/mg of protein; control value of Nitrites: 2.19 μ M nitrites/mg of protein; control value of SOD: 272.43 units/mg of protein; control value of CAT: 8.20 units/mg protein; control value of SH: 56.07 nmol TNB/mg of protein). Data were analyzed by one-way ANOVA followed

by Tukey's test and expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=5). * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 significantly different from the control group

Fig. 7 Redox equilibrium parameters in U87MG human glioma cells treated with *Butia odorata* (BO) extract for 72 h. (A) Reactive oxygen species levels (ROS); (B) Nitrite levels; (C) Superoxide dismutase activity (SOD); (D) Catalase activity (CAT); (E) Sulphydryl content. Results are expressed as a percentage of control (control value ROS, 250.57 μ mol DCF/mg of protein; control value Nitrites, 0.1301 μ mol nitrites/mg of protein; control value SOD, 139.19 units/mg of protein; control value CAT, 3.56 units/mg protein; control value SH, 50.19 nmol TNB/mg of protein). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test and expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=5). * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 significantly different from the control group

Fig. 8 Effect of *Butia odorata* (BO) extract (750 μ g/mL) on the migration of C6 rat glioma cells at 0, 2, 4, 6, and 24 h (A and B). Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test and expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=5-9). ** P <0.01, *** P <0.001 significantly different from the control group

Fig. 9 Effect of *Butia odorata* (BO) extract on the mRNA expression of C6 rat glioma cells for 72 h. (A) *Matrix metalloproteinase-2* (MMP-2); (B) *O6-methylguanine-DNA-methyltransferase* (MGMT); (C) *Caspase-3* (Casp-3); (D) *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B); (E) *Interleukin-6* (IL-6) genes. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test and were expressed as means $\pm$ standard errors from at least three independent experiments (n=5). ** P <0.01, *** P <0.001 significantly different from the control group

Fig. 10 Overview of *Butia odorata* (BO) extract effects on glioma cell lines. In C6 and U87MG cell lines, the extract reduced the cell viability, proliferation, and colony formation, as well as modulated redox equilibrium parameters. In C6 cells, the extract reduced the cell migration and modulated the expression of genes associated with glioma progression. The extract exhibited a selective cytotoxic effect on glioma cell lines since it did not affect the viability and proliferation of healthy astrocytes

Fig. 1

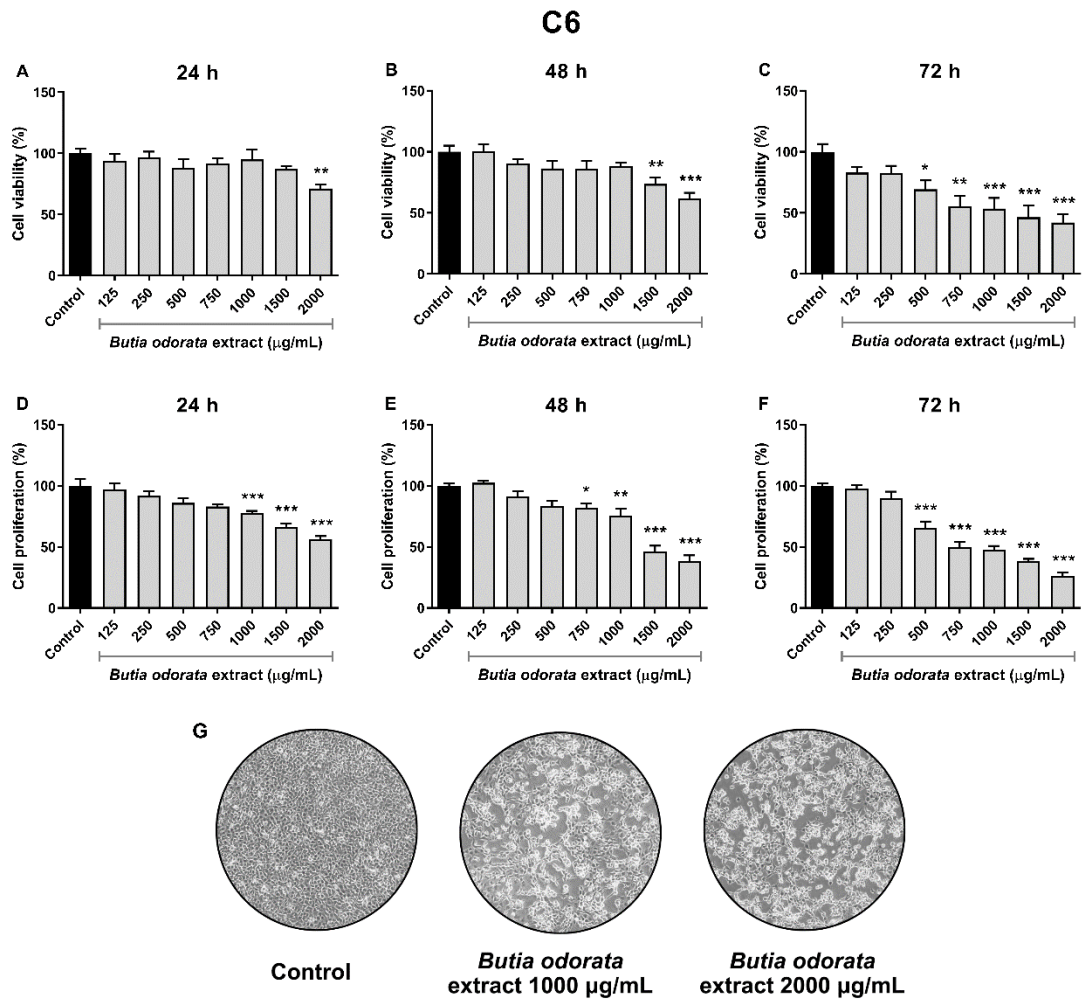


Fig. 2

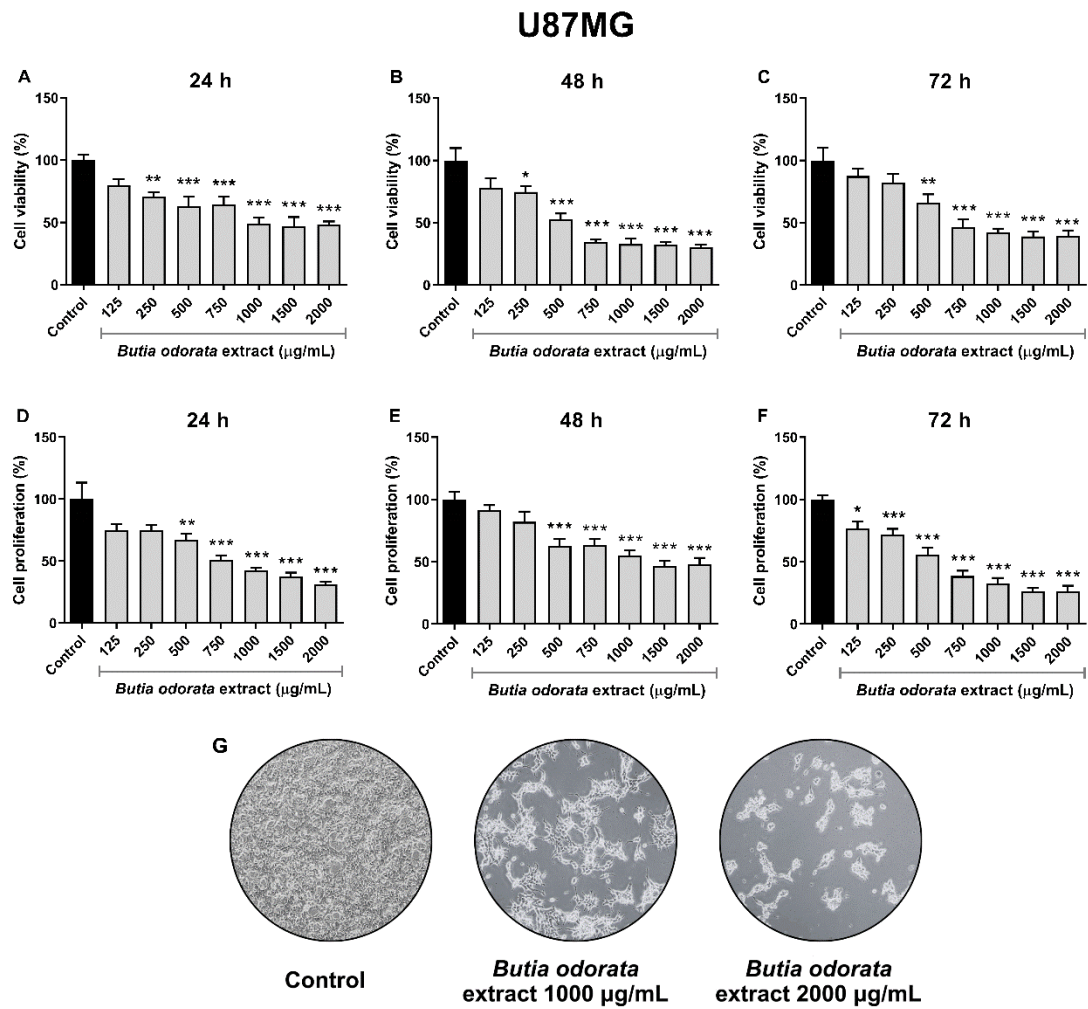


Fig. 3

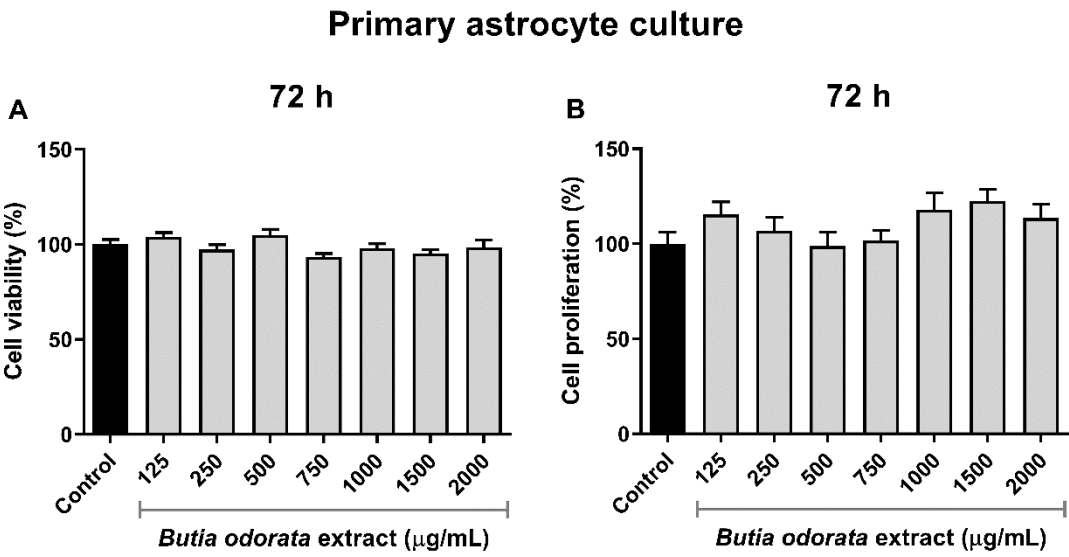


Fig. 4

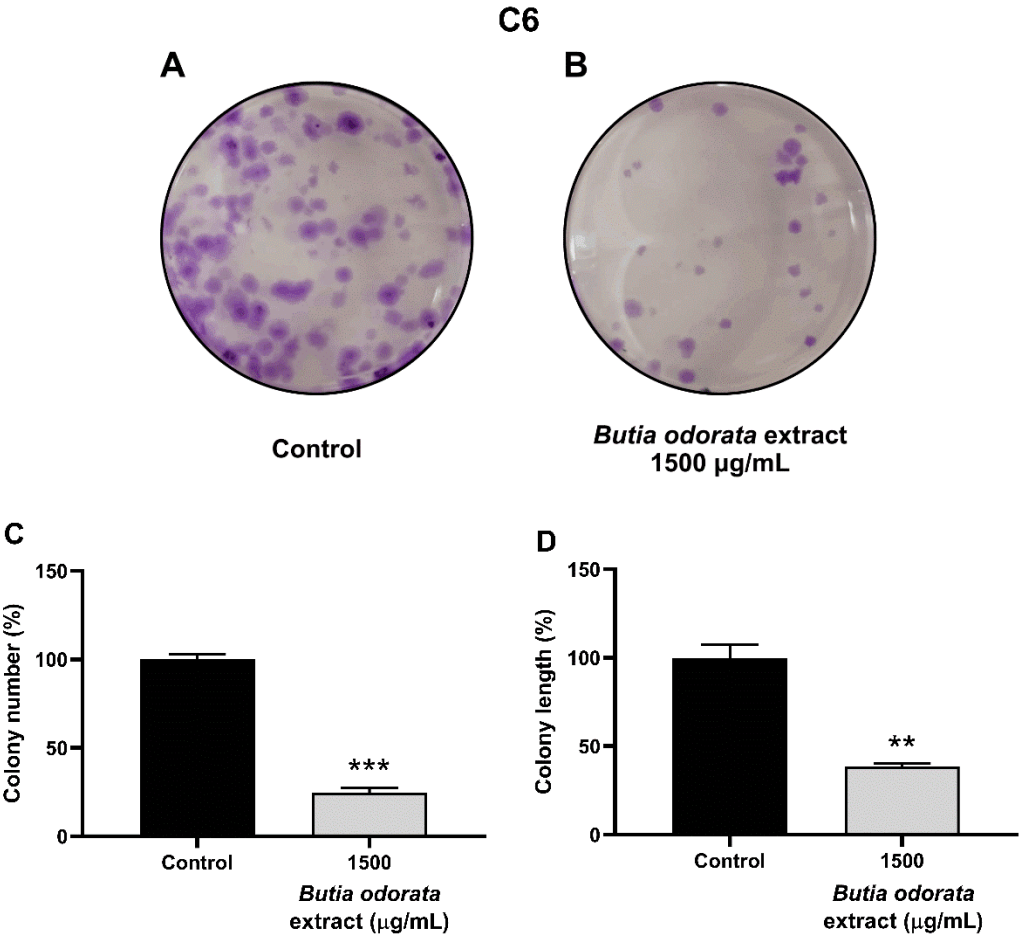


Fig. 5

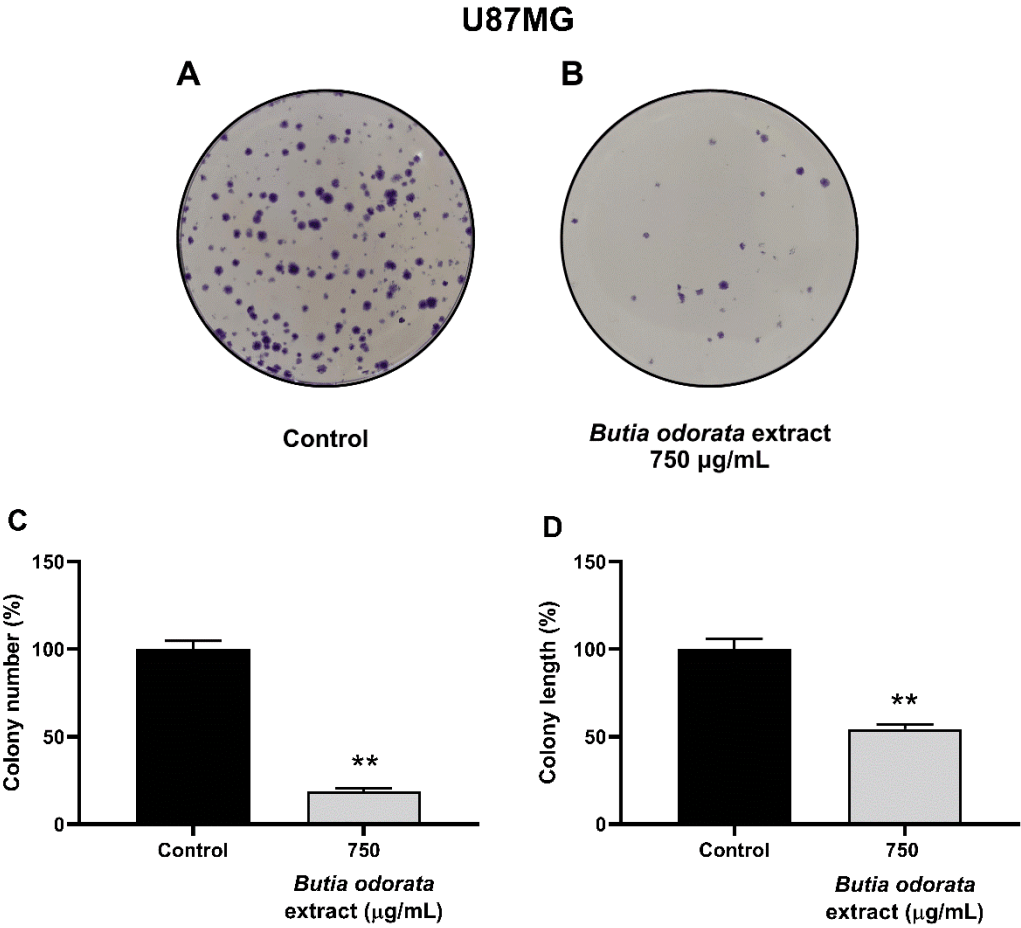


Fig. 6

C6

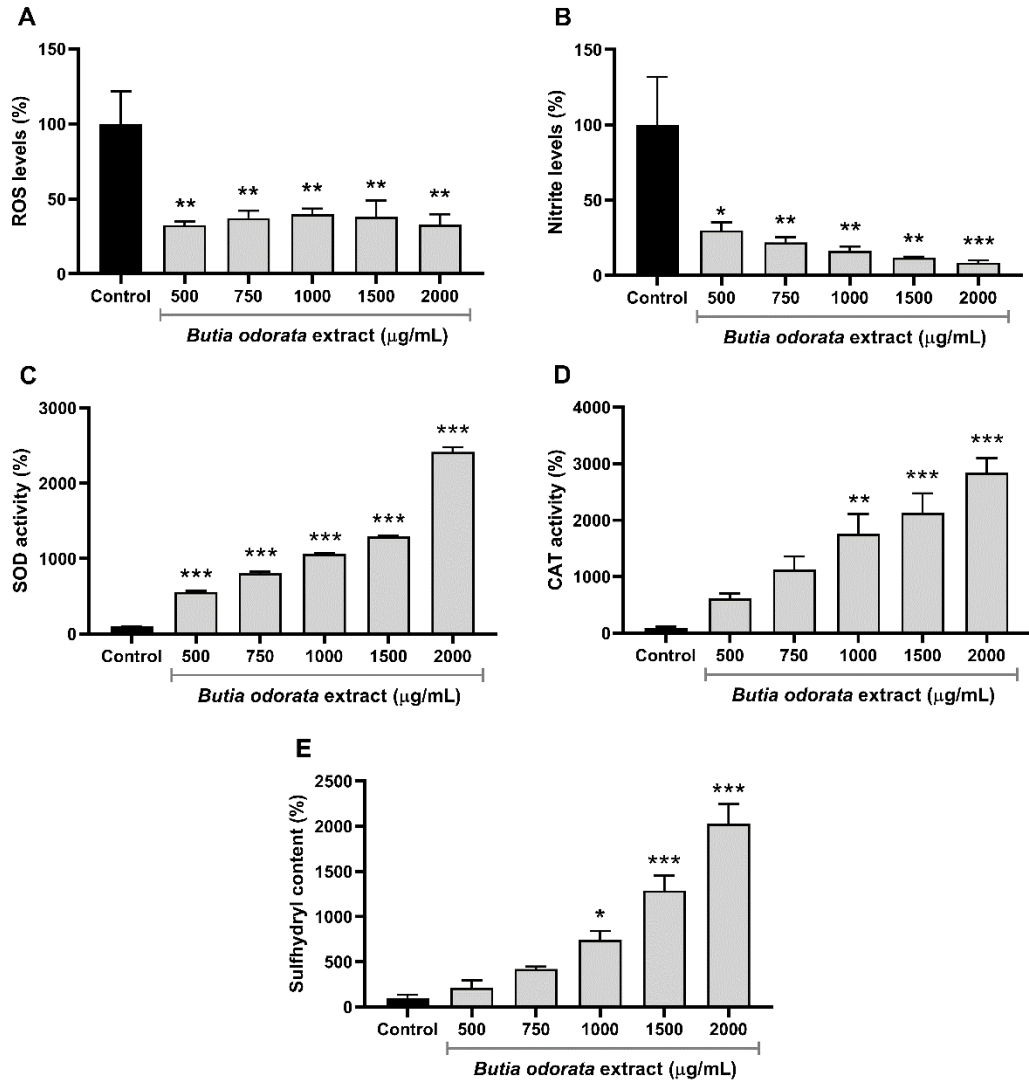


Fig. 7

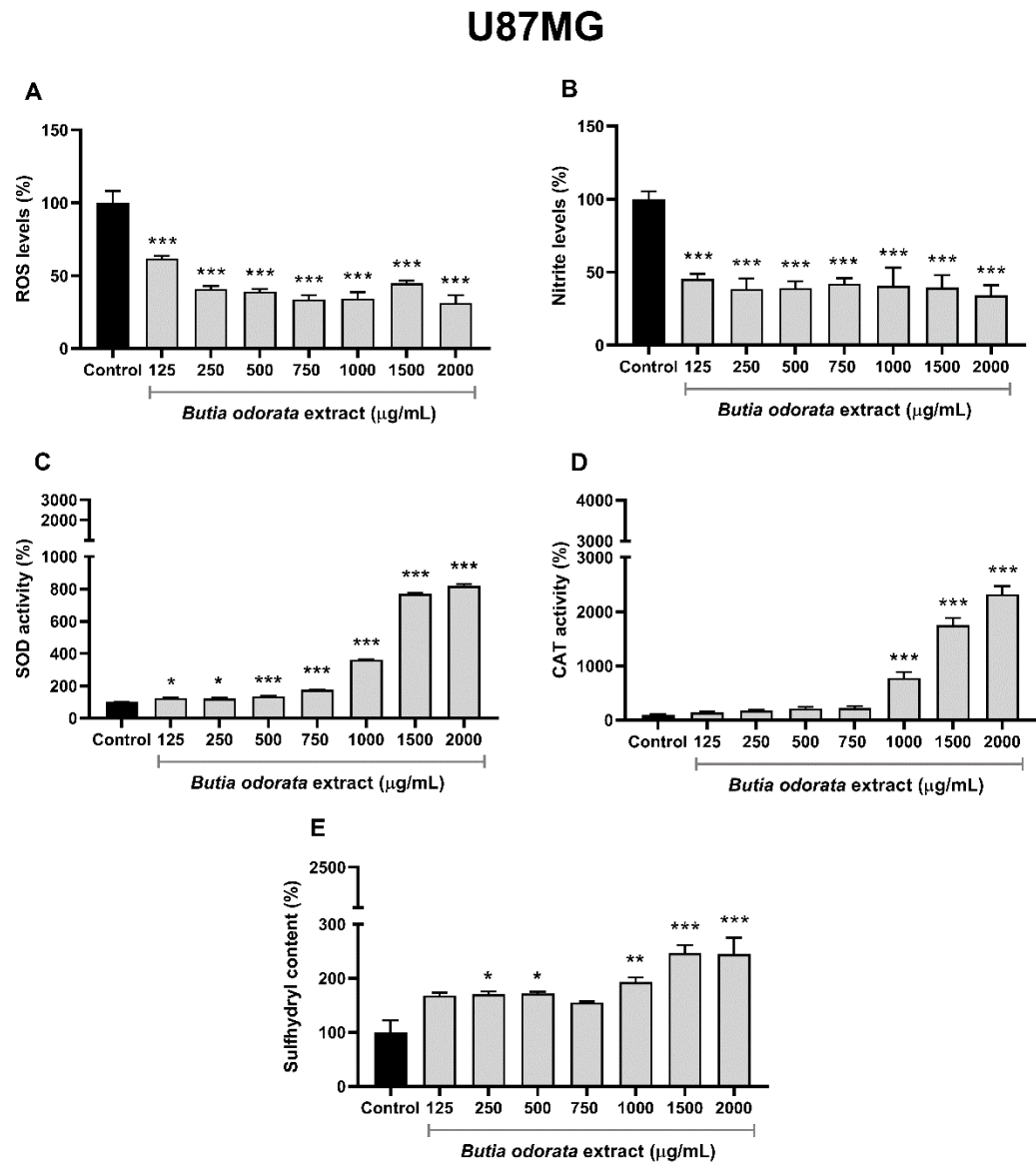


Fig. 8

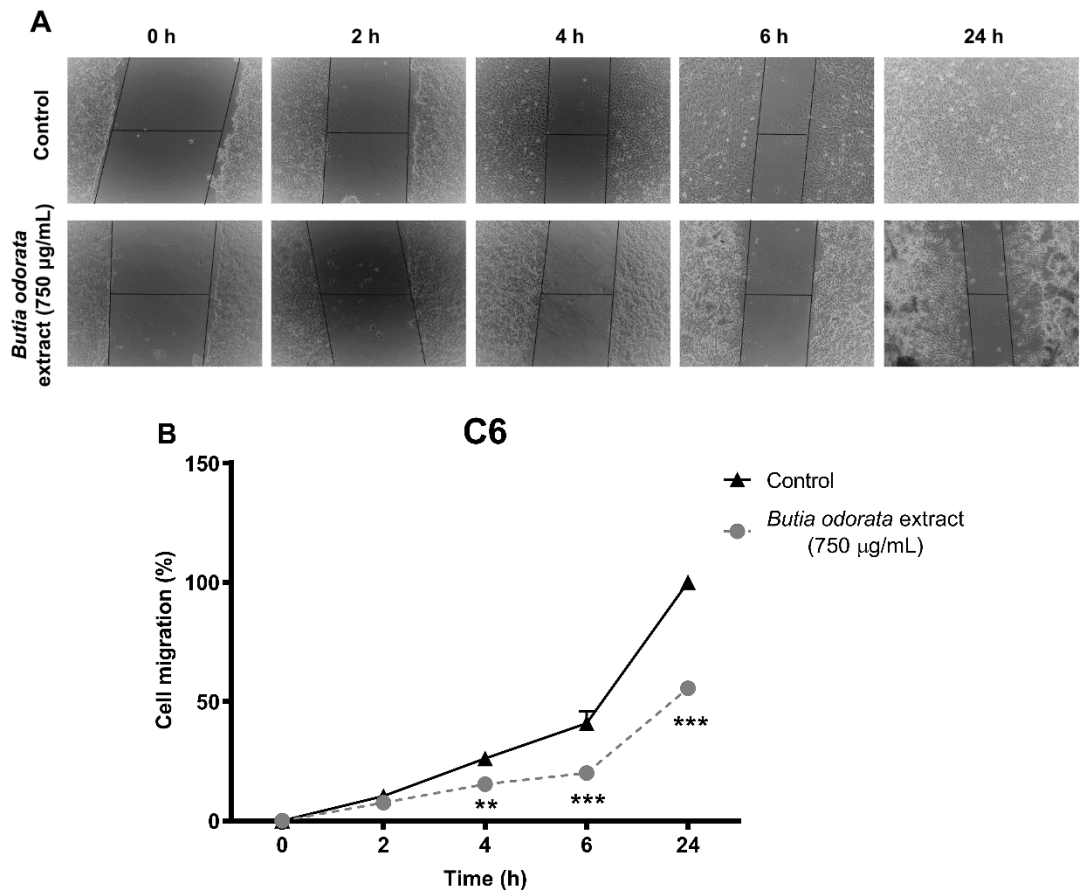


Fig. 9

C6

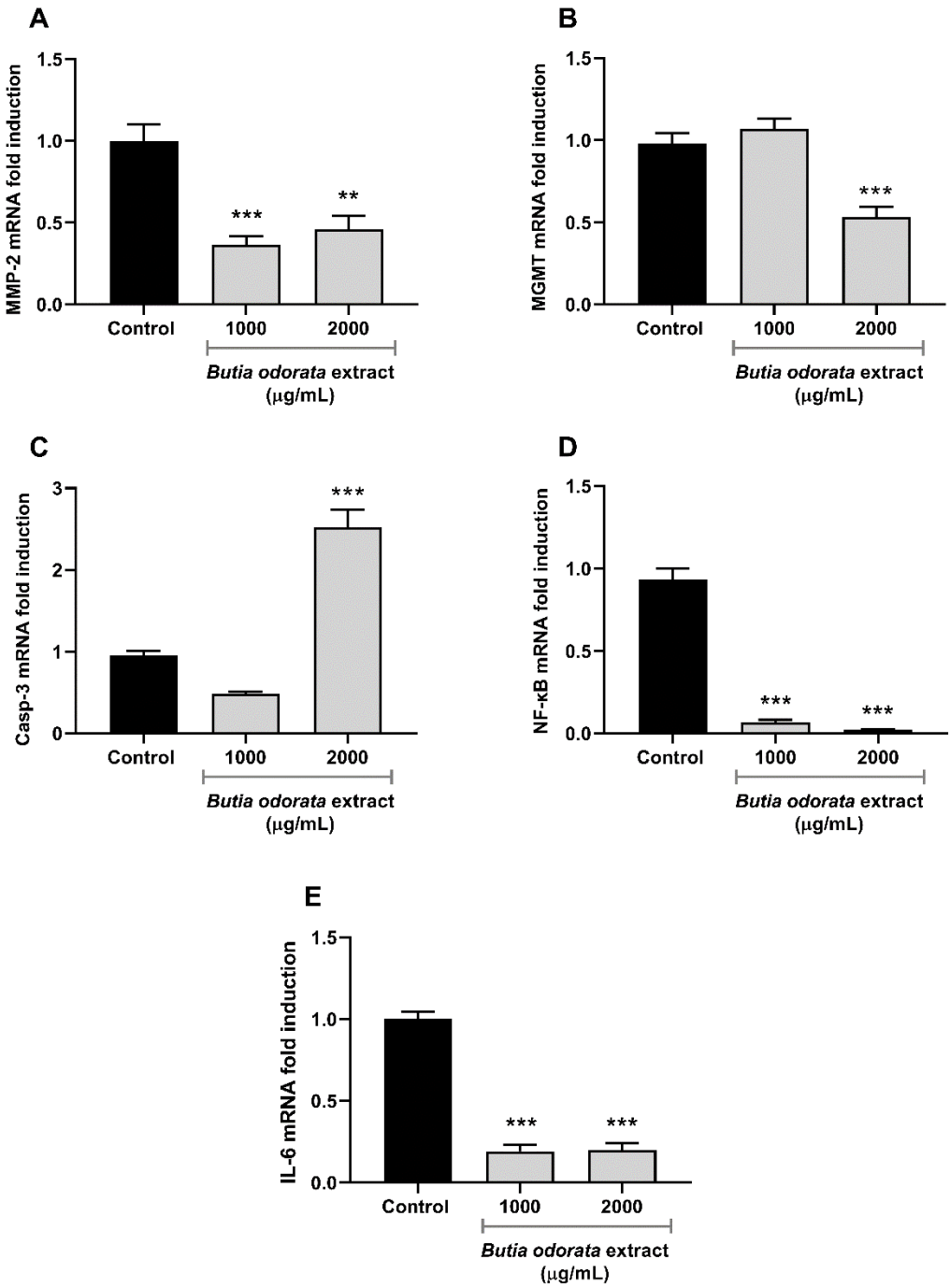
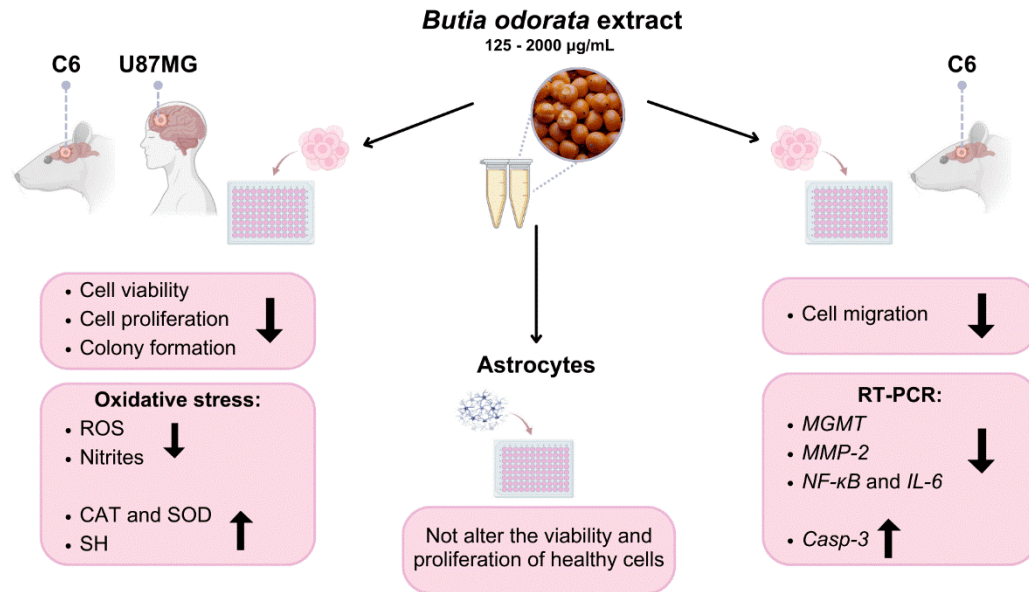


Fig. 10



5 DISCUSSÃO

Dentre os tipos de gliomas existentes o GBM é considerado o tumor maligno mais agressivo do SNC, e os tratamentos atualmente disponíveis promovem apenas uma melhora limitada na qualidade de vida dos pacientes (Huang *et al.*, 2021). Considerando isso, a proposta deste estudo foi investigar o potencial efeito antitumoral *in vitro* do extrato hidroalcoólico de BO frente a essa patologia.

Primeiramente, o extrato de BO reduziu significativamente a viabilidade e a proliferação celular sobre as linhagens de glioma C6 e U87MG em todos os períodos de tratamento, e estes resultados podem ser atribuídos à composição fenólica abundante presente no extrato. Cabe salientar que a elaboração deste trabalho foi motivada por um estudo prévio feito pelo nosso grupo de pesquisa, onde foi realizada a caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico de BO, sendo a catequina ($24,75 \pm 0,64 \mu\text{g/g}$), a epicatequina ($22,57 \pm 0,31 \mu\text{g/g}$) e a rutina ($15,40 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$) os compostos identificados de forma majoritária (Ramos *et al.*, 2020). Ainda, estudos prévios relataram que esses flavonoides exercem diversas atividades biológicas, tais como atividades antioxidante e anti-inflamatória, neuroprotetora e antitumoral (Caparica *et al.*, 2020; Jo *et al.*, 2022; Munteanu; Apetrei, 2022; Josiah *et al.*, 2022). Além disso, uma característica extremamente relevante dos flavonoides no contexto dos gliomas é a sua capacidade de ultrapassar a BHE (Do Nascimento *et al.*, 2022). Especificamente, a catequina e a rutina já demonstraram essa capacidade, além de apresentarem baixa toxicidade, exercendo poucos efeitos adversos (Zhai *et al.*, 2021).

Somado a isso, estudos prévios relataram que o extrato de BO exerce algumas propriedades bioativas, como a redução da atividade microbiana, além de efeitos hipolipemiantes e anti-inflamatórios *in vivo* (Maia *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2020). Quanto à atividade antitumoral, foi observado que o extrato etanólico de BO inibiu a viabilidade celular das linhagens tumorais de colo de útero (SiHa e C33a), apresentando valores de concentração inibitória média (IC_{50}) de 528 e 411 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Boeing *et al.*, 2020). Esses resultados estão em consonância com os obtidos em nosso estudo. Entretanto, observa-se uma escassez de estudos

relacionando os efeitos do extrato de BO frente a modelos de glioma, sendo esse mais um motivo que impulsionou nossa investigação.

Ainda, o extrato de BO demonstrou um efeito mais acentuado na redução da viabilidade e proliferação da linhagem U87MG em comparação com as células C6. Esse efeito pode ser atribuído às diferenças nas mutações que afetam as linhagens de maneira distinta. Entre as mutações presentes, destaca-se que a linhagem U87MG apresenta uma expressão reduzida dos genes *Ataxia Telangiectasia Mutated*, *Breast Cancer 2* e *Exonuclease 1*, os quais desempenham um importante papel de reparo do DNA, tornando essa linhagem mais sensível ao tratamento com TMZ (Sousa *et al.*, 2015). Dessa forma, caso o extrato de BO exerça sua atividade antitumoral de forma semelhante ao TMZ, essas mutações presentes na linhagem U87MG podem estar relacionadas a um efeito mais pronunciado do extrato sobre essas células.

Posteriormente, observamos que o extrato de BO em todas as concentrações testadas não promoveu alterações na viabilidade e proliferação celular em cultura primária de astrócitos, sugerindo que o extrato exerce um efeito seletivo sobre as linhagens de glioma e mantém sua segurança frente às células saudáveis. Esse resultado merece destaque, tendo em vista que os tratamentos convencionais para o GBM promovem efeitos adversos graves, que incluem perda cognitiva após ressecção cirúrgica, inflamação decorrente da quimioterapia e desenvolvimento de cânceres secundários após a radioterapia (Delello *et al.*, 2021). Boeing *et al.* (2020) demonstraram que o extrato de BO não causou alterações citotóxicas sobre a viabilidade de fibroblastos murinos (L929) e de queratinócitos humanos (HaCaT), o que corrobora a segurança no uso deste extrato como uma possível ferramenta coadjuvante ao tratamento usual (Boeing *et al.*, 2020). Aliado a isso, foi relatado que o TMZ reduziu a viabilidade de astrócitos primários (Ziegler *et al.*, 2017), destacando a importância de investigar compostos e extratos naturais com seletividade específica para linhagens de glioma.

Sequencialmente, o extrato de BO foi capaz de reduzir significativamente o número e o tamanho de colônias, tanto na linhagem C6 como na U87MG. Destaca-se que o ensaio clonogênico é um teste fundamental em pesquisas oncológicas e consiste

na contagem de clones celulares provenientes de células únicas para determinar sua capacidade de gerar progênie sob diferentes terapias, possibilitando a avaliação da eficácia de tratamentos (Qian *et al.*, 2023). Indo ao encontro com nosso achado, o extrato de mirtilo, um fruto abundante em flavonoides, demonstrou reduzir o tamanho de colônias de linhagem C6 (Da Silveira *et al.*, 2022). Somado a isso, Sheng (2020) demonstrou que a catequina foi capaz de inibir significativamente a formação de colônias da linhagem U87MG (Sheng, 2020).

Ademais, cabe ressaltar que o estresse oxidativo está amplamente envolvido na tumorigênese de gliomas, tendo em vista que as espécies oxidantes podem ocasionar danos e modificações em lipídios, proteínas, bem como inibem mecanismos responsáveis pelo reparo do DNA (Olivier *et al.*, 2021; Tong *et al.*, 2023). Por conta disso, investigamos os efeitos do extrato de BO sobre diferentes parâmetros de equilíbrio redox frente às linhagens C6 e U87MG. O extrato reduziu os níveis de ERO e de nitritos, por outro lado aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Ressalta-se que a enzima SOD é responsável por converter o ânion $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e oxigênio, enquanto a CAT evita o acúmulo de H_2O_2 , degradando-o em água e oxigênio e, consequentemente, isso pode ter contribuído para a diminuição dos níveis de ERO (Ramírez-Expósito; Martínez-Martos, 2019).

Em concordância com os resultados encontrados, o estudo conduzido por Boeing *et al.* (2020) demonstrou que o extrato hidroalcoólico de BO, quando comparado a outros tipos de solventes utilizados, exibiu uma elevada atividade antioxidante no teste de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, sendo essa bioatividade relacionada principalmente aos compostos catequina, epicatequina e rutina (Boeing *et al.*, 2020). Adicionalmente, Bona *et al.* (2024) demonstraram que o extrato de *Cecropia pachystachya*, rico em flavonoides, foi capaz de modular negativamente os níveis de ERO e de nitritos, bem como aumentou a atividade da enzima SOD em um modelo de glioma *in vivo*, evidenciando o potencial efeito antioxidante destes compostos (Bona *et al.*, 2024). Ainda, os antioxidantes exógenos atuam como eliminadores de radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio e, com isso, neutralizar os efeitos deletérios de ERO (Costa *et al.*, 2021).

Ademais, destaca-se que o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) está relacionado com a produção de antioxidantes. Sob condições de estresse oxidativo, o Nrf2 interage com a proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (Keap1), esse complexo Nrf2-Keap1 se dissocia e, conseqüentemente, o Nrf2 sofre translocação para o núcleo celular. Isso resulta na produção e liberação de antioxidantes como SOD e CAT (Clifford *et al.*, 2021; Joma *et al.*, 2023). Em conformidade, um dos possíveis mecanismos antioxidantes dos flavonoides inclui a ligação de forma competitiva com a proteína Keap1 no sítio de ligação do Nrf2, resultando em sua translocação para o núcleo que, por sua vez, desencadeia na regulação positiva de genes antioxidantes (Joma *et al.*, 2023). Assim, tendo em vista os resultados encontrados, pode-se inferir que o efeito antioxidante promovido pelo extrato de BO esteja relacionado com a via do Nrf2.

A fim de compreender mais profundamente os efeitos antitumorais do extrato de BO, foi realizado o teste de migração celular e avaliada a expressão de *metaloproteinase de matriz 2* (MMP-2) sobre a linhagem C6. Foi demonstrado que o extrato inibiu a migração das células e regulou negativamente a expressão de *MMP-2*. É válido ressaltar que a migração, invasão e metástase de células tumorais estão relacionadas com a transição epitelial-mesenquimal (EMT), na qual influencia na adesão e mobilidade celular, aumentando a capacidade de migração (Zhai *et al.*, 2021). Além disso, nos gliomas observa-se um aumento na expressão das *MMPs* 2 e 9, enzimas associadas à membrana que participam da degradação da matriz extracelular. Isso favorece a EMT, o que, por sua vez, contribui para a migração e invasão tumoral do glioma (Beylerli *et al.*, 2022; Zhai *et al.*, 2021). Ademais, as ERO desempenham um papel importante durante o desenvolvimento do glioma, incluindo a migração celular, ao regular positivamente as *MMPs* 2 e 9 (Ostrowski; Pucko, 2022). Frente a isso, extratos de origem natural demonstraram capacidade de inibir a migração celular em diferentes linhagens de glioma (Da Silveira *et al.*, 2022; Bona *et al.*, 2024). Ainda, foi evidenciado que o epigallocatequina-galato (EGCG) modulou a invasividade da linhagem de glioma humano U251 ao suprimir a expressão de *MMP-9* e *MMP-2* (Li *et al.*, 2014), o que está em concordância com os nossos resultados.

Ainda, investigamos o efeito do extrato de BO sobre a expressão de *O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT)* na linhagem C6, e os resultados revelaram que o extrato reduziu a expressão deste gene. Ressalta-se que um dos mecanismos de resistência relacionado ao TMZ está ligado ao aumento da atividade de MGMT, enzima responsável pelo reparo das lesões de DNA provocadas pelo quimioterápico (Wu *et al.*, 2021; Tiek *et al.*, 2022). Dessa forma, o uso de compostos capazes de reduzir a expressão dessa enzima surge como uma estratégia promissora para potencializar os efeitos citotóxicos de TMZ e melhorar o prognóstico dos pacientes (Wu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2017). Corroborando com o resultado encontrado, estudos anteriores descreveram que o tratamento combinado de quercetina e TMZ reduziu os níveis de MGMT sobre a linhagem C6 (Vibhavari *et al.*, 2023), bem como foi observado que este mesmo composto reduziu a expressão de *MGMT* em células de glioma T98G (Wang *et al.*, 2023).

Ademais, avaliamos a expressão de *casp-3* após o tratamento com o extrato de BO, e foi observado uma elevação da expressão deste gene. Cabe salientar que compostos capazes de induzir efeitos antineoplásicos por meio da ativação de apoptose têm recebido considerável atenção (Yadav *et al.*, 2021). A *casp-3* é uma caspase do tipo executora de apoptose, e pesquisas já mostraram que os flavonoides podem elevar a expressão de *casp-3* em células de glioma (Yadav *et al.*, 2021; Wong; Kamarudin; Naidu, 2023). Indo ao encontro com o resultado achado, já foi demonstrado que a combinação de compostos bioativos de origem natural exerce efeitos apoptóticos através da ativação de *casp-3* em diferentes linhagens de glioma (Abdul *et al.*, 2022).

Ademais, o NF- κ B é um fator de transcrição cuja ativação está associada ao desenvolvimento de câncer, quimiorresistência e proliferação de células tumorais, especialmente no contexto do GBM (Ji *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2017). A ativação de NF- κ B também estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, responsável por regular funções relacionadas à proliferação celular, crescimento, diferenciação e migração (Yu *et al.*, 2020). Dessa forma, considerando a relação entre o estresse oxidativo e vias associadas à inflamação (Shi *et al.*, 2023), investigamos o efeito do extrato sobre a expressão de genes *NF- κ B* e *IL-6* a fim de elucidar possíveis efeitos

anti-inflamatórios do extrato. Foi observada uma diminuição na expressão de ambos os genes após o tratamento com o extrato, sugerindo que o tratamento exerce potenciais efeitos anti-inflamatórios. O resultado achado vai ao encontro com estudos prévios que demonstram efeitos anti-inflamatórios de flavonoides, como a quercetina, rutina e o EGCG, através da modulação desses genes (Da Silva *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2022).

Por fim, é importante enfatizar que a escolha predominante da linhagem C6 nas análises de expressão gênica foi motivada pela intenção de dar seguimento aos estudos em modelos *in vivo*. Essa escolha foi justificada pelo fato de a linhagem C6 ser amplamente utilizada em modelos pré-clínicos de glioma utilizando ratos Wistar (Bona *et al.*, 2019; Pedra *et al.*, 2022).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo foi possível observar o potencial antiglioma do extrato hidroalcoólico de BO nas linhagens C6 e U87MG. O extrato foi eficaz na redução da viabilidade e proliferação celular em ambas as linhagens, sendo este efeito observado de forma seletiva, uma vez que o extrato não apresentou citotoxicidade na cultura primária de astrócitos.

Além disso, o tratamento com o extrato de BO reduziu a produção de ERO e de nitritos, aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT, elevou o teor de sulfidrilas, e inibiu o crescimento e a formação de colônias tumorais nas linhagens C6 e U87MG. Especificamente na linhagem C6, o extrato de BO reduziu a capacidade migratória das células tumorais, diminuiu a expressão de *MMP-2*, *MGMT*, *NF- κ B* e *IL-6*, e aumentou a expressão de *casp-3*, evidenciando possíveis efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios.

Os resultados apresentados estão em consonância com estudos anteriores que apontam potenciais atividades antitumorais de compostos bioativos e extratos vegetais. Vale destacar que este é o primeiro trabalho que demonstrou o efeito do extrato de BO em linhagens de glioma, uma área ainda pouco investigada. Assim, nossos achados reforçam a importância de estudos futuros para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos de ação antiglioma deste extrato, almejando o possível uso de BO como uma terapia adjuvante em pacientes com GBM.

REFERÊNCIAS

- ABDUL, A. et al. Inhibitory mechanism of combined hydroxychavicol with epigallocatechin-3-gallate against glioma cancer cell lines: A transcriptomic analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 844199, 2022.
- AH-PINE, F. et al. On the origin and development of glioblastoma: multifaceted role of perivascular mesenchymal stromal cells. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 24, n. 1, p. 104, 2023.
- ALLEN, M. et al. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 354, p. 354re3, 2016.
- ANTUNES, B. et al. Chemical composition, bioactive compounds, biological activity, and applications of *Butia* spp.: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 148, p. 104510, 2024.
- ASMA, S. et al. Natural products/bioactive compounds as a source of anticancer drugs. **Cancers (Basel)**, v. 14, n. 24, p. 6203, 2022.
- BARBOSA, M. et al. Composition proximate, bioactive compounds and antioxidant capacity of *Butia capitata*. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 763-768, 2021.
- BEYLERLI, O. et al. Therapeutic effect of natural polyphenols against glioblastoma. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 1036809, 2022.
- BISEROVA, K. et al. Cancer stem cells: Significance in origin, pathogenesis and treatment of glioblastoma. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 621, 2021.
- BOEING, J. S. et al. Phenolic compounds from *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick fruit and its antioxidant and antitumor activities. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 61-68, 2020.
- BONA, N. P. et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, n. 2, p. 283-293, 2019.
- BONA, N. P. et al. Antitumoral activity of *Cecropia pachystachya* leaves extract in vitro and in vivo model of rat glioma: Brain and blood effects. **Molecular Neurobiology**, 2024.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 1-35, 2024.

BROWN, J. S. et al. Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 1142-1147, 2023.

CAMPOS, J. F. et al. Leaf and Root Extracts from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) Promote Apoptotic Death of Leukemic Cells via Activation of Intracellular Calcium and Caspase-3. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 466, 2017.

CAPARICA, R. et al. Anticancer activity of rutin and its combination with ionic liquids on renal cells. **Biomolecules**, v. 10, p. 233, 2020.

CLARK, M. J. et al. U87MG decoded: The genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. **PLOS Genetics**, v. 6, n. 1, p. e1000832, 2010.

CLIFFORD, T. et al. The effect of dietary phytochemicals on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation: A systematic review of human intervention trials. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 1745–1761, 2021.

COSTA, M. et al. Polyphenols as antioxidants for extending food shelf-life and in the prevention of health diseases: Encapsulation and interfacial phenomena. **Biomedicines**, v. 9, p. 1909, 2021.

DA SILVA, A. B. et al. The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving anti-glioma activity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 85, p. 170-185, 2020.

DA SILVEIRA, L. M. et al. Selective in vitro anticancer effect of blueberry extract (*Vaccinium virgatum*) against C6 rat glioma: exploring their redox status. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 2, p. 439-449, 2022.

DELELLO, L. et al. Improving temozolomide biopharmaceutical properties in glioblastoma multiforme (GBM) treatment using GBM-targeting nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 168, p. 76-89, 2021.

DE VISSER, K. E.; JOYCE, J. A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell**, v. 41, n. 3, p. 374-403, 2023.

DO NASCIMENTO, R. P. et al. Neuroimmunomodulatory properties of flavonoids and derivatives: a potential action as adjuvants for the treatment of glioblastoma. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 116, 2022.

FAN, W. et al. Glioma cells are resistant to inflammation-induced alterations of mitochondrial dynamics. **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 6, p. 1293-1306, 2020.

FARHAN, M. Green tea catechins: Nature's way of preventing and treating cancer.

International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 18, p. 10713, 2022.

GALLEGO-JARA, J. et al. A comprehensive review about Taxol®: History and future challenges. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5986, 2020.

GIAKOUMETTIS, D.; KRITIS, A.; FOROGLOU, N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. **Hippokratia**, v. 22, n. 3, p. 105, 2018.

GUYON, J. et al. The Normal and Brain Tumor Vasculature: Morphological and Functional Characteristics and Therapeutic Targeting. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 622615.

HOFFMANN, J. et al. Stability of bioactive compounds in butiá (*Butia odorata*) fruit pulp and nectar. **Food Chemistry**, v. 237, p. 638-644, 2017.

HOSSEINI, A. et al. Recent advances in the detection of glioblastoma, from imaging-based methods to proteomics and biosensors: A narrative review. **Cancer Cell International**, v. 23, n. 1, p. 98, 2023.

HOTCHKISS, K.; SAMPSON, J. Temozolomide treatment outcomes and immunotherapy efficacy in brain tumor. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 151, n. 1, p. 55-62, 2021.

HUANG, B. et al. Current immunotherapies for glioblastoma multiforme. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 603911, 2021.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: Abordagens Básicas Para o Controle do Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

IRÍAS-MATA, A. et al. Carotenoids and xanthophyll esters of yellow and red nance fruits (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) from Costa Rica. **Food Research International**, v. 111, p. 708-714, 2018.

JI, J. et al. TRIM22 activates NF- κ B signaling in glioblastoma by accelerating the degradation of I κ B α . **Cell Death & Differentiation**, v. 28, p. 367-381, 2021.

JO, Y. J. et al. Antioxidant and skin whitening activities of sub and super-critical water treated rutin. **Molecules**, v. 27, p. 5441, 2022.

JOMA, N. et al. Flavonoids regulate redox-responsive transcription factors in glioblastoma and microglia. **Cells**, v. 12, p. 2821, 2023.

JOSIAH, S. et al. Neuroprotective effects of catechin and quercetin in experimental Parkinsonism through modulation of dopamine metabolism and expression of IL-1 β , TNF- α , NF- κ B, I κ B, and p53 genes in male Wistar rats. **Neurotoxicology**, v. 90, p. 158-171, 2022.

KIM, S. R. et al. Epigallocatechin gallate protects against hypoxia-induced inflammation in microglia via NF- κ B suppression and Nrf-2/HO-1 activation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 4004, 2022.

KUMAR, S.; SINGH, B.; SINGH, R. Catharanthus roseus (L.) G. Don: A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 284, p. 114647, 2022.

LEO, R.; FRODEY, J.; RUGGIERI, M. Subtle neuropsychiatric symptoms of glioblastoma multiforme misdiagnosed as depression. **BMJ Case Reports**, v. 13, n. 3, p. 233208, 2020.

LI, H. et al. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis, inhibits proliferation and decreases invasion of glioma cells. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, p. 67-73, 2014.

LI, H. et al. Differences in protein expression between the U251 and U87 cell lines. **Turkish Neurosurgery**, v. 27, n. 6, p. 894-903, 2017.

LI, M. et al. BKM120 sensitizes C6 glioma cells to temozolomide via suppression of the PI3K/Akt/NF- κ B/MGMT signaling pathway. **Oncology Letters**, v. 14, p. 6597-6603, 2017.

LIU, W. et al. The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12824, 2021.

LOUIS, D. et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Neuro-oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

MAIA, D. et al. Butia odorata Barb. Rodr. extract inhibiting the growth of Escherichia coli in sliced mozzarella cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 1663-1668, 2019.

MEDINA, A. et al. Araçá (Psidium cattleianum Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food**

Chemistry, v. 128, n. 4, p. 916-922, 2011.

MORAIS, R. A. et al. Nutritional composition and bioactive compounds of native Brazilian fruits of the Arecaceae family and its potential applications for health promotion. **Nutrients**, v. 14, n. 19, p. 4009, 2022.

MUNIEWEG, F. et al. Antiproliferative Cancer Cell and Fungicidal Effects of Yellow and Red Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) Fruit Extract. **Foods**, v. 12, n. 23, p. 4307, 2023.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Assessment of the antioxidant activity of catechin in nutraceuticals: Comparison between a newly developed electrochemical method and spectrophotometric methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 8110, 2022.

NÁJERA-MALDONADO, J. M. et al. Phenolic compounds of therapeutic interest in neuroprotection. **Journal of Xenobiotics**, v. 14, n. 1, p. 227-246, 2024.

OLIVIER, C. et al. Drug resistance in glioblastoma: The two faces of oxidative stress. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 620677, 2021.

OSTROM, Q. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2016-2020. **Neuro-Oncology**, v. 25, n. 12 Suppl 2, p. iv1-iv99, 2023.

OSTROM, Q. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. **Neuro-Oncology**, v. 21, n. suppl 5, p. v1-v100, 2019.

OSTROWSKI, R. P.; PUCKO, E. B. Harnessing oxidative stress for anti-glioma therapy. **Neurochemistry International**, v. 154, p. 105281, 2022.

PEDRA, N. S. et al. Impact of gallic acid on tumor suppression: Modulation of redox homeostasis and purinergic response in in vitro and a preclinical glioblastoma model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 110, p. 109156, 2022.

PERSANO, F. et al. Natural Compounds as Promising Adjuvant Agents in The Treatment of Gliomas. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 23, v. 6, p. 3360, 2022.

PRASAD, C. P. et al. Passage number of cancer cell lines: Importance, intricacies, and way-forward. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 120, n. 8, p. 2049-2055, 2023.

QIAN, H. et al. High-content and high-throughput clonogenic survival assay using fluorescence barcoding. **Cancers (Basel)**, v. 15, p. 4772, 2023.

RAMÍREZ-EXPÓSITO, M. J.; MARTÍNEZ-MARTOS, J. M. The Delicate Equilibrium between Oxidants and Antioxidants in Brain Glioma. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 4, p. 342–351, 2019.

RAMOS, V. et al. Hypolipidemic and anti-inflammatory properties of phenolic rich *Butia odorata* fruit extract: potential involvement of paraoxonase activity. **Biomarkers**, v. 25, n. 5, p. 417-424, 2020.

SANTOS, M. et al. Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 2023.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. D. et al. Blood-brain barrier permeability study of potential neuroprotective compounds recovered from plants and agri-food by-products. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 924596, 2022.

SCHAFF, R.; MELLINGHOFF, K. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: A review. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 329, n. 7, p. 574-587, 2023.

SENGA, S. S.; GROSE, R. P. Hallmarks of cancer - the new testament. **Open Biology**, v. 11, n. 1, p. 200358, 2021.

SHARIFI-RAD, M. et al. Preclinical pharmacological activities of epigallocatechin-3-gallate in signaling pathways: An update on cancer. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 467, 2020.

SHARMA, P. et al. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. **Neuro-Oncology Advances**, n. 5, p. 1, 2023.

SHENG, Z. Z. Anticancer effects of catechin flavonoid in human glioma cells are mediated via autophagy induction, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion, and targeting MAPK/ERK signaling pathway. **Journal of BUON**, v. 25, p. 1084-1090, 2020.

SHI, Z. et al. Comprehensive analysis of oxidative stress-related lncRNA signatures in glioma reveals the discrepancy of prognostic and immune infiltration. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 7731, 2023.

SIMÕES, W. S. et al. Antitumoral activity of electrospray-nanoencapsulated tannic acid on C6 and U87MG glioblastoma cell lines. **BioNanoScience**, 2024.

SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. **Annals of African Medicine**, v. 18, n. 3, p. 121-126, 2019.

SOUSA, J. F. et al. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 213-218, 2015.

SUN, D. et al. Cancer burden in China: trends, risk factors and prevention. **Cancer Biology & Medicine**, v. 17, n. 4, p. 879-895, 2020.

TIEK, D. M. et al. Temozolomide-induced guanine mutations create exploitable vulnerabilities of guanine-rich DNA and RNA regions in drug-resistant gliomas. **Science Advances**, v. 8, eabn3471, 2022.

TONG, S. et al. Identification and validation of a novel prognostic signature based on mitochondria and oxidative stress-related genes for glioblastoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, p. 136, 2023.

VIBHAVARI, R. J. A. et al. Enhancing temozolomide antiglioma response by inhibiting O6-methylguanine-DNA methyltransferase with selected phytochemicals: in silico and in vitro approach. **3 Biotech**, v. 13, p. 385, 2023.

WANG, W. et al. Quercetin induces MGMT+ glioblastoma cells apoptosis via dual inhibition of Wnt3a/ β -Catenin and Akt/NF- κ B signaling pathways. **Phytomedicine**, v. 118, p. 154933, 2023.

WENINGER, L. et al. Diffusion MRI anomaly detection in glioma patients. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 20366, 2023.

WHITFIELD, B. T.; HUSE, J. T. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. **Brain Pathology**, v. 32, n. 4, p. 1-12, 2022.

WONG, S. C.; KAMARUDIN, M. N. A.; NAIDU, R. Anticancer mechanism of flavonoids on high-grade adult-type diffuse gliomas. **Nutrients**, v. 15, p. 797, 2023.

WU, S. et al. PARP-mediated PARylation of MGMT is critical to promote repair of temozolomide-induced O6-methylguanine DNA damage in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 23, p. 920-931, 2021.

XAVIER, A. A.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoids as a source of antioxidants in the diet. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 79, p. 359-375, 2016.

YADAV, P. et al. Caspase-3: A primary target for natural and synthetic compounds for cancer therapy. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 98, p. 144-165, 2021.

YU, H. et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, p. 209, 2020.

ZHAI, K. et al. Flavonoids Synergistically Enhance the Anti-Glioblastoma Effects of Chemotherapeutic Drugs. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1841, 2021.

ZIEGLER, J. et al. AG488 as a therapy against gliomas. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 71833-71844, 2017.

Anexos

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

08/02/2019

SEI/UFPel - 0278125 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

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**.