

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



Dissertação

**Efeito antitumoral e modulação do status redox do extrato de *Rubus sp.*
(amora-preta) em linhagens celulares de glioblastoma**

Larissa Menezes da Silveira

Pelotas, 2024

Larissa Menezes da Silveira

**Efeito antitumoral e modulação do status redox do extrato de *Rubus sp.*
(amora-preta) em linhagens celulares de glioblastoma**

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

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

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Mayara Sandrielly Soares de Aguiar

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S587e Silveira, Larissa Menezes da

Efeito antitumoral e modulação do status redox do extrato de *Rubus sp.* (amora-preta) em linhagens celulares de glioblastoma [recurso eletrônico] / Larissa Menezes da Silveira ; Francieli Moro Stefanello, orientadora ; Mayara Sandrielly Soares de Aguiar, coorientadora. — Pelotas, 2024.
62 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. Glioblastoma. 3. Amora-preta. 4. Antioxidante. I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Aguiar, Mayara Sandrielly Soares de, coorient. III. Título.

CDD 616.99481

Larissa Menezes da Silveira

**Efeito antitumoral e modulação do status redox do extrato de *Rubus sp.*
(amora-preta) em linhagens celulares de glioblastoma**

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: 04/03/2024

Banca examinadora:

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

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

.....
Prof.^a Dr.^a Nathieli Bianchin Bottari

Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

.....
Prof.^a Dr.^a Fernanda Cardoso Teixeira

Doutora em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção) pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)

**Dedico este trabalho aos meus pais, pois sem
eles nada seria possível.**

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Laurício e Tatiana, por sempre estarem ao meu lado, por todo amor e apoio, pelo incentivo e investimento em minha educação, por serem exemplos e guias em minha trajetória. Às minhas irmãs, Taciane e Luísa, por serem ombro amigo, acolhimento e um pedaço de casa em Pelotas, pela convivência e trocas diárias, por nos completarmos em nossas diferenças. Ao meu namorado, Diego, por estar ao meu lado nessa reta final, pelo amor, carinho, incentivo diário, e por sempre acreditar em mim! Obrigada por serem minha família!

As minhas orientadoras, Francieli e Mayara, por serem sempre tão atenciosas, dispostas e acolhedoras. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, por toda dúvida sanada, por me permitirem crescer como pesquisadora ao lado de exemplos tão incríveis como vocês! May, um agradecimento especial a você, por estar comigo desde o TCC, você foi e continua sendo minha maior influência para adentrar no mundo da bioquímica, obrigada por tudo!

A Thais e a Nati Bona, grandes amigas que a pós-graduação me trouxe, obrigada por compartilharem essa jornada comigo, por todas as trocas, pelos mates e cafés cedinho no laboratório, e pelas noites de sushi que tornaram tudo mais leve. A Nathi Pedra, por sempre estar disposta a ajudar, por ser tão atenciosa e paciente em suas explicações, muito obrigada por tudo!

A toda equipe dos laboratórios Neurocan e Biomarcadores, obrigada por toda parceria e conhecimento compartilhado!

A CAPES e a UFPel, pelo apoio financeiro e formação acadêmica.

Muito obrigada!

*“A leitura torna o homem completo; a conversação torna-o ágil;
e o escrever dá-lhe precisão” Francis Bacon.*

Resumo

SILVEIRA, Larissa Menezes. Efeito antitumoral e modulação do status redox do extrato de *Rubus sp.* (amora-preta) em linhagens celulares de glioblastoma. 2024. Nº 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas.

O glioblastoma (GBM) é um tumor cerebral altamente maligno devido ao seu comportamento agressivo, manifestado por uma intensa atividade de divisão celular, habilidade de formação de novos vasos sanguíneos e propensão à invasão nos tecidos circundantes, sendo comum observar uma resposta frequentemente limitada ao tratamento oncológico convencional. Ademais, a combinação da agressividade do tumor com as opções limitadas de tratamento resulta em uma taxa de sobrevivência baixa para os pacientes, entre 12 a 15 meses. Nessa perspectiva, *Rubus sp.* (amora-preta) faz-se alvo de estudos como uma alternativa terapêutica para o tratamento do GBM, tendo em vista sua rica composição em compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antineoplásicas já descritas em outras neoplasias. Dessa forma, o presente estudo teve como propósito investigar o potencial antitumoral do extrato metanólico de amora-preta em relação às linhagens de glioma de rato (C6) e humana (U87). Células das linhagens de glioma C6 e U87 foram expostas ao extrato metanólico de amora-preta em concentrações variando de 125 a 2000 µg/mL, ao longo de períodos de 24 h, 48 h e/ou 72 h. Foram avaliadas viabilidade e biomassa celular, nas linhagens cancerígenas e em cultura primária de astrócitos. Ainda, parâmetros de estresse oxidativo, formação de colônias, proliferação e migração celular, além dos níveis de interleucina 10, foram avaliados na linhagem C6. Inicialmente, não foram observadas alterações de viabilidade ou biomassa celular em culturas de astrócitos saudáveis expostas ao extrato de amora-preta, indicativo de sua não toxicidade. Por outro lado, o extrato de amora-preta, para a linhagem C6, reduziu a viabilidade e biomassa celular a partir das concentrações de 750 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente, e para a linhagem U87, nas concentrações de 125-2000 µg/mL. Após 72h de tratamento, observou-se na linhagem C6 uma redução de espécies reativas em todas as concentrações testadas, um aumento no conteúdo de sulfidrilas nas concentrações de 1500 e 2000 µg/mL, bem como, elevação da atividade das enzimas glutatona S-transferase, superóxido dismutase e catalase nas três maiores concentrações. Quanto à formação de colônias, observou-se uma redução em tamanho e número na C6. Referente à migração celular, foi observada uma atenuação a partir de 6 h de tratamento com 125 µg/mL do extrato de amora-preta. Ademais, observou-se uma redução expressiva dos níveis de interleucina 10 em todas as concentrações testadas. Assim, o extrato de amora-preta emerge como um promissor composto na abordagem terapêutica do GBM.

Palavras-chave: câncer; glioblastoma; amora-preta; antioxidante.

Abstract

SILVEIRA, Larissa Menezes. Antitumor effect and redox status modulation of *Rubus sp.* (blackberry) extract in glioblastoma cell lines. 2024. Nº 62f. Dissertation (Master degree) - Post-graduation Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas.

Glioblastoma (GBM) is a highly malignant brain tumor due to its aggressive behavior, manifested by intense cell division activity, the ability to form new blood vessels, and a tendency to invade surrounding tissues, with a common observation of frequently limited response to conventional oncological treatment. Furthermore, the combination of tumor aggressiveness with limited treatment options results in a low survival rate for patients, between 12 to 15 months. In this perspective, *Rubus sp.* (blackberry) has become the subject of studies as a therapeutic alternative for GBM treatment, considering its rich composition of bioactive compounds with well-described antioxidant and antineoplastic properties in other neoplasms. Thus, the present study aimed to investigate the potential antitumoral effects of blackberry methanolic extract regarding rat (C6) and human (U87) glioma cell lines. Cells from C6 and U87 glioma cell lines were exposed to blackberry methanolic extract at concentrations ranging from 125 to 2000 µg/mL for 24 h, 48 h, and/or 72 h. Cell viability and biomass were evaluated in cancer cell lines and primary culture of astrocytes. Additionally, parameters of oxidative stress, colony formation, cell proliferation, and migration, as well as interleukin 10 levels in the C6 cell line were assessed. Initially, no changes in viability or cell biomass were observed in cultures of healthy astrocytes exposed to blackberry extract, indicating its non-toxic nature. On the other hand, blackberry extract, for the C6 cell line, reduced cell viability and biomass from concentrations of 750 µg/mL and 500 µg/mL respectively, and for the U87 cell line, at concentrations of 125-2000 µg/mL. After 72 hours of treatment, a reduction in reactive species was observed in the C6 cell line at all tested concentrations, an increase in sulfhydryl content at concentrations of 1500 and 2000 µg/mL, as well as an elevation in the activity of the enzyme's glutathione S-transferase, superoxide dismutase, and catalase in the three highest concentrations. Regarding colony formation, a reduction in size and number was observed in C6 cells. Regarding cell migration, an attenuation was observed after 6 hours of treatment with 125 µg/mL of blackberry extract. Furthermore, a significant reduction in interleukin 10 levels was observed at all tested concentrations. Thus, blackberry extract emerges as a promising compound in the therapeutic approach to GBM.

Keywords: cancer; glioblastoma; blackberry; antioxidant.

Lista de Figuras

Figura 1	Microambiente tumoral do GBM.....	16
Figura 2	Amora-preta.	20
Figura 3	Resumo visual.....	51

Lista de abreviaturas e siglas

ARE	Elemento de resposta antioxidante
CAT	Catalase
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Gene do receptor de crescimento epidérmico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GBM	Glioblastoma
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
IDH	Isocitrato desidrogenase
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JAK-STAT3	Janus cinase e ativador da transcrição-3
Nrf2	Eritroide nuclear 2 relacionado ao fator 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TERT	Gene que codifica a transcriptase reversa da telomerase
TMZ	Temozolamida
TNF	Fator de necrose tumoral

Sumário

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Câncer.....	14
3.2 Gliomas.....	15
3.3 Estresse oxidativo e a progressão do glioblastoma.....	16
3.4 Diagnóstico e terapêuticas atuais.....	19
3.5 Amora-preta.....	19
4 MANUSCRITO	23
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53
Anexos.....	60
Anexo A – Carta de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) ..	61

1 INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GBM) é um tumor extremamente agressivo que afeta o sistema nervoso central (SNC). O GBM apresenta uma incidência mundial baixa, que, no entanto, cresce conforme o avançar da idade. Dentre as grandes problemáticas desse tipo de tumor destaca-se o prognóstico extremamente ruim e uma baixa taxa de sobrevivência, tornando-o um problema de saúde pública (Hanif *et al.*, 2017). O GBM é classificado, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), como um glioma astrocítico difuso IDH (isocitrato desidrogenase) - tipo selvagem e H3-tipo selvagem, de grau 4 (Chen; Han; Dahiya, 2022), devido a características como elevada atividade mitótica e capacidade de angiogênese, quimiorresistência, heterogeneidade e padrões infiltrativos (Uddin *et al.*, 2020).

A fisiopatologia do GBM é multifatorial e complexa, envolvendo parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios, bem como diferentes sistemas de sinalização cujas alterações ainda não são completamente elucidadas (Bona *et al.*, 2022). Dentre os sintomas descritos associados ao GBM estão a fraqueza, dormência e alterações na visão e fala, e em casos avançados da doença, são relatados disfunção executiva, alterações de humor, fadiga e perdas de memória especialmente devido a presença de tumores no lobo frontal e temporal (Alexander; Cloughesy, 2017).

Na atualidade, o GBM conta com uma abordagem terapêutica caracterizada pela ressecção cirúrgica máxima, quando plausível, seguido pelo tratamento com radioterapia combinado a utilização do quimioterápico temozolamida (TMZ). O TMZ atua induzindo alterações genéticas que ocasionam parada do ciclo celular e consequente apoptose das células tumorais, entretanto, diferentes vias moleculares podem promover o reparo das células cancerígenas e assim acarretando células resistentes ao fármaco (Tomar *et al.*, 2021). Além da quimiorresistência, outro desafio para o tratamento do GBM é o elevado custo envolvido na aplicação da terapia atual, tanto do fármaco referência quanto de versões genéricas do mesmo (Gu *et al.*, 2023).

Diante do exposto, torna-se evidente a importância da ampla investigação de novas alternativas terapêuticas para o GBM. Os benefícios para a saúde da prática do consumo regular de frutas e vegetais são populares, dada sua composição rica em nutrientes, características sensoriais e o potencial protetor de seus compostos

contra diversas doenças, incluindo diversos tipos de câncer (Cosme *et al.*, 2022). Neste contexto, destacam-se as frutas vermelhas, como *Rubus sp.* (amora-preta), que apresenta composição rica em variados fitoquímicos do tipo fenólico os quais lhe conferem elevada atividade biológica, em especial as antocianinas que são potentes antioxidantes responsáveis pela cor característica do fruto (Cosme *et al.*, 2022).

Diversos estudos já relataram o potencial antioxidante e anticancerígeno de compostos polifenólicos derivados de frutas, como o extrato de amora, via mecanismos epigenéticos no câncer colorretal humano (Tatar; Varedi; Naghibalhossaini, 2021), efeito antioxidante preventivo em danos associados à neuroinflamação (Soares *et al.*, 2021), e ainda como moduladores da resposta imune (Domínguez-avila *et al.*, 2022). Nesse contexto, um importante indicador analisado é o nível de espécies reativas de oxigênio (ERO), uma vez que já é conhecido seu papel na estabilidade celular, bem como a correlação entre a geração dessas espécies e a progressão tumoral. No GBM, a produção dessas espécies é alta e está correlacionada com alterações no ciclo celular, progressão tumoral e resistência a drogas (Olivier *et al.*, 2021).

Portanto, considerando as limitações terapêuticas para o tratamento do GBM e as promissoras propriedades dos polifenóis, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antitumoral do extrato metanólico de amora-preta frente às linhagens de glioma de rato (C6) e humana (U87), e o possível envolvimento do status redox.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito antitumoral e antioxidante do extrato metanólico de amora-preta em células de glioma de rato (C6) e humana (U87).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade citotóxica do extrato de amora-preta sobre cultivo primário de astrócitos mediante análise da viabilidade e biomassa celular;
- Avaliar a viabilidade e biomassa celular de linhagem de glioma de rato (C6) e humana (U87) tratadas com o extrato de amora-preta;
- Avaliar a atividade do extrato de amora-preta sobre a formação de colônias, migração e adesão celular em linhagem de glioma de rato (C6);
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo em linhagem de glioma de rato (C6) exposta ao extrato de amora-preta;
- Avaliação de marcador inflamatório em linhagem de glioma de rato (C6) exposta ao extrato de amora-preta.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer

Câncer, termo popularmente conhecido, compreende um conjunto de mais de 100 doenças, as quais apresentam como similaridade o crescimento desordenado de células que se difundem em outras partes do corpo e originam os tumores (Inca, 2022). Esse crescimento desordenado advém em resultado de fatores genéticos ou epigenéticos que provocam disfunção celular via alterações como as mutações genéticas hereditárias, exposição à radiação e até mesmo infecções virais. O conjunto de alterações desse tipo acarretará modificações nos processos de diferenciação e morte celular (Lewandowska *et al.*, 2019).

Recentemente, Brown *et al.* (2023) sugeriram um acréscimo a definição usualmente utilizada, e acima citada, para o termo câncer, sendo esta: “O câncer é uma doença de proliferação descontrolada por células transformadas sujeitas a evolução por seleção natural”. Ou seja, os autores sugerem que além do fator crescimento celular desordenado comumente relatado, outro fator de grande influência para o surgimento das neoplasias seriam as modificações celulares genéticas e epigenéticas que acarretam conjuntamente no fenótipo letal da doença (Brown *et al.*, 2023; Kulkarni *et al.*, 2023).

A incidência mundial do câncer encontra-se em significativa elevação de acordo com estimativas publicadas pela OMS. Para o ano de 2040 estimam-se 28,4 milhões de novos casos, um aumento de quase 50% em relação ao ano de 2020 (Sung *et al.*, 2021). A probabilidade de exacerbada elevação de casos e do índice de mortalidade são atribuídas fortemente a transições demográficas, com o aumento da expectativa de vida, e epidemiológicas, com a redução de mortes por doenças infecciosas e crescimento por doenças crônicas (Wild; Weiderpass; Stewart, 2020).

Tendo em vista a agressividade das diferentes neoplasias existentes, bem como a elevação do número de casos, se fez necessária a implementação de um conjunto de ações a nível governamental voltadas para o seu controle e atenuação, sendo algumas dessas, o controle de exposição a fatores de risco, diagnóstico precoce, terapêuticas paliativas e curativas (Inca, 2022). A vigência de forma eficiente de tais medidas é visualizada em países com alto índice de desenvolvimento humano, entretanto países em baixo e médio desenvolvimento

carecem de uma melhor utilização de recursos para o estabelecimento eficaz de tais medidas (Inca, 2022).

As neoplasias podem ser classificadas de acordo com a região de crescimento tumoral, no presente trabalho destaca-se as neoplasias do SNC, em especial os gliomas de alto grau. A incidência dos gliomas varia de acordo com a idade, sexo, raça e região geográfica, e segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a estimativa de novos casos para cada ano de 2023 a 2025, no Brasil, é de 6.110 casos em homens e 5.380 em mulheres ou, 5,80 novos casos em homens e 4,85 em mulheres a cada 100 mil habitantes (Inca, 2022). Apesar da baixa incidência dessa classe de câncer, o índice de mortalidade de pacientes acometidos por gliomas de alto grau, é elevado, o que é indicativo de um prognóstico demasiadamente negativo (Hanif *et al.*, 2017).

3.2 Gliomas

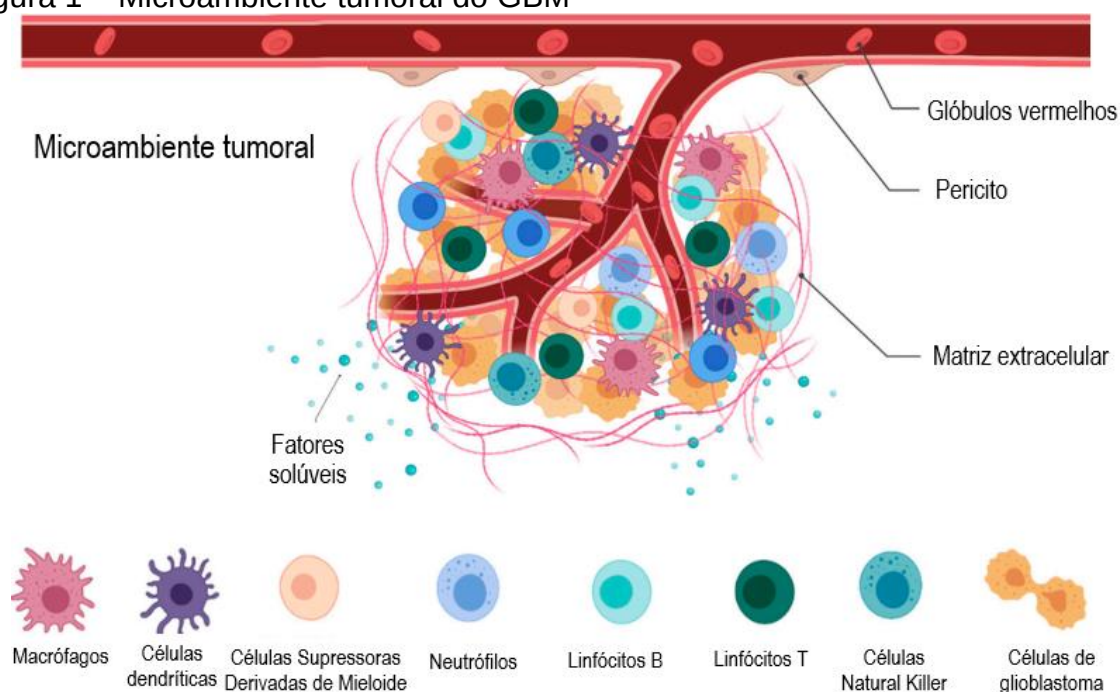
A OMS classifica as neoplasias do SNC em grupos, e um deles abrange os gliomas, tumores glioneuronais e neuronais. Dentro desse conjunto, os gliomas são os tumores primários mais comuns no SNC. Até a 4ª edição da classificação dos tumores, publicada no ano de 2016, a OMS classificava os gliomas histologicamente, baseando-se nas semelhanças morfológicas das células tumorais com células gliais não neoplásicas e a presença de características arquitetônicas determinadas (Riemenschneider *et al.*, 2010). Com a publicação da 5ª edição, em 2021, da classificação dos tumores, os gliomas sofreram alterações conceituais, pois novas descobertas possibilitaram o aperfeiçoamento dessa classificação com base em modificações moleculares (Whitfield; Huse, 2022). Sendo assim, atualmente, os gliomas se diferenciam de acordo com a faixa etária (em glioma difuso tipo-pediátrico ou tipo-adulto), padrão de crescimento (em difuso ou circunscrito) e grau de malignidade (de 1 a 4) segundo as alterações genéticas exibidas pelo paciente (Osborn *et al.*, 2022).

O GBM pertence a classe dos gliomas difusos do tipo-adulto, destacando-se como biomarcador molecular fundamental a mutação tipo selvagem da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) (Stewart *et al.*, 2022). Um tumor para ser caracterizado como IDH-tipo selvagem deve apresentar ao menos um dos seguintes critérios: (1) proliferação microvascular, (2) necrose, (3) mutação do promotor do gene que codifica a transcriptase reversa da telomerase (TERT) (4) amplificação do

gene do receptor de crescimento epidérmico (EGFR) ou (5) modificação numérica de cópias cromossômicas +7/-10. Portanto, a presença de qualquer um dos critérios acima citados, classifica um glioma astrocítico difuso como GBM (Osborn *et al.*, 2022).

O microambiente tumoral do GBM é caracterizado por inúmeras mutações e composto por uma população heterogênea de células (Figura 1), sendo essas, células estromais, células imunes, moléculas sinalizadoras e a matriz extracelular circundante (Schiffer *et al.*, 2019; Dapash *et al.*, 2021). Ainda, destaca-se o dano oxidativo, o que influi em alterações bioquímicas e moleculares substanciais para o desenvolvimento e progressão do tumor, uma vez que o SNC apresenta elevada atividade metabólica e é especialmente vulnerável aos danos causados pelos radicais livres (Ramírez-Expósito; Martínez-Martos, 2019).

Figura 1 – Microambiente tumoral do GBM



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

3.3 Estresse oxidativo e a progressão do glioblastoma

O estresse oxidativo se caracteriza como “um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular” (Sies, 2020). Tais compostos são correlacionados especialmente ao desenvolvimento e progressão de neoplasias,

uma vez que exercem efeito deletério a funcionalidade do DNA, promovem oxidação de proteínas, bem como, peroxidação lipídica das membranas celulares e estimulação de mutações genéticas (Ramírez-Expósito; Martínez-Martos, 2019).

Os compostos pró-oxidantes são moléculas instáveis e altamente reativas devido a presença de elétrons desemparelhados em sua estrutura. As espécies mais relatadas são, (1) espécies reativas de oxigênio (ERO) e (2) espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais podem ser provenientes de exposição à radiação UV, subprodutos de reações catalisadas por metais, geradas por células do sistema imune em um estado inflamatório, dentre outros (Valko *et al.*, 2006). Esses compostos apresentam dualidade de função a variar de acordo com sua concentração, em baixas concentrações exercem papel protetivo frente a ocorrência de infecções, entretanto quando em elevadas concentrações, como acima citado, atuam de forma deletéria frente ao sistema biológico (Neha *et al.*, 2019).

Dessa forma, a fim de evitar uma concentração exacerbada de ERO/ERN, existem os antioxidantes endógenos, enzimáticos ou não enzimáticos, e também os exógenos, ambos de suma importância para preservação do correto funcionamento celular. O sistema antioxidante enzimático endógeno é constituído, sobretudo, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), enquanto o não enzimático por compostos como, ácido lipóico, glutathione e bilirrubina (Neha *et al.*, 2019). Os antioxidantes exógenos são provenientes da dieta alimentar ou suplementação específica, como exemplo, os compostos polifenólicos, o licopeno, a curcumina, chás, entre outros (Baek; Lee, 2016).

No GBM o nível de ERO se encontra elevado, sendo evidenciadas como importantes influenciadoras na progressão tumoral, visto sua correlação com a proliferação, diferenciação e morte celular (Salazar-Ramiro *et al.*, 2016). Para uma melhor compreensão do impacto dessas espécies no ambiente tumoral e na progressão do glioma, são utilizadas diferentes linhagens celulares, cada qual com suas limitações. A correta escolha de linhagem celular nos testes iniciais é vital para o avanço da pesquisa e geração de dados confiáveis, que se reproduzam em ensaios clínicos (Giakoumettis; Kritis; Foroglou, 2018).

A linhagem celular de câncer C6, proveniente de gliomas de ratos, é altamente utilizada em modelos experimentais visto sua capacidade de similar características do GBM humano, como, elevada taxa de crescimento, de vascularização e capacidade infiltrativa (Giakoumettis; Kritis; Foroglou, 2018).

Estudos *in vitro* que utilizaram essa linhagem celular demonstraram a alteração de marcadores de estresse oxidativo, como, elevação do teor de ERO, redução do teor de sulfidrilas e nitritos, bem como, redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e glutathione S-transferase (GST) (Bona *et al.*, 2019).

Outra linhagem comumente utilizada em estudos *in vitro*, é a linhagem celular de glioma humano U87, a qual exibe elevada capacidade migratória e invasiva. Essa linhagem apresenta alterações em parâmetros de estresse oxidativo já descritos na literatura, como por Feng *et al.* (2016), em seu estudo *in vitro*, onde observaram elevação do nível de ERO e malonaldeído, indicador de peroxidação lipídica, e redução na expressão de isoformas da enzima SOD (Feng *et al.*, 2016).

Ademais, na literatura, já foram documentadas variações nos parâmetros oxidativos em indivíduos acometidos pelo GBM. Em estudo, conduzido por Arslan *et al.* (2011), foram observadas alterações na atividade das enzimas CAT e anidrase carbônica em pacientes com gliomas malignos. No mesmo estudo, a presença de níveis reduzidos de CAT e elevados de anidrase carbônica foram correlacionados a uma maior incidência desses tumores (Arslan *et al.*, 2011).

Vujotić *et al.* (2020), em seu estudo com indivíduos portadores de tumor cerebral e hidrocefalia, também destacaram a presença de estresse oxidativo como fator de grande influência no desenvolvimento das patologias. Isso foi evidenciado pela elevação na atividade das enzimas SOD e nos níveis de glutathione (GSH), juntamente com uma redução na atividade de CAT, GST e na concentração de grupos sulfidrilas (Vujotić *et al.*, 2020).

Nesse contexto, é relevante destacar a associação entre o estado inflamatório crônico e o desenvolvimento de neoplasias. A inflamação é caracterizada como uma resposta de defesa do organismo a danos, como infecções ou lesões. Durante esse processo, ocorre a liberação excessiva de ERO/ERN, as quais podem causar prejuízo ao DNA e outras proteínas, conforme mencionado anteriormente (Murata, 2018). Além das espécies reativas, outras moléculas mediadoras da inflamação estão envolvidas na progressão das neoplasias, como as citocinas. A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina produzida em abundância pelo sistema imunológico, apresentando função imunossupressora, favorecendo a proliferação de células tumorais e a metástase através do bloqueio da atividade do fator de necrose tumoral (TNF), IL-2 e IL-12 (Khandia; Munjal, 2020). Logo, ao ponderarmos a significativa implicação dos parâmetros de estresse oxidativo extensivamente relatadas no GBM,

é de grande valia considerar esses indicadores como alvos nas inovações terapêuticas em desenvolvimento.

3.4 Diagnóstico e terapêuticas atuais

O diagnóstico do GBM é realizado por meio da identificação de aspectos clínicos, sendo esses decorrentes da falha de atividades exercidas pela área do cérebro atingida, variando de fraqueza, fadiga, alterações na fala e visão, até perdas de memória e quadros convulsivos, em conjunto a exames de imagem (Alexander; Cloughesy, 2017). As imagens, obtidas por ressonância magnética, permitem a identificação do local e tamanho do crescimento tumoral, bem como, auxiliam na escolha da abordagem terapêutica. Ademais, relatos recentes sugerem o diagnóstico precoce via biomarcadores não invasivos, como os RNAs circulares derivados de vesículas extracelulares séricas (Stella *et al.*, 2021), os quais encontram-se ainda em investigação.

Atualmente, o GBM conta com uma abordagem terapêutica multimodal, incluindo ressecção cirúrgica, aplicação de radioterapia e quimioterapia com a utilização do fármaco TMZ, o qual apresenta natureza lipofílica permitindo a sua passagem facilitada pela barreira cérebro-sangue, entretanto essa neoplasia ainda não apresenta um tratamento curativo (Mohile *et al.*, 2022). Ainda, o tratamento convencional muitas vezes se torna ineficaz, visto que o GBM comumente adquire resistência ao TMZ devido à alteração na expressão de proteínas alquilantes, enzimas de reparo do DNA e em vias de sinalização celular, envolvidas na proliferação, migração e morte celular (Lohitesh *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2022). A associação de sua agressividade junto a limitação terapêutica culmina em uma baixa taxa de sobrevida, em torno de 5,5% em cinco anos (Uddin *et al.*, 2020). Além disso, o TMZ não afeta somente as células cancerígenas, apresentando também efeitos deletérios para as células saudáveis do SNC. A mielotoxicidade é um efeito secundário a terapia, sendo essa uma toxicidade hematológica de elevada letalidade (Robins *et al.*, 2019), além de apresentações clínicas como náusea e fadiga (Whitelaw, 2019).

3.5 Amora-preta

Há mais de três décadas o campo de pesquisa das propriedades medicinais das plantas está em crescimento (Corrêa *et al.*, 2014), de modo que a utilização de

medicamentos derivados de produtos naturais para o tratamento de neoplasias já é copiosamente explorada (Newman; Cragg, 2020). Alguns quimioterápicos a base de plantas já são utilizados comercialmente, dentre esses: (a) Paclitaxel, obtido a partir da casca do Teixo, empregado para o tratamento do câncer de mama (Samaan *et al.*, 2019); (b) Etoposídeo, um fármaco semissintético sintetizado a partir da podofilotoxina obtida da resina da planta *Podophyllum peltatum*, usual no tratamento de câncer de pulmão (Bailly, 2023); e (c) Vimblastina, alcaloide proveniente das partes aéreas de *Catharanthus roseus*, amplamente utilizado (Haque *et al.*, 2018).

Nesse contexto, estudos epidemiológicos relatam um efeito protetor do consumo de frutas vermelhas na incidência de doenças crônicas, incluindo diversos tipos de câncer (Cosme *et al.*, 2022; Manganaris *et al.*, 2013), efeito relacionado à alta carga de compostos antioxidantes presentes nestas frutas, especialmente e em maior concentração os compostos fenólicos, tais como taninos, ácidos fenólicos e antocianinas (Cosme *et al.*, 2022).

A amora-preta pertencente ao gênero *Rubus sp.* da família Rosacea (Figura 2), é um exemplo conhecido do grupo dos frutos vermelhos (Raseira *et al.*, 2022). A composição do extrato metanólico desse fruto foi analisada por Chaves *et al.* (2020), através da determinação fitoquímica dos compostos bioativos, sendo esses, conteúdo fenólico total e conteúdo total de antocianinas, obtendo-se respectivamente os valores de 111,53 mg e 10,56 mg por grama de extrato seco. Ainda, identificaram-se quatro fragmentos de antocianinas, as quais foram cianidina-O-galactosídeo, cianidina-O-glucosídeo, cianidina-O-rutinosídeo, pelargonidina-O-glicosídeo e cianidina-O-malonilhexosídeo (Chaves *et al.*, 2020).

Figura 2 – Amora-preta



Fonte: Raseira *et al.*, 2022.

Os frutos da amora-preta são comercializados, e cada vez mais consumidos, em sua forma fresca e processada (Diaconeasa *et al.*, 2019). Ademais, extratos dos frutos da amora-preta têm sido extensivamente exploradas quanto a seus potenciais farmacológicos, dentre os quais já foram evidenciados potencial antioxidante e anticolinesterásico (Mello *et al.*, 2023), anticancerígeno (Kristo; Klimis-Zacas; Sikalidis, 2016) e anti-inflamatório (Velde *et al.*, 2019). Tais propriedades, em especial a antioxidante, apresentam caráter protetivo frente a ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como os gliomas, visto a correlação entre o estado de estresse oxidativo com o surgimento e progressão dessas doenças (Borjan *et al.*, 2020).

À vista disso, encontra-se fomentado o campo de pesquisa para a elucidação dos mecanismos de ação pelos quais a amora-preta, bem como seus constituintes, promovem efeitos biológicos desfavoráveis a ocorrência e progressão de patologias. Diferentes autores referenciam a relação entre as atividades biológicas dos compostos fenólicos e a redução de ERO, via modulação positiva das enzimas antioxidantes SOD e CAT (Yahfoufi *et al.*, 2018), efeito sequestrante de radicais livres (Antonijević *et al.*, 2022), capacidade quelante de íons metálicos (Žurek *et al.*, 2022), bem como, a modulação de fatores de transcrição como o Nrf2 (Shahcheraghi *et al.*, 2022).

Recentemente, Gil-Martínez *et al.* (2023) relataram os diferentes potenciais do extrato de amora-preta em seu estudo *in vitro*, apontando elevada capacidade antioxidante em células endoteliais, potencial antimicrobiano e anti-inflamatório, além de, atividade antiproliferativa contra diferentes linhagens celulares de carcinoma colorretal (Gil-Martínez *et al.*, 2023). Consoante a tal, Chaves *et al.* (2020) relataram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do extrato de amora, e ainda propriedades neuroprotetoras, em seu modelo *in vivo* de mania induzida por cetamina. Ademais, em modelo *in vitro* Sánchez-Velázquez *et al.* (2020) descreveram a atividade antiglioma de frações enriquecidas de antocianinas provenientes de amoras, entretanto a literatura que relaciona o extrato desse fruto a modelos de GBM ainda é escassa.

Nesse cenário, uma característica de grande relevância sobre os compostos fenólicos crescentemente relatada em modelos experimentais, é a capacidade dos mesmos de atravessar a barreira cérebro-sangue e exercerem atividades neuroprotetoras (Rashid *et al.*, 2014; Velásquez-Jiménez *et al.*, 2021). Sendo que

algumas moléculas apresentam a capacidade de permear a barreira cérebro-sangue em sua forma íntegra, enquanto outras geram derivados que apresentam atividades biológicas (Figueira *et al.*, 2017).

Por fim, é pertinente destacar que o grande interesse na geração e exploração de produtos naturais como possíveis terapêuticas antineoplásicas também se fundamenta em sua elevada acessibilidade e reduzida citotoxicidade (Hashem *et al.*, 2022). No contexto deste trabalho, em particular, destaca-se o baixo potencial citotóxico dos extratos de frutas vermelhas e de seus compostos majoritários em células cerebrais saudáveis, conforme evidenciado em estudos *in vitro* conduzidos por nosso grupo de pesquisa (Bona *et al.*, 2019; Da Silveira *et al.*, 2021). Diante do exposto, torna-se evidente a importância da investigação do potencial antitumoral e antioxidante do extrato de amora-preta frente ao GBM.

4 MANUSCRITO

Os resultados incluídos nesta dissertação são apresentados na forma de manuscrito. Os elementos Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências do manuscrito seguem a estrutura conforme as normas da revista à qual foi submetido: *Metabolic Brain Disease*.

Cytotoxic, anti-proliferative and selective effect of *Rubus sp.* extract on C6 rat and U87 human glioma cell line

Larissa Menezes da Silveira¹, Nathalia Stark Pedra², Natália Pontes Bona¹, Juliane Torchelsen Saraiva¹, Julia Eisenhardt de Mello²; Júlia Araújo da Silva¹; Giulia Bueno de Oliveira da Silva¹; Roselia Maria Spanevello², Mayara Sandrielly Soares de Aguiar¹, Francieli Moro Stefanello^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

²Laboratório 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, CEP: 96010-900. Phone: 55 53 32757355, Fax: 55 53 32757354, E-mail: fmstefanello@gmail.com and francieli.stefanello@ufpel.edu.br

Orcid

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

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

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

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

Julia Eisenhardt de Mello: <https://orcid.org/0009-0002-1461-7063>

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

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

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

Mayara Sandrielly Soares de Aguiar: <https://orcid.org/0000-0002-2181-3591>

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

Author Contributions

Larissa Menezes da Silveira: Cells treatment, biochemical analysis, statistical analysis, results interpretation, discussion, and manuscript preparation.

Nathalia Stark Pedra: Astrocytes treatment and biochemical analysis.

Natália Pontes Bona: Astrocytes and C6 treatment, and biochemical analysis.

Juliane Torchelsen Saraiva: C6 treatment and biochemical analysis.

Julia Eisenhardt de Mello: Measurement of IL-10.

Júlia Araújo da Silva and Giulia Bueno de Oliveira da Silva: U87 treatment and biochemical analysis.

Roselia Maria Spanevello, Mayara Sandrielly Soares de Aguiar and Francieli Moro Stefanello: Experimental design, results interpretation and manuscript preparation.

Funding: This study did not receive specific funding. The general funding was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES – Finance Code 001).

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

Availability of data and material: Not applicable.

Code availability: Not applicable.

Ethics approval: All procedures involving animal models were approved by the Animal Ethics and Experimentation Committee of the Federal University of Pelotas (UFPel) under protocol number CEEA (31292-2018). The protocols complied with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA), per the expectations described by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Abstract

Glioblastoma is the most aggressive neoplasm that affects the central nervous system, presenting therapeutic limitations due to resistance to common medications. Therefore, the search for therapeutic alternatives is necessary. In this study, we focused on the therapeutic potential of methanolic blackberry extract (*Rubus sp.*) against rat C6 and human U87 glioma cell lines, given the antioxidant and antitumor capacity of this fruit extract already described against other neoplasms. Furthermore, we evaluated the effect of the extract against the primary culture of astrocytes. Cells were exposed to blackberry extract at 125 to 2.000 µg/mL concentrations for 4, 6, 24, 48, or 72h. Then, cell viability and biomass, cell migration, colony formation, interleukin levels, and oxidative stress were evaluated. Our results demonstrated the selective cytotoxic effect of blackberry extract, reducing the viability and biomass in both glioma lines, without effects against the primary culture of astrocytes. The level of reactive oxygen species was significantly reduced in all concentrations tested, and in parallel, an increase in the activity of the antioxidant enzymes glutathione-s-transferase, superoxide dismutase, and catalase was observed. Furthermore, we observed that the treatment reduced the capacity for cell migration, formation, and growth of tumor colonies, and the levels of interleukin-10. Based on our data, we can suggest the antitumorigenic potential of blackberry extract and thus encourage the field of research for future studies using *in vivo* models of glioma.

Keywords: Cancer; Glioblastoma; Red fruits; Antioxidant.

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is an extremely aggressive tumor that affects the central nervous system (CNS) classified as a diffuse, astrocytic glioma IDH-wildtype and H3-wildtype, grade IV (Chen et al. 2022). This cancer has a low survival rate, of 5.5% at five years, due to its high mitotic activity and capacity for angiogenesis, chemoresistance, heterogeneity, and infiltrative patterns, which culminate in a poor prognosis (Uddin et al. 2022). The pathophysiology of GBM is multifactorial, involving oxidative stress and inflammation markers with the involvement of several signaling systems (Bona et al. 2022). Currently, this disease has a multimodal therapeutic approach, including surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy using temozolomide (TMZ). However, the effectiveness of such measures is low, since resistance to TMZ is common, correlated to enzymatic changes, cell cycle advancement, and apoptosis processes, as well as causing a variety of side effects (Ou et al. 2021).

Reactive oxygen species (ROS) is an important biomarker study in the GBM context, since its role in cell stability is already known, as well as the correlation between the generation of these species and tumor progression. In GBM the production of ROS is high and is correlated with alterations in the cell cycle, tumor progression, and drug resistance (Olivier et al. 2021). So, confronted by the myriad challenges of the GBM, in association with high ROS levels, new therapeutic alternatives have been widely investigated, especially compounds with selective cytotoxic effects on tumor cells.

The benefits, and practice, of regular fruit consumption for health, are popular, given their nutrient-rich composition, sensory characteristics, and the protective potential of their compounds against different diseases. In this context, stand-out red fruits, among these, the blackberries (*Rubus sp.*) are known to be rich in different bioactive compounds, especially polyphenols (Cosme et al. 2022). Many researchers have reported the antioxidant and anticancer potential of polyphenolic compounds fruit-derived, like as blackberry extract, via epigenetic mechanisms in human colorectal cancer (Tatar et al. 2021), preventive antioxidant effect in damage associated with neuroinflammation (Soares et al. 2021), and have been described as immune response modulators (Domínguez-Avila et al. 2022).

Therefore, considering the therapeutic limitations for the treatment of GBM and the properties of polyphenols, the aim of this study was to investigate the antitumor potential of a methanolic blackberry extract against C6 rat and U87 human, glioma cells and evaluate some inflammatory parameters associated with oxidative stress.

2. Material and Methods

2.1 Blackberry extract

Blackberries (*Rubus sp.*) were obtained from the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA), located in the Pelotas/RS (31°40' ° 47"S and 52°26' 24"W). After collection, the fruits were stored at -20 °C until extraction. The extract was prepared as described in Chaves et al. (2020). Briefly, frozen fruits were sonicated for 60 min at room temperature in methanol. Following extraction, the samples were filtered and placed in a freezer for 24h, after the methanol was removed by rotary evaporation, and the subject product was lyophilized.

2.2 Animals and ethical procedures

Wistar rats were obtained from the Central Animal House of UFPel, and our protocols complied with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA), which is by the expectations described by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). All procedures involving animal models were approved by the Animal Ethics and Experimentation Committee of the Federal University of Pelotas (UFPel) under protocol number CEEA (31292-2018).

2.3 Cell culture

C6 rat (CCL-107) and U87MG human (HTB-14) glioma cells 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 penicillin/streptomycin (100 U/L), fungizone (0.1%), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ (Bona et al. 2019). To perform a primary astrocyte culture, the cerebral cortex of male neonatal Wistar rats was removed and the astrocytes were isolated (Gottfried et al. 1999; Pedra et al. 2018; Bona et al. 2019). Astrocytes were seeded at a density of 3×10^4 cells per well in 96-well plates and incubated in a CO₂ incubator for 4 h, after which the medium was changed. Medium changes were performed every 5 days until cell maturation (15-20 days) and all cells were grown under controlled conditions at 37 °C, in 5% CO₂ and appropriate humidity (Gottfried et al. 1999; Pedra et al. 2018; Bona et al. 2019).

2.4 Blackberry extract treatments

The blackberry extract was dissolved in sterile water at a concentration of 10 mg/mL (stock solution) and then diluted in DMEM with 10% FBS to produce a series of concentrations, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, and 2000 µg/mL. C6 glioma cells were seeded at a density of 5×10^3 cells in 96-well plates, 2×10^4 cells in 24-

well plates, 2×10^4 cells in 12-well plates, and 3×10^5 cells in 6-well plates for analysis of cytotoxicity, clonogenicity, cell migration, and oxidative stress parameters, respectively. U87 glioma cells were seeded at a density of 5×10^3 cells in 96-well plates for analysis of cytotoxicity. Astrocytes were seeded in 96-well plates and cell cultures were treated with blackberry extract (500-2000 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h. Cells exposed to the DMEM medium were used as the control.

2.5 Viability assay

Cell viability was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as previously humidity (Gottfried et al. 1999; Pedra et al. 2018; Bona et al. 2019). Cell biomass was determined using the sulforhodamine B (SRB) assay as previously described (Pauwels et al. 2003).

2.6 Oxidative stress parameters

2.6.1 Protein determination

Protein levels were measured using the Lowry et al. (1951) method and a bovine serum albumin standard.

2.6.2 Reactive oxygen species (ROS) assay

This method is based on the oxidation of 2,7-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) to dichlorofluorescein (DCF), as described by Ali et al. (1992), using intact cells. The results are expressed as a percentage of the control value.

2.6.3 Sulfhydryl (SH) content total

Sulfhydryl content was determined as described by Aksenov and Markesbery (2001) using 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). In the presence of thiols, DTNB is reduced, forming an oxidized disulfide and the yellow derivative TNB. The results are expressed as a percentage of the control value.

2.6.4 Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was analyzed in serum samples using 1- chloro- 2,4- dinitrobenzene (CDNB) as a substrate, as previously described by Habig et al. (1974). GST activity was expressed as a percentage of the control value.

2.6.5 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined by evaluating the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation (Misra and Fridovich 1972). The results are reported as a percentage of the control.

2.6.6 Catalase (CAT) activity

This method is based on the ability of CAT to decompose H_2O_2 , which was monitored for 3 min (Aebi 1984). CAT activity was expressed as a percentage of the control value.

2.7 Clonogenic assays

This cell survival assay is based on the ability of a single cell to grow in colonies. After 72 h of treatment with blackberry extract (2000 $\mu\text{g/mL}$), individual C6 glioma cells were kept in a CO_2 incubator for more than 10 days in the absence of treatment. After incubation, cells were fixed with chilled absolute methanol and stained with 1% crystal violet to view the colonies. The number and size of the colonies were evaluated using an optical microscope (40x) and ImageJ 1.51j8 software (National Institute of Health, USA), respectively (Franken et al. 2006).

2.8 Cell migration

This method is based on the observation of cell migration after the creation of a new artificial gap in a monolayer of confluent cells. At the edge of the newly created gap, cells move towards the opening to close the gap and produce new cell-cell contacts (Kaczmarek et al. 2005). Cultures of C6 glioma cells were washed with PBS to remove residues, and the cells were treated with blackberry extract (125 and 500 $\mu\text{g/mL}$). Pictures were taken at times of 0, 4, 6, and 24 h to observe slit closure. Quantitative analysis of the cell-free slit was performed using ImageJ 1.51j8 software (National Institutes of Health, USA), and the inhibition of cell migration was expressed as a percentage of these values.

2.8 Determination of Interleukin 10 (IL-10) levels

IL-10 levels were determined in the supernatant using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as pg/mL .

2.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) from at least three independent experiments performed in triplicate.

3. Results

3.1 Blackberry extract selectively decreases the biomass and viability of C6 glioma cells

A reduction in the viability of C6 glioma cells treated with blackberry extract was observed after 72 h of exposure at concentrations of 750, 1000, 1500, and 2000 $\mu\text{g/mL}$, 11.72%, 13.93%, 27.18%, and 37.26% respectively ($P < 0.05$, Fig. 1). Uniformly, treatment with blackberry extract reduced the biomass of C6 glioma cells after 48 h of exposure at concentrations of 500 to 2000 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$), 18.57%, 17.59%, 17.22%, 30.37%, and 35.03% respectively, and after 72h at concentrations of 1500 and 2000 $\mu\text{g/mL}$ in 19.29% and 46.17% when compared to the control ($P < 0.05$, Fig. 1).

Furthermore, blackberry extract demonstrated selective activity since it did not affect the viability and biomass of primary astrocytes (Fig. 2).

3.2 Blackberry extract antioxidant effect in C6 glioma cells

There was a significant reduction in ROS production in C6 glioma cells following a 72h exposure to blackberry extracts at concentrations of 500-2000 $\mu\text{g/mL}$, 52.86%, 46.55%, 56.39%, 49.59%, and 56.96% respectively when compared with the control ($P < 0.05$, Fig. 3a). Additionally, there was a significant increase in total sulfhydryl levels at concentrations of 1500 and 2000 $\mu\text{g/mL}$, 75.62% and 117.62% respectively when compared with the control ($P < 0.05$, Fig. 3b).

As regards enzymatic activity, we observed a significant increase in GST activity of 100.8%, 110.4%, and 173.4%, at concentrations of 1000, 1500, and 2000 $\mu\text{g/mL}$ of blackberry extract following a 72h exposure ($P < 0.05$, Fig. 3c). Also, in SOD of 27.36%, 34.71% and 103.7%, at concentrations of 1000, 1500 and 2000 $\mu\text{g/mL}$ of blackberry extract ($P < 0.05$, Fig. 3d), CAT activity was elevated at 203.4%, 192.2%, and 181.9%, in blackberry extract concentrations of 1000, 1500, and 2000 $\mu\text{g/mL}$ respectively when compared to the control ($P < 0.05$, Fig. 3e).

3.3 Blackberry extract reduces C6 glioma cell colony formation and size

As shown in Fig. 4, exposure of C6 glioma cells to blackberry extract in the concentration of 2000 µg/mL for 72h reduced colony formation by 81.6% ($P < 0.05$), and colony size was 55.31% ($P < 0.0001$) smaller, compared with the control group (Fig. 4).

3.4 C6 cells demonstrated reduced migration capacity in response to treatment with blackberry extracts

The results obtained in the cell migration assay demonstrate the changes in wound healing in the control and treatment of concentration 125 µg/mL (non-cytotoxic concentration) blackberry extract groups. The control group demonstrated a 9.80%, 25.54%, and 82.42% closure at 4, 6, and 24h respectively, at the same time point the treatment group demonstrated only 1.86%, 5.35%, and 62.8% close. The blackberry extract reduced the migration capacity of C6 cells at 6h and 24h ($P < 0.001$) compared to the control cells (Fig. 5).

3.6 Blackberry extract decreases the IL-10 levels

There was a significant reduction in the levels of IL-10 in C6 glioma cells after 72h exposure to blackberry extract at concentrations of 500, 750, 1000, 1500, and 2000 µg/mL, in 20.88%, 14.77%, 16.83%, 20.30%, and 17.08% respectively when compared with the control cells ($P < 0.05$, Fig.6).

3.5 Blackberry extract decreases the biomass and viability of U87 human glioma cells

A reduction in viability and cell biomass of U87 glioma cells treated with blackberry extract was observed after 72h of exposure at all concentrations, 125 to 2000 µg/mL ($P < 0.05$), for viability in 30.36%, 35.39%, 42.87%, 52.17%, 56.65%, 54.55%, and 55.56%, and for cell biomass in 26.25%, 27.11%, 29.01%, 30.29%, 35.92%, 48.97%, and 53.58%, respectively when compared to the control ($P < 0.05$, Fig. 7).

4. Discussion

The GBM is one of the most malignant and aggressive tumors of the central nervous system, which makes it a tumor with a limitation and resistance to conventional treatments (Schaff and Mellinghoff 2023). This study was drawn to investigate the therapeutic potential of crude methanolic blackberry extract for GBM. This extract was previously characterized by Chaves et al. (2020), which demonstrated high levels of total phenolics and anthocyanins, respectively 111.53 mg and 10.56 mg per gram of dry extract. For anthocyanins, five

fragments were identified, which were cyanidin-O-galactoside, cyanidin-O-glucoside, cyanidin-O-rutinoside, pelargonidin-O-glucoside, and cyanidin-O- malonylhexoside (Chaves et al. 2020).

The applicability of anthocyanins for medicinal purposes has been copiously explored, as this is a class of substances with promising activities for the prevention and control of neoplasms (Chen et al. 2021). Wang et al. (2019) reported the inverse correlation between the consumption of anthocyanins and the risk of developing colorectal cancer, given the properties of the compound, such as antioxidant, ability to interfere with the cell cycle and consequent induction of cell death by apoptosis, as well as indicative of autophagy induction.

Accordingly, our first results demonstrated the potential of blackberry extract in reducing the viability and biomass of C6 cells, both indicative of cell damage. These results can be correlated to the rich composition of the extract in phenolic compounds as mentioned above (Chaves et al. 2020), and the high presence of anthocyanins, which have already described different antineoplastic activities (Wang et al. 2019; Cosme et al. 2022). Furthermore, in an *in vitro* model Sánchez-Velázquez et al. (2020) described the antiglioma activity of anthocyanin-enriched fractions from blackberries, however, the literature relating the crude extract of this fruit to GBM models is still scarce.

Considering the correlation between redox status and tumor establishment and progression, some parameters of oxidative stress were measured. We observed that the blackberry extract was able to reduce ROS levels at all concentrations tested, this is an important indicator since high levels of these species can generate different types of complications, in particular, their association with development and tumor progression due to the detrimental effect on DNA functionality (Storz 2005). In GBM, the production of these species is high and is correlated with alterations in the cell cycle, disease evolution, and drug resistance (Olivier et al. 2021).

Still, an increase was observed in the groups with the highest concentration of treatment in the total content of sulfhydryl, as well as in the activity of the enzymes GST, SOD, and CAT. The elevation of antioxidant enzymes such as SOD and CAT is of great interest, since they act together in the inactivation of superoxide and hydrogen peroxide radicals, since the SOD enzyme is responsible for the dismutation of superoxide anion into hydrogen peroxide and oxygen, and CAT catalyzes the conversion of hydrogen peroxide into water and oxygen (Cheng et al. 2021). In agreement with the results found, Yahfoufi et al (2018) reported the ability of phenolic compounds to reduce ROS levels via positive modulation of SOD and CAT antioxidant enzymes.

The expression of the mentioned enzymes can be modulated by the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element (ARE) pathway, in a state of oxidative stress, this pathway is activated, which will

promote an increase in the activity of antioxidant enzymes, such as SOD, CAT, and GST (Kuhn et al. 2011). It has already been described that anthocyanins enhance the activation of such endogenous stress protection factors (Garcia and Blesso 2021), so the results demonstrated here may be correlated to the rich composition of blackberry extract in such compounds.

Aiming to deepen the knowledge of the cytotoxic effect of the extract, we performed the clonogenic assay test, an indicator often used to quantify the capacity for cell survival and colony formation (Brix et al. 2020). The treatment caused a marked reduction in the number and size of C6 colonies compared to the control group, corroborating the results found in the previously mentioned tests and confirming the antineoplastic potential of the blackberry extract.

Continuously the cell migration assay showed promising results, as the blackberry extract was able to significantly reduce the migration of cancer cells when compared to the control group. This result is of great relevance since the malignancy of GBM is associated with its high invasive and consequently migratory capacity. Our results corroborate previous studies that have already demonstrated the promising effect of different phenolic compounds in reducing cell migration (Bona et al. 2019; Tsakiroglou et al. 2019).

Polyphenols correlate with the expression of matrix metalloproteinases (MMPs), a family of enzymes that degrade the extracellular matrix. In GBM, MMPs present an abnormal expression, which worsens the invasive and migratory capacity of cancer cells (Beylerli et al. 2022). The literature already addresses the effect of polyphenols on MMPs in cancer models, where the inhibition of enzymes belonging to this family is observed and the consequent reduction of cell migratory capacity to other tissues is associated with a possible antimetastatic effect of these compounds (Katiyar 2006; Wang et al. 2018).

Furthermore, IL-10 levels were measured in the supernatant of C6 cells exposed to blackberry extract, where a marked reduction was observed in all treatments. IL-10 is an important anti-inflammatory and immunomodulatory cytokine; there are already reports of its elevation in the tumor microenvironment of GBM, being correlated with tumor progression and therapeutic resistance by Janus kinase–signal transducer and activator of transcription-3 (JAK–STAT3) pathway (Widodo et al. 2021). Also, the impact of IL-10 within the glioma microenvironment can vary between promoting oncogenesis or exerting either an immunosuppressive or immunostimulatory effect, contingent upon its interaction with effector T cells (Widodo et al. 2021). Thus, a treatment that reduces levels of this appears promising in the context presented. It has already been reported in an experimental model of breast cancer that some phenolic compounds are capable of increasing macrophages

with an M1 phenotype and reducing M2, and thus reducing the production of IL-10, since the M2 phenotype are the largest producers of this interleukin (Shiri et al. 2015).

In parallel to the tests carried out on a C6 mouse strain, we evaluated the effect of blackberry extract on the viability and biomass of the U87 human glioma strain. The treatment was able to reduce both viability and cell biomass at all concentrations in a dose-dependent manner, even when comparing the results in the same tests with the C6 line, a more promising response to the treatment was observed in the human strain.

It is worth mentioning that the use of the C6 strain was prioritized in a larger number of tests aiming at the continuation of studies in an *in vivo* model since this strain is often used for murine models of glioma (Vasconcelos et al. 2022). Another intriguing observation pertains to the preference for utilizing natural products in their unaltered state, such as concentrated herbal extracts. A notable illustration of this principle is the profound risk-reduction potential for cancer associated with the consumption of green vegetables and fruits, primarily attributed to the collective of polyphenols (Zhai et al. 2021). The interplay between antioxidants, in general, and these polyphenols emerges as a pivotal factor influencing the biological efficacy of these compounds. Furthermore, research has indicated the presence of synergistic effects in mixtures of flavonoids, which substantially amplify their antioxidant capabilities (Hidalgo et al. 2010). In summary, these findings underscore the significance of synergistic interactions among flavonoids within blackberry extract.

Finally, our results demonstrate the safety of the blackberry extract, since no changes in viability or biomass were observed in healthy cells from the primary culture of astrocytes treated with the extract at high concentrations, it is noteworthy that the safety of using phenolic compounds *in vivo* models of GBM has already been demonstrated (Bona et al. 2019). The selective action of the extract is of great value, given that TMZ, the only current chemotherapy alternative adopted (Mohile et al. 2022), affects not only cancer cells but also healthy cells, which leads to undesirable side effects, such as immunosuppression (Grossman et al. 2011).

5. Conclusion

This study demonstrated the antineoplastic potential of blackberry extract against glioblastoma cell lines C6 and U87, without compromising healthy astrocyte cells. In this way, the field of research for future studies using blackberry extract *in vivo* models of glioma is encouraged, aiming to deepen its biological effects and therapeutic possibilities.

References

- 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)
- 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)
- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13:637–648
- Beylerli O, Beilerli A, Shumadalova A, et al (2022) Therapeutic effect of natural polyphenols against glioblastoma. *Front Cell Dev Biol* 10:1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1036809>
- Bona NP, Pedra NS, Azambuja JH, et al (2019) Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. *Metab Brain Dis* 35(2):283–293. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00519-9>
- Bona NP, Soares MSP, Pedra NS, et al (2022) Tannic Acid Attenuates Peripheral and Brain Changes in a Preclinical Rat Model of Glioblastoma by Modulating Oxidative Stress and Purinergic Signaling. *Neurochem Res* 47:1541–1552. <https://doi.org/10.1007/S11064-022-03547-7>
- Brix N, Samaga D, Hennel R, et al (2020) The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. *Radiat Oncol* 15:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13014-020-01697-y>
- Chaves VC, Soares MSP, Spohr L, et al (2020) Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. *Neurosci Lett* 714:134566. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134566>
- Chen J, Han P, Dahiya S (2022) Glioblastoma: Changing concepts in the WHO CNS5 classification. *Indian J Pathol Microbiol* 65:S24–S32. https://doi.org/10.4103/ijpm.ijpm_1109_21
- Chen J, Xu B, Sun J, et al (2021) Anthocyanin supplement as a dietary strategy in cancer prevention and management: A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 62:7242–7254. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1913092>
- Cheng CM, Cheng YR, Ding DS, et al (2021) Effects of ciliate infection on the activities of two antioxidant enzymes (SOD and CAT) in captive coral (*Goniopora columna*) and evaluation of drug therapy. *Biology (Basel)* 10(11):1216. <https://doi.org/10.3390/biology10111216>
- Cosme F, Pinto T, Aires A, et al (2022) Red Fruits Composition and Their Health Benefits—A Review. *Foods* 11(5):644. <https://doi.org/10.3390/foods11050644>
- Vasconcelos A, de Moura LR, Pedra NS, et al (2022) Thiazolidine-2,4-dione derivative exhibits antitumoral effect and reverts behavioral and metabolic changes in a model of glioblastoma. *Metab Brain Dis* 37:2053–2059. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01005-5>
- Domínguez-Avila JA, Salazar-López NJ, Montiel-Herrera M, et al (2022) Phenolic compounds can induce systemic and central immunomodulation, which result in a neuroprotective effect. *J Food Biochem* 46(12):e14260. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14260>
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, et al (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1(5):2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

- Garcia C, Blesso CN (2021) Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 172:152–166. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.040>
- Gottfried C, Valentim L, Salbego 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)
- Grossman SA, Ye X, Lesser G, et al (2011) Immunosuppression in patients with high-grade gliomas treated with radiation and temozolomide. *Clin Cancer Res* 17:5473–5480. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0774>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, de Pascual-Teresa S (2010) Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem* 121:691–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.097>
- Kaczmarek E, Erb L, Koziak K, et al (2005) Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides. Involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost* 93:735–742. <https://doi.org/10.1160/TH04-09-0576>
- Katiyar S (2006) Matrix Metalloproteinases in Cancer Metastasis: Molecular Targets for Prostate Cancer Prevention by Green Tea Polyphenols and Grape Seed Proanthocyanidins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6:17–24. <https://doi.org/10.2174/187153006776056648>
- Kuhn AM, Tzieply N, Schmidt MV, et al (2011) Antioxidant signaling via Nrf2 counteracts lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses in foam cell macrophages. *Free Radic Biol Med* 50:1382–1391. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.036>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)45228-9)
- Mohile NA, Messersmith H, Gatson NT, et al (2022) Therapy for Diffuse Astrocytic and Oligodendroglial Tumors in Adults: ASCO-SNO Guideline. *J Clin Oncol* 40:403–426. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02036>
- Olivier C, Oliver L, Lalier L, Vallette FM (2021) Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. *Front Mol Biosci* 7:620677. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.620677>
- Ou A, Alfred Yung WK, Majd N (2021) Molecular mechanisms of treatment resistance in glioblastoma. *Int J Mol Sci* 22:1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms22010351>
- Pauwels B, Korst AE, de Pooter CM, et al (2003) Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 51:221–6. <https://doi.org/10.1007/s00280-002-0557-9>
- Pedra NS, Galdino KCA, Silva DS, et al (2018) Endophytic fungus isolated from *achyrocline satureioides* exhibits selective antiglioma activity-the role of sch-642305. *Front Oncol* 29:8:476. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00476>
- Sánchez-Velázquez OA, Cortés-Rodríguez M, Milán-Carrillo J, et al (2020) Anti-oxidant and anti-proliferative effect of anthocyanin enriched fractions from two Mexican wild blackberries (*Rubus* spp.) on HepG2 and glioma cell lines. *J Berry Res* 10:513–529. <https://doi.org/10.3233/JBR-200566>

- Schaff LR, Mellinghoff IK (2023) Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA* 329:574–587. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023>
- Shiri S, Alizadeh AM, Baradaran B, et al (2015) Dendrosomal curcumin suppresses metastatic breast cancer in mice by changing M1/M2 macrophage balance in the tumor microenvironment. *Asian Pac J Cancer Prev* 16:3917–3922. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.9.3917>
- Soares MSP, Luduvico KP, Chaves VC, et al (2021) The Protective Action of Rubus sp. Fruit Extract Against Oxidative Damage in Mice Exposed to Lipopolysaccharide. *Neurochem Res* 46:1129–1140. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03248-7>
- Storz P (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, 10:1881–1896. <https://doi.org/10.2741/1667>
- Tatar M, Varedi M, Naghibalhossaini F (2021) Epigenetic Effects of Blackberry Extract on Human Colorectal Cancer Cells. *Nutr Cancer* 74:1446–1456. <https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1952454>
- Tsakiroglou P, Vandenakker NE, Del Bo' C, et al (2019) Role of berry anthocyanins and phenolic acids on cell migration and angiogenesis: An updated overview. *Nutrients* 11:1075. <https://doi.org/10.3390/nu11051075>
- Uddin MS, Mamun A Al, Alghamdi BS, et al (2022) Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches. *Semin Cancer Biol* 83:100–120. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.12.015>
- Wang CG, Yao WN, Zhang B, et al (2018) Lung cancer and matrix metalloproteinases inhibitors of polyphenols from *Selaginella tamariscina* with suppression activity of migration. *Bioorg Med Chem Lett* 28:2413–2417. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.024>
- Wang X, Yang DY, Yang LQ, et al (2019) Anthocyanin Consumption and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *J Am Coll Nutr* 38:470–477. <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1531084>
- Widodo SS, Dinevska M, Furst LM, et al (2021) IL-10 in glioma. *Br J Cancer* 125:1466–1476. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01515-6>
- Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C (2018) The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* 10:1618. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>
- Zhai K, Mazurakova A, Koklesova L, et al (2021) Flavonoids synergistically enhance the anti-glioblastoma effects of chemotherapeutic drugs. *Biomolecules* 11:1841. <https://doi.org/10.3390/biom11121841>

Figures description:

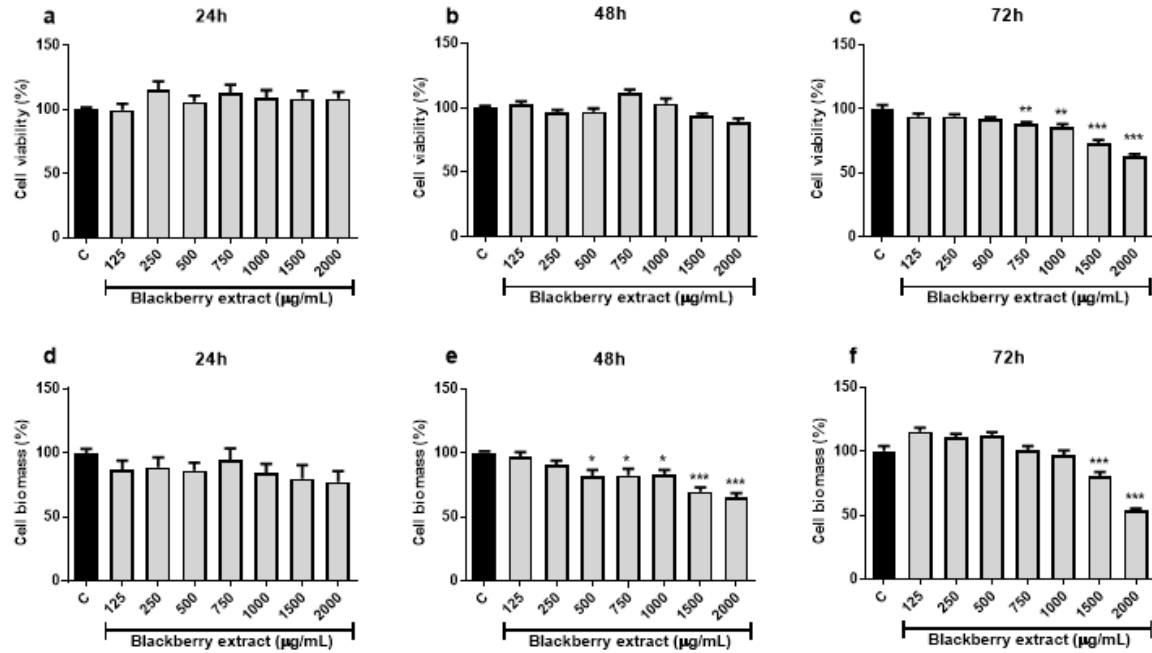


Fig. 1 Effect of blackberry extract on the viability (**a-c**) and biomass (**d-f**) of C6 rat glioma cells after 24 (**a** and **d**), 48 (**b** and **e**), and 72 h (**c** and **f**). Data are expressed as percentages of the control value. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with the control cells.

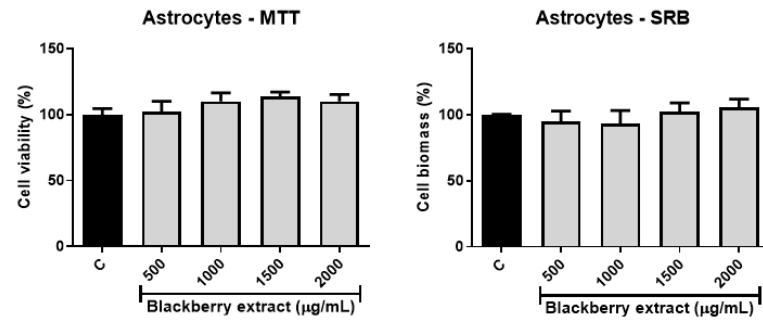


Fig. 2 The effect of blackberry extract on the viability and biomass of primary astrocytes was also observed after 72 h. Data are expressed as percentages of the control value. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with the control cells.

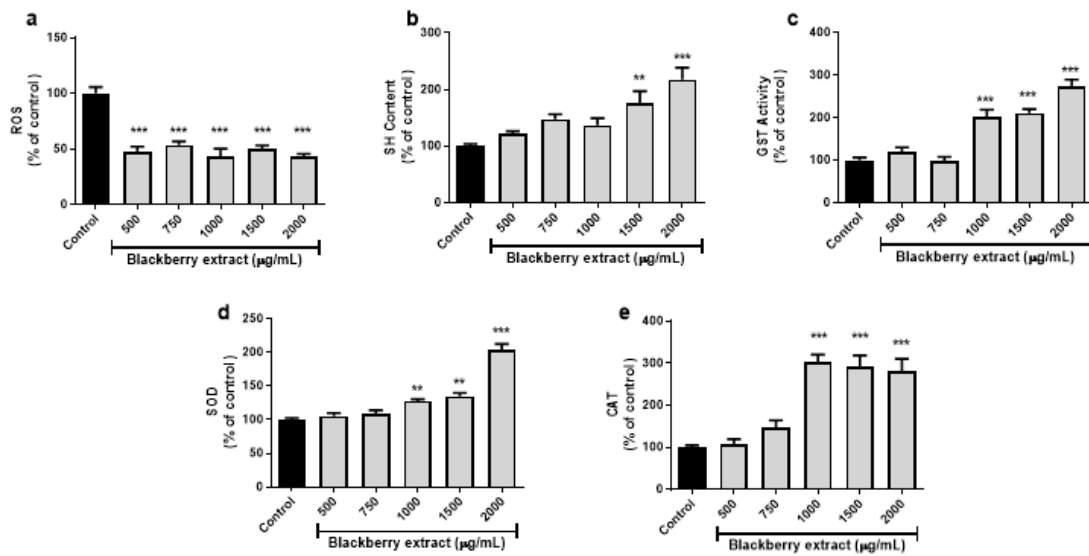


Fig. 3 Oxidative stress parameters in C6 glioma cells exposed to blackberry extract (500-2000 µg/mL) for 72 h. (a) Reactive oxygen species - ROS; (b) Sulfhydryl - SH content; (c) Glutathione S-transferase - GST activity; (d) Superoxide dismutase - SOD activity; (e) Catalase – CAT activity. Data are expressed as a percentage of the control value. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with the control cells.

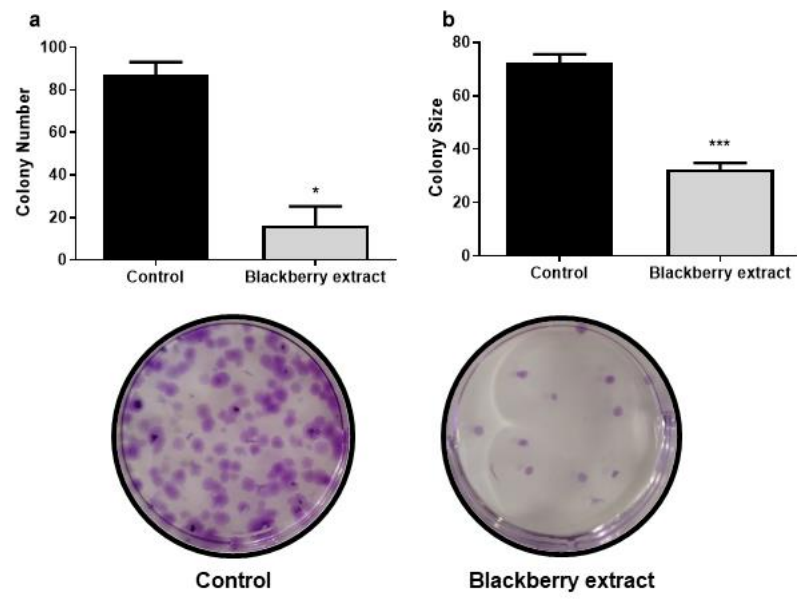


Fig. 4 Effect of blackberry extract (2000 $\mu\text{g/mL}$) treatment on the number (A) and size (B) of C6 glioma colonies, after 72 h of exposure. Data are expressed as percentages of the control value. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ compared with the control cells.

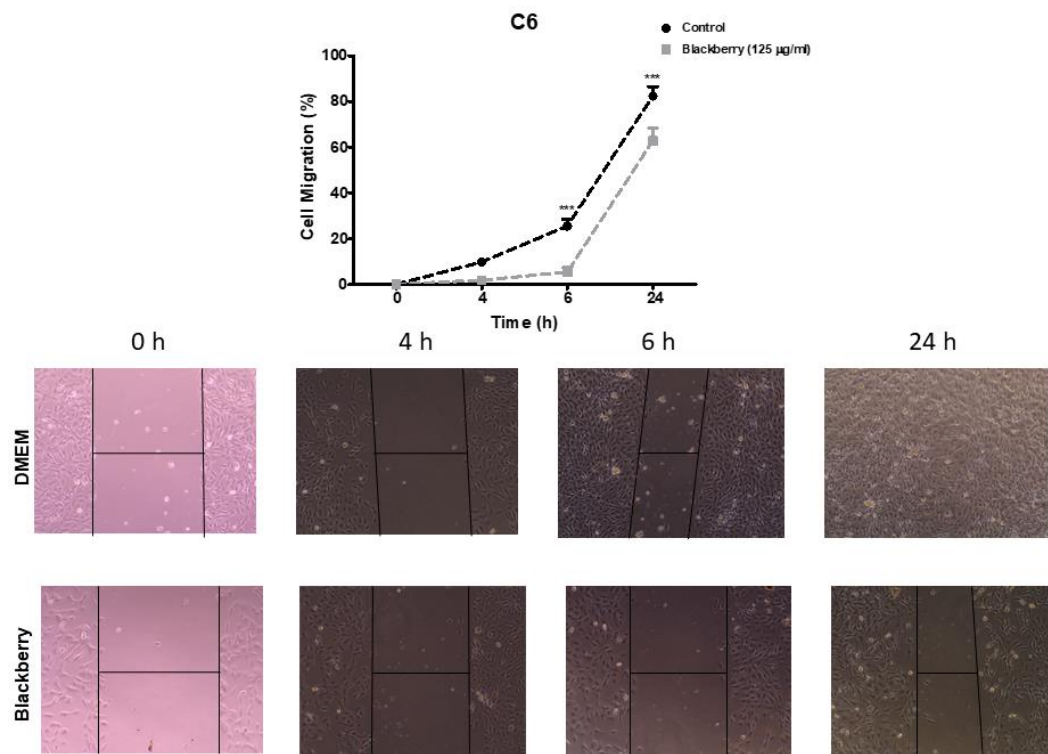


Fig. 5 Effect of treatment with blackberry extract (125 µg/mL) on migration of C6 glioma cells at 0 h, 4 h, 6 h, and 24 h. Data are expressed as a percentage of the control value. *** $P < 0.001$ compared with the control cells.

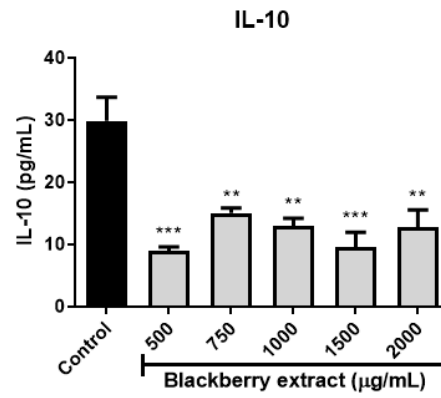


Fig. 6 Effect of blackberry extract on the IL-10 levels of C6 glioma cells after 72 h. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with the control cells.

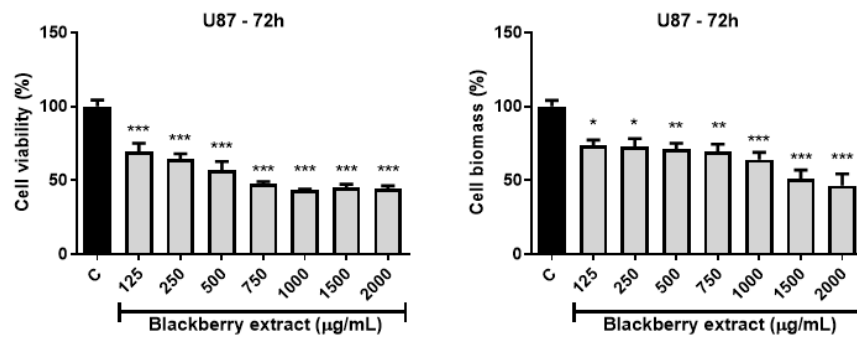


Fig. 7 Effect of blackberry extract on the viability and biomass of U87 human glioma cells after 72 h. Data are expressed as percentages of the control value. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with the control cells.

5 DISCUSSÃO

O GBM é um dos tumores mais malignos e agressivos que afetam o SNC, manifestando restrição e resistência às abordagens terapêuticas convencionais (Schaff *et al.*, 2023). Este estudo foi elaborado com o propósito de avaliar o potencial do extrato metanólico de amora-preta no contexto dessa doença.

O presente trabalho utilizou o extrato de amora-preta motivado por uma pesquisa anterior conduzida pelo nosso grupo de pesquisa, cuja autoria é atribuída a Chaves *et al.* (2020). No estudo em questão foi realizada a caracterização do extrato metanólico de amora-preta, da cultivar Tupy, onde foram detectados elevados teores de fenólicos totais e antocianinas, respectivamente 111,53 mg e 10,56 mg por grama de extrato seco. Ademais, as frações de antocianinas foram identificadas por meio de cromatografia, as quais foram cianidina-O-galactosídeo, cianidina-O-glucosídeo, cianidina-O-rutinosídeo, pelargonidina-O-glicosídeo e cianidina-O-malonil-hexosídeo.

As antocianinas são uma classe de compostos bioativos amplamente exploradas, não apenas por seu poder corante o qual confere a coloração característica aos frutos em tons de rosa, vermelho, roxo e azul, mas também devido aos seus notáveis potenciais nutraceuticos (Alappat; Alappat, 2020). São diversos os relatos que discutem os potenciais e possíveis aplicações farmacológicas dessa classe, considerando sua atividade antimicrobiana, antioxidante, imunoestimulante, antidiabética e antineoplásica. Essa variedade de propriedades confere um amplo espectro de aplicações a essas substâncias (Alappat; Alappat, 2020).

Tendo conhecimento que as antocianinas representam um dos compostos majoritários no extrato de amora-preta, mas também considerando os demais compostos fenólicos. Acreditamos que, em face da complexidade do GBM, uma abordagem terapêutica que permitisse a atuação sinérgica desses compostos, como o extrato bruto do fruto ao invés de seus componentes isolados, seria um interessante alvo de exploração.

Primeiramente, é importante salientar que não foram observadas alterações significativas na viabilidade e biomassa celular das culturas primárias de astrócitos expostas ao extrato de amora-preta em elevadas concentrações, evidenciando a segurança do tratamento em relação às células saudáveis. Destaca-se que a segurança do uso de compostos fenólicos em modelo *in vivo* de GMB já foi descrita (Bona *et al.*, 2019). A atuação seletiva do extrato é altamente valiosa, uma vez que o TMZ, atualmente a única opção quimioterápica utilizada (Mohile *et al.*, 2022), afeta

não apenas as células cancerígenas, mas também células saudáveis, resultando em efeitos secundários indesejáveis, como imunossupressão, e manifestações clínicas como constipação, fadiga e indisposição (Grossman *et al.*, 2011; Schreck; Grossman, 2018).

Posteriormente, os resultados evidenciaram a capacidade do extrato de amora-preta em reduzir a viabilidade e biomassa de células C6, sendo esses, indicativos de morte celular. Tais resultados podem estar associados à abundância de compostos fenólicos no extrato, conforme mencionado anteriormente (Chaves *et al.*, 2020). Estudos prévios destacam a capacidade protetora desses compostos, especialmente as antocianinas, contra diferentes neoplasias, incluindo câncer colorretal, de mama e até mesmo gliomas (Kou *et al.*, 2016; Sánchez-Velázquez *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2019), porém, é válido destacar a escassez de estudos que relacionem o extrato bruto da amora-preta a modelos de GBM.

Em sequência, tendo em vista a correlação entre o estresse oxidativo e o estabelecimento e avanço tumoral, foram mensurados diferentes parâmetros oxidativos. Observamos que o extrato de amora-preta exibiu a capacidade de reduzir os níveis de espécies reativas em todas as concentrações testadas. Esse é um importante indicador utilizado na pesquisa, uma vez que diferentes linhagens cancerígenas exibem uma produção elevada dessas espécies, o que é associado à instabilidade genética e à tumorigênese devido a danos causados ao DNA, proteínas e lipídios (Moloney; Cotter, 2018). Olivier *et al.* (2021) relataram que a produção de tais espécies no microambiente tumoral do GBM é elevada, podendo ser correlacionada a progressão da doença e a resistência farmacológica.

Ademais, a exposição ao extrato de amora-preta, nos grupos de maior concentração, promoveu a elevação do conteúdo total de sulfidrilas e da atividade das enzimas antioxidantes GST, SOD e CAT. As enzimas SOD e CAT são responsáveis por atuar sequencialmente na inativação dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, a SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, enquanto a CAT a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Cheng *et al.*, 2021). Já a enzima GST, composta por um grupo de isoenzimas, atua de forma significativa na desintoxicação de xenobióticos, sendo que alterações em sua expressão estão associadas à incidência e progressão de diferentes neoplasias (Cui *et al.*, 2020). Logo, o aumento na atividade das enzimas mencionadas pode estar associado aos resultados anteriores,

que incluem redução dos níveis de espécies reativas, bem como de viabilidade e biomassa das células cancerígenas. Em conformidade, estudos anteriores relatam a capacidade dos compostos fenólicos em atenuar níveis de ERO através da regulação positiva das enzimas SOD e CAT. Além disso, esses compostos têm o potencial de intensificar a ativação de fatores de proteção endógena ao estresse, como a via do elemento de resposta antioxidante (ARE) do fator 2 relacionado ao NF-E2 (Nrf2) (Garcia; Blesso, 2021; Yahfoufi *et al.*, 2018).

Com o objetivo de ampliar a compreensão sobre o efeito citotóxico do extrato, conduzimos o teste de ensaio clonogênico, uma medida comumente empregada para avaliar a capacidade de sobrevivência celular e formação de colônias (BRIX *et al.*, 2020). O extrato de amora-preta demonstrou a capacidade de diminuir tanto o número quanto o tamanho das colônias de C6, em comparação com o grupo controle, em concordância aos resultados anteriormente realizados e citados, ratificando o potencial antineoplásico do tratamento em estudo.

Sequencialmente, o ensaio de migração celular demonstrou resultados favoráveis, uma vez que o extrato de amora-preta promoveu a redução significativa da migração das células cancerígenas quando comparado ao grupo controle. Nesse contexto, é relevante salientar a elevada capacidade de angiogênese, e consequentemente invasiva e migratória, observada no GBM. Processo que está diretamente associado à progressão e malignidade dessa classe de tumores (Ahir; Engelhard; Lakka, 2020). Logo, uma terapia que retarde esse fenômeno é de grande relevância.

Em concordância, estudos prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram efeitos similares na redução da migração de células cancerígenas. Bona *et al.* (2019) relataram a capacidade do ácido tânico, um polifenol em sua forma isolada, de reduzir a migração de células cancerígenas da linhagem C6 a partir de 12 h de exposição. Enquanto, Da Silveira *et al.* (2022) demonstraram efeito semelhante em linhagem C6, com o uso do extrato de mirtilo bruto (Bona, *et al.*, 2019; Da Silveira *et al.*, 2022).

No GBM é observado uma elevada capacidade de invasão a tecidos adjacentes, como já mencionado anteriormente, a literatura aborda uma possível correlação dessa característica com a expressão anormal das metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de enzimas que degradam a matriz extracelular (Beylerli *et al.*, 2022). Por sua vez, já existem relatos da interferência dos polifenóis na

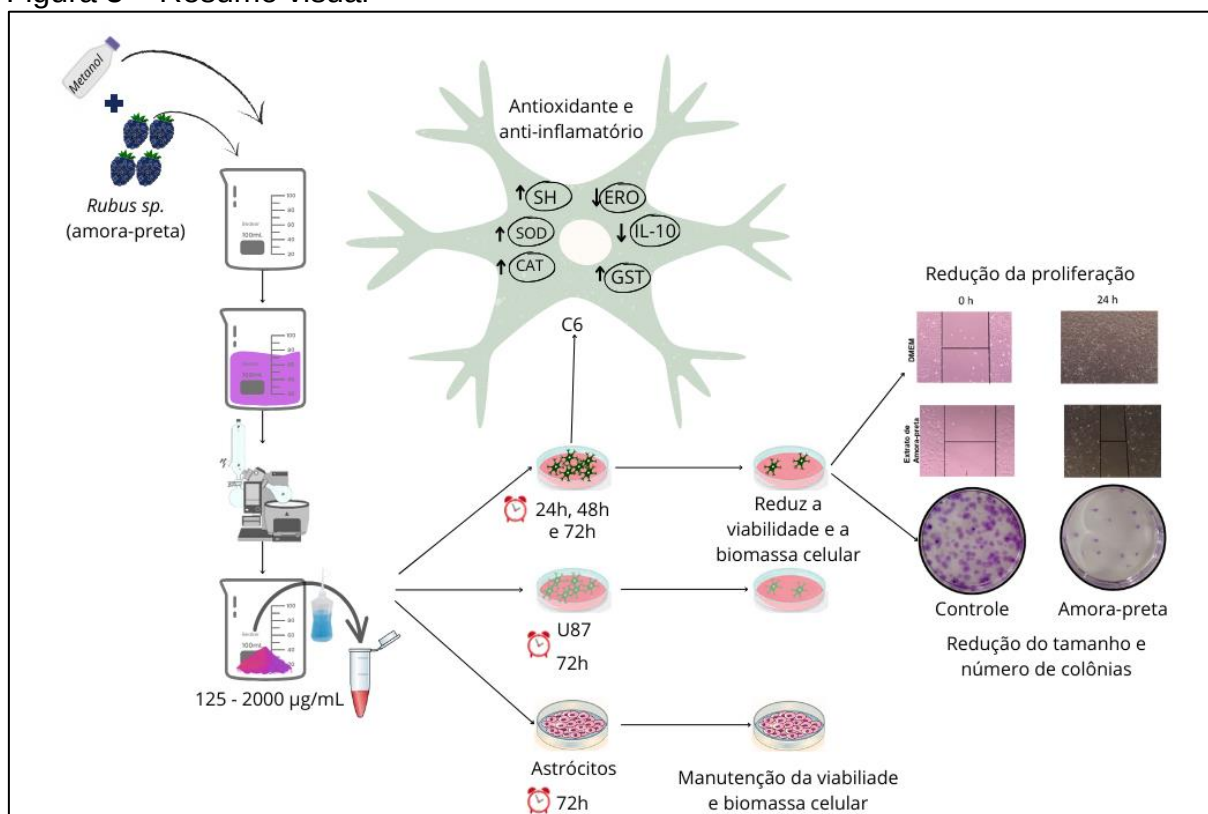
expressão das MMPs em modelos de câncer, notando-se a capacidade desses em inibir a secreção dessas espécies e assim promover a redução da migração celular (Niedzwiecki *et al.*, 2016). Achados que indicam o potencial antimetastático da classe dos compostos fenólicos.

Ainda, foram avaliados os níveis de IL-10 no sobrenadante das células C6 expostas ao extrato de amora-preta, revelando uma notável redução em todas as concentrações testadas. A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória e imunomoduladora, considerada um interessante alvo terapêutico, especialmente devido seu efeito pleiotrópico (Saraiva; Vieira; O'garra, 2020). A elevação dos níveis de IL-10 no microambiente tumoral do GBM, um ambiente imunossupressor devido ao padrão celular heterogêneo que o constitui, já é relatada e associada à progressão tumoral e ineficácia terapêutica (Widodo *et al.*, 2021).

Ainda, supõe-se que os níveis elevados decorram em parte da secreção de IL-10 por um grupo específico de células tumorais semelhantes a tronco, mas em maior nível de células imunes que se infiltram no tecido posteriormente. Além disso, as células tumorais apresentam receptores para a IL-10, ativando a via Janus cinase e ativador da transcrição-3 (JAK-STAT3), correlacionado a progressão tumoral (Widodo *et al.*, 2021). Dessa forma, uma terapêutica que promova a redução dos níveis dessa citocina parece ser promissora. Shiri *et al.* (2015) relataram em seu modelo experimental de câncer de mama a capacidade de alguns compostos fenólicos em aumentar macrófagos com fenótipo M1 e reduzir M2, e assim reduzir a produção de IL-10, uma vez que os de fenótipo M2 são os maiores produtores desta interleucina (Shiri *et al.*, 2015).

Em conjunto aos testes conduzidos na linhagem de rato C6, realizamos a avaliação do extrato de amora-preta sobre a viabilidade e biomassa da linhagem de glioma humano U87. Observamos que o tratamento reduziu significativamente ambos os parâmetros em todas as concentrações testadas, de forma dose dependente. Além disso, essa redução foi mais acentuada em comparação aos resultados obtidos nos testes realizados com a linhagem de rato C6. Na Figura 3 observamos de forma esquematizada os resultados obtidos no presente trabalho.

Figura 3 – Resumo visual



Fonte: Elaborada pelo autor. Sulfidrilas (SH); Espécies reativas de oxigênio (ERO); Superóxido dismutase (SOD); Catalase (CAT); Glutathione-S-transferase (GST); Interleucina 10 (IL-10).

Vale ressaltar que a preferência pelo uso da linhagem C6 de forma majoritária nos testes, se deu visando a continuidade dos estudos em modelos *in vivo*. Essa escolha foi respaldada pelo fato de que a linhagem C6 é comumente empregada em modelos murinos de glioma (Bona *et al.*, 2022; Vasconcelos *et al.*, 2022; Pedra *et al.*, 2022). Outra particularidade de nosso estudo se refere a predileção pela utilização do extrato bruto do fruto e não de seus componentes isolados como frequentemente relatado. Tal escolha foi embasada na já descrita correlação entre uma alimentação saudável, que inclui uma abundância de vegetais e frutas, e a redução na incidência e/ou progressão de neoplasias. Essa redução é atribuída principalmente ao impacto coletivo dos polifenóis (Dinu *et al.*, 2017; Zhai *et al.*, 2021). Logo, acreditamos que explorar o potencial de atuação sinérgica dos compostos contidos no extrato de amora-preta é deveras interessante.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos foi possível evidenciar o potencial antitumoral do extrato metanólico de amora-preta frente às linhagens de glioma C6 e U87. Vale ressaltar que esse efeito foi observado de maneira seletiva, uma vez que o tratamento não demonstrou citotoxicidade em células de astrócitos saudáveis provenientes do cultivo primário.

O extrato de amora-preta foi capaz de atenuar a viabilidade e biomassa celular em ambas as linhagens celulares. Além disso, em testes realizados com a linhagem C6, o extrato promoveu a redução da produção de ERO, reverteu a atenuação do teor de sulfidrilas, bem como da atividade das enzimas SOD, CAT e GST, impediu o crescimento e formação de colônias cancerígenas, reduziu a capacidade migratória das células cancerígenas e atenuou os níveis de IL-10.

Os dados apresentados corroboram com estudos anteriores que relatam o potencial dos frutos vermelhos no enfrentamento de diferentes neoplasias. Entretanto, é importante ressaltar a possível aplicabilidade desses frutos no GBM, área ainda pouco explorada. Sendo assim, nossos dados respaldam estudos futuros para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação deste extrato e de seus compostos majoritários, visando o possível uso da amora-preta como uma terapia coadjuvante em pacientes acometidos pelo GBM.

REFERÊNCIAS

- AHIR, B. K.; ENGELHARD, H. H.; LAKKA, S. S. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. **Molecular Neurobiology**, v. 57, p. 2461–2478, 2020.
- ALAPPAT, B.; ALAPPAT, J. Anthocyanin pigments: Beyond aesthetics. **Molecules**, v. 25, p. 5500, 2020.
- ALEXANDER, B. M.; CLOUGHESY, T. F. Adult Glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 21, p. 2402–2409, 2017.
- ANTONIJEVIĆ, M. R. et al. Radical scavenging activity and pharmacokinetic properties of coumarin–hydroxybenzohydrazide hybrids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 490, 2022.
- ARSLAN, M. et al. Trace elements, heavy metals and other biochemical parameters in malignant glioma patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 2, p. 447–451, 2011.
- BAEK, J.; LEE, M. G. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. **Redox Report**, v. 21, n. 4, p. 164-9, 2016.
- BAILLY, C. Etoposide: A rider on the cytokine storm. **Cytokine**, 2023.
- BEYLERLI, O. et al. Therapeutic effect of natural polyphenols against glioblastoma. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022.
- BONA, N. P. et al. Tannic Acid Attenuates Peripheral and Brain Changes in a Preclinical Rat Model of Glioblastoma by Modulating Oxidative Stress and Purinergic Signaling. **Neurochemical research**, v. 47, n. 6, p. 1541–1552, 2022.
- 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, p. 283-293, 2019.
- BORJAN, D. et al. Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5946, 2020.
- BRIX, N. et al. The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. **Radiation Oncology**, v. 15, 2020.
- BROWN, J. S. et al. Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 2023.
- CHAVES, V. C. et al. Blackberry extract improves behavioral and neurochemical dysfunctions in a ketamine-induced rat model of mania. **Neuroscience Letters**, v. 714, 2020.

CHEN, J.; HAN, P.; DAHIYA, S. Glioblastoma: Changing concepts in the WHO CNS5 classification. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 65, p. S24–S32, 2022.

CHENG, C. M. et al. Effects of ciliate infection on the activities of two antioxidant enzymes (SOD and CAT) in captive coral (*goniopora columna*) and evaluation of drug therapy. **Biology**, v. 10, n. 11, 2021.

CORRÊA, G. M. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 75–81, 2014.

COSME, F. et al. Red Fruits Composition and Their Health Benefits—A Review. **Foods**, v.11, n. 5, p. 644, 2022.

CUI, J. et al. GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling (Review). **International Journal of Oncology**, v. 56, n. 4, p. 867–878, 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.

DAPASH, M. et al. The interplay between glioblastoma and its microenvironment. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 1–14, 2021.

DIACONEASA, Z. et al. Phytochemical characterization of commercial processed blueberry, blackberry, blackcurrant, cranberry, and raspberry and their antioxidant activity. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, 2019.

DINU, M. et al. Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 3640–3649, 2017.

DOMÍNGUEZ-AVILA, J. A. et al. Phenolic compounds can induce systemic and central immunomodulation, which result in a neuroprotective effect. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n.12, p. e14260, 2022.

FENG, J. et al. SIRT6 suppresses glioma cell growth via induction of apoptosis, inhibition of oxidative stress and suppression of JAK2/STAT3 signaling pathway activation. **Oncology Reports**, v. 35, n. 3, p. 1395–1402, 2016.

FIGUEIRA, I. et al. Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

GARCIA, C.; BLESSO, C. N. Antioxidant properties of anthocyanins and their mechanism of action in atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 172, p. 152–166, 2021.

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

GIL-MARTÍNEZ, L. et al. Phytochemicals Determination, and Antioxidant, Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Blackberry Fruits. **Foods**, v. 12, n. 7, p. 1505, 2023.

GU, M. et al. Pharmacoeconomic evaluation of original and generic temozolomide capsules in the treatment of glioma. **Intelligent Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 26–31, 2023.

HANIF, F. et al. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017.

HAQUE, A. et al. Next Generation Antineoplastic Agents: A Review on Structurally Modified Vinblastine (VBL) Analogues. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 14, p. 1650–1662, 2018.

HASHEM, S. et al. Targeting cancer signaling pathways by natural products: Exploring promising anti-cancer agents. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 150, p. 113054, 2022.

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

KHANDIA, R.; MUNJAL, A. Interplay between inflammation and cancer. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 119, p. 199–245, 2020.

KOU, X. et al. Antioxidant and antitumor effects and immunomodulatory activities of crude and purified polyphenol extract from blueberries. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 10, n. 1, p. 108–119, 2016.

KRISTO, A. S.; KLIMIS-ZACAS, D.; SIKALIDIS, A. K. Protective role of dietary berries in cancer. **Antioxidants**, v. 5, n. 4, p. 37, 2016.

KULKARNI, P. et al. A Nexus between Genetic and Non-Genetic Mechanisms Guides KRAS Inhibitor Resistance in Lung Cancer. **Biomolecules**, v. 13, n. 11, p. 1587, 2023.

LEWANDOWSKA, A. M. et al. Environmental risk factors for cancer - review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 26, 2019.

LOHITESH, K. et al. Autophagy inhibition potentiates SAHA-mediated apoptosis in glioblastoma cells by accumulation of damaged mitochondria. **Oncology Reports**, v. 39, n. 6, p. 2787–2796, 2018.

MANGANARIS, G. A. et al. Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 825–833, 2013.

- MELLO, J. E. et al. Therapeutic potential of blackberry extract in the preventing memory deficits and neurochemical alterations in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of a rat model with amnesia. **Metabolic Brain Disease**, v. 38, p.1261-1272, 2023.
- MOHILE, N. A. et al. Therapy for Diffuse Astrocytic and Oligodendroglial Tumors in Adults: ASCO-SNO Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n. 4, p. 403–426, 2022.
- MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 2018.
- MURATA, M. Inflammation and cancer. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2018.
- NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687–704, 2019.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.
- NIEDZWIECKI, A. et al. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. **Nutrients**, v.8, n.9, p. 552, 2016.
- OLIVIER, C. et al. Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 27, 2021.
- OSBORN, A. G. et al. The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. **American Journal of Neuroradiology**, v. 43, n. 7, p. 928–937, 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.
- 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.
- RASEIRA, M. DO C. B. et al. Amoreira-preta (*Rubus* spp.): Importância e Pesquisa no Brasil. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, 2022.
- RASHID, K. et al. Kenyan purple tea anthocyanins ability to cross the blood brain barrier and reinforce brain antioxidant capacity in mice. **Nutritional Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 178–185, 2014.
- RIEMENSCHNEIDER, M. J. et al. Molecular diagnostics of gliomas: State of the art. **Acta Neuropathologica**, v. 120, n. 5, p. 567–584, 2010.

ROBINS, H. I. et al. The association between BMI and BSA-temozolomide-induced myelosuppression toxicities: A correlative analysis of NRG oncology RTOG 0525. **Neuro-Oncology Practice**, v. 6, n. 6, p. 473–478, 2019.

SALAZAR-RAMIRO, A. et al. Role of redox status in development of Glioblastoma. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 156, 2016.

SAMAAN, T. M. A. et al. Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2019.

SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ, O. A. et al. Anti-oxidant and anti-proliferative effect of anthocyanin enriched fractions from two Mexican wild blackberries (*Rubus* spp.) on HepG2 and glioma cell lines. **Journal of Berry Research**, v. 10, n. 3, p. 513–529, 2020.

SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O'GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, p. 1–19, 2020.

SHAHCHERAGHI, S. H. et al. Nrf2 regulation by curcumin: Molecular aspects for therapeutic prospects. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 167, 2022.

SHIRI, S. et al. Dendrosomal curcumin suppresses metastatic breast cancer in mice by changing M1/M2 macrophage balance in the tumor microenvironment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 9, p. 3917–3922, 2015.

SIES, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 852, 2020.

SOARES, M. S. P. et al. The Protective Action of *Rubus* sp. Fruit Extract Against Oxidative Damage in Mice Exposed to Lipopolysaccharide. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 5, p. 1129–1140, 2021.

STELLA, M. et al. Serum extracellular vesicle-derived circHIPK3 and circSMARCA5 are two novel diagnostic biomarkers for glioblastoma multiforme. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 7, p. 1–12, 2021.

STEWART, J. et al. Pattern of Recurrence of Glioblastoma Versus Grade 4 IDH-Mutant Astrocytoma Following Chemoradiation: A Retrospective Matched-Cohort Analysis. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 21, p. 1–8, 2022.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TATAR, M.; VAREDI, M.; NAGHIBALHOSSAINI, F. Epigenetic Effects of Blackberry Extract on Human Colorectal Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 74, n. 4, p. 1446–1456, 2021.

TOMAR, M. S. et al. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1876, n. 2, p. 188616, 2021.

UDDIN, M. S. et al. Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches. **Seminars in Cancer Biology**, v. 83, p. 100-120, 2020.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.

VAN DE VELDE, F. et al. Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. **Food Research International**, v. 121, p. 453–462, 2019.

VASCONCELOS, A. et al. Thiazolidine-2,4-dione derivative exhibits antitumoral effect and reverts behavioral and metabolic changes in a model of glioblastoma. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 6, p. 2053–2059, 2022.

VELÁSQUEZ-JIMÉNEZ, D. et al. Phenolic compounds that cross the blood–brain barrier exert positive health effects as central nervous system antioxidants. **Food & Function**, v. 12, n. 21, p. 10356–10369, 2021.

VUJOTIĆ, L. et al. Association between oxidative stress biomarkers and concentrations of some metal ions in the blood of patients with brain tumors and hydrocephalus. **Archives of Medical Science**, v. 16, n. 4, p. 811–819, 2020.

WANG, X. et al. Anthocyanin Consumption and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 38, n. 5, p. 470–477, 2019.

WHITELAW, B. C. How and when to use temozolomide to treat aggressive pituitary tumours. **Endocrine-Related Cancer**, v. 26, n. 9, p. R545–R552, 2019.

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.

WIDODO, S. S. et al. IL-10 in glioma. **British Journal of Cancer**, v. 125, n. 11, p. 1466–1476, 2021.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention**. Lyon, 2020.

XU, H. et al. GBP3 promotes glioblastoma resistance to temozolomide by enhancing DNA damage repair. **Oncogene**, v. 41, n. 31, p. 3876–3885, 29 jul. 2022.

YAHFOUFI, N. et al. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1618, 2018.

ZHAI, K. et al. Flavonoids synergistically enhance the anti-glioblastoma effects of chemotherapeutic drugs. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, 2021.

ŽUREK, N. et al. Phenolic Profile and Antioxidant, Antibacterial, and Antiproliferative Activity of *Juglans regia* L. Male Flowers. **Molecules**, v. 27, n. 9, 2022.

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**.