



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Isabella Gomes

**Avaliação dos efeitos antineoplásicos do extrato bruto e frações de
folhas de *Psidium guajava* em linhagens celulares humanas de
glioblastoma**

São José do Rio Preto
2024

Isabella Gomes

**Avaliação dos efeitos antineoplásicos do extrato bruto e frações de
folhas de *Psidium guajava* em linhagens celulares humanas de
glioblastoma**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Girol

São José do Rio Preto
2024

G633a	Gomes, Isabella Avaliação dos efeitos antineoplásicos do extrato bruto e frações de folhas de Psidium guajava em linhagens celulares humanas de glioblastoma / Isabella Gomes. -- São José do Rio Preto, 2024 89 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Ana Paula Girol 1. GBM. Antioxidantes. Flavonoides.. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Isabella Gomes

**Avaliação dos efeitos antineoplásicos do extrato bruto e frações de
folhas de *Psidium guajava* em linhagens celulares humanas de
glioblastoma**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biociências, junto
ao Programa de Pós-Graduação em Biociências,
do Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio
Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Girol
Laboratório Multidisciplinar / Centro Universitario Padre Albino
Orientadora

Prof. Dr. Renato José da Silva Oliveira
Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular/Fundação Pio XII –
Hospital de Câncer de Barretos

Prof. Dr^a. Flavia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Lucas Possebon
UNIFIPA – Centro Universitário Padre Albino

Prof. Dr^a. Andréia de Haro Moreno
UNIFIPA – Centro Universitário Padre Albino

São José do Rio Preto
05 de dezembro de 2024

Àqueles sonhos que um dia foram apenas sonhos alimentados
com esforços e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ciclos começam e terminam o tempo todo. Neste momento, paro para observar minha caminhada e sinto uma imensa gratidão. Deus, obrigada por cuidar sempre de tudo!

Gratidão, é o que me define agora. Uma garota cheia de sonhos que teve coragem para deixar de apenas sonhar. Enfrentei medos, críticas, julgamentos e tudo o que pudesse me impedir de chegar aonde queria. Ao olhar no espelho, reconheço o mesmo brilho nos olhos daquela garota, com algumas cicatrizes que me fizeram mais forte. É sobre cair, levantar e nunca desistir... É estar sempre em evolução!

A parte mais importante da nossa caminhada, é sermos gratos às conquistas e principalmente às pessoas que nos ajudaram no caminho.

Aos meus pais, Valdecir Cesar Gomes e Silvia Maria Rocha Gomes por serem sempre suporte e dedicação. Vocês me ensinaram que eu poderia ser o que eu quisesse, bastava apenas esforço e dedicação!

Ao meu avô, José Gomes Rodrigues (*in memoriam*) que foi levado da minha vida pelo câncer em tão pouco tempo. Vô, a sua falta me fez acreditar que um dia eu poderia evitar que essa doença levasse de nós quem amamos tanto.

Ao Carlos, por não deixar que eu duvide da minha capacidade. Por muitas vezes não compreender, mas aceitar meus sentimentos e angústias.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Girol, que desde a graduação me proporcionou grandes ensinamentos. Sou imensamente grata por me acolher, ensinar e me encantar com a Biologia celular.

Ao Centro Universitário Padre Albino – UNIFIPA, pelo suporte, ceder a estrutura e equipamentos de seus laboratórios.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociências – IBILCE e aos docentes por todos os ensinamentos e discussões que enriqueceram a mim e ao meu trabalho. Aos funcionários por todo auxílio e dedicação.

À coordenadora do programa de Pós-Graduação, Prof^a. Dr^a Flavia Cristina Rodrigues Lisoni por toda sua dedicação e cuidado com os alunos.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto – SP por ceder a estrutura e equipamento de seus laboratórios.

Aos membros da banca de qualificação e defesa pela disponibilidade e oportunidade dada a este projeto.

Em especial, ao Dr. Renato José da Silva Oliveira, que me acompanhou durante o mestrado e com muita competência me ensinou a trabalhar com cultura celular. Agradeço por compartilhar seu conhecimento e por sempre estar disposto a ajudar-me a superar os desafios.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Número do Processo: 88887.570906/2020-00, à qual agradeço.

Às duas alunas de Iniciação Científica, Julia Gabas Leite e Nayara Ferreira e Silva, que me acompanharam nesta linda jornada. Sou grata pelos momentos de aprendizado compartilhados e espero ter encantado vocês com a Biologia!

À Melina Mizusaki Yoshikawa, pela amizade, todo o suporte, experiências e aprendizados compartilhados.

Aos meus amigos Ariane Harumi Yoshikawa, Helena Ribeiro Souza, Lucas Possebon, Mariana Balie e Sara de Souza Costa, por me acolherem tão bem. Sou grata por tê-los na minha vida. Agradeço cada momento compartilhado, experiências, conhecimentos, risos, frustrações e carinho. Nossos cafés nos davam aconchego e ânimo para continuar caminhando.

Sou imensamente grata pelas pessoas incríveis que a vida me trouxe; que me apoiaram, incentivaram e não me deixaram desistir de mim. Muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

Psidium guajava (goiaba) é uma árvore frutífera usada na medicina popular, por suas propriedades anti-inflamatórias, antidiarreicas e cicatrizantes, entre outras. Investigações mostram efeitos antitumorais de compostos bioativos de *P. guajava*, mas há escassez de estudos que avaliam sua ação terapêutica no glioblastoma (GBM). O GBM é um tumor primário cerebral com baixa sobrevida e alta taxa de mortalidade, nesse sentido, a investigação de novos compostos que regulem a tumorigênese é estimulada. O objetivo deste projeto consistiu em padronizar o extrato de folhas de *P. guajava* e avaliar o potencial efeito antitumoral em linhagens celulares de GBM (A172 e U87-MG). As propriedades fitoquímicas e antioxidantes do extrato bruto (EB) de *P. guajava* e frações, foram submetidas a avaliações qualitativas, quantitativas e cromatografias em camada delgada (HPTLC) e líquida (HPLC); e avaliação de citotoxicidade por hemólise. Ensaios de proliferação e viabilidade foram realizados com fração acetato de etila (FAE), selecionada após as análises fitoquímicas, em células endoteliais (EA-hy 926) e tumorais (A172 e U87-MG). O potencial da FAE sobre proliferação, genotoxicidade, inflamação e invasão foi avaliado nas linhagens tumorais. A proteína antiapoptótica (BCL-2), pró-apoptótica (BAX) e metaloproteinases (MMP2 e MMP9) foram analisadas por *Western blotting*. As proteínas inibidoras do fator nuclear- κ B (IKK), Tirosina-Proteína Quinases (JAK1 e JAK3), Proto-Oncogene (MDM2), ativador de transcrição 3 (STAT3) e anexina A1 (AnxA1) foram analisadas por imunocitoquímica. Os níveis de interleucina (IL-6) e interferon gama (INF- γ) foram quantificados no sobrenadante do lisado celular e no meio de cultivo. A análise da expressão gênica de *TP53*, *NFkB* e *mTOR* foi avaliada por RT-PCR. A análise cromatográfica confirmou a presença de Quercetina, Ácido Gálico, Catequina e Miricetina. O teste de hemólise indicou ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas. Após os testes de viabilidade e citotoxicidade, determinou-se a concentração de 25% para A172 e 15% para a U87-MG em 24 horas. O tratamento com a FAE não alterou a morfologia das células endoteliais e tumorais; no entanto, observou-se efeito inibitório da proliferação celular da linhagem A172 após o tratamento com FAE na concentração de 25% e nas linhagens U87-MG e EA-hy926 na concentração de 15% em 24 horas. Ainda, o tratamento com a FAE nas linhagens tumorais, A172 e U87-MG, promoveu danos significativos ao DNA. Em A172, o tratamento com FAE induziu INF- γ no sobrenadante do lisado; no entanto, reduziu no

sobrenadante do meio de cultivo. Em U87-MG, o tratamento reduziu INF- γ no sobrenadante do lisado; bem como no sobrenadante do meio. O tratamento não alterou a expressão de IL-6 no sobrenadante do lisado celular em ambas as linhagens. Entretanto, houve redução de IL-6 no sobrenadante do meio de cultivo da A172; bem como aumento de IL-6 no sobrenadante do meio de cultivo da U87-MG. Nas células A172, a FAE induziu AnxA1; contudo, na linhagem U87-MG a FAE reduziu significativamente a expressão dessa proteína. A expressão de IKK foi aumentada em ambas as linhagens. A expressão de JAK1 e JAK3 foi reduzida em A172 e U87-MG. A expressão de MDM2, aumentou em A172 e reduziu em U87-MG. STAT3 aumentou em A172 e reduziu na U87-MG. No sobrenadante do lisado celular, a expressão de AnxA1 foi induzida em A172; no entanto, foi reduzida em U87-MG após o tratamento com FAE. BAX não foi alterada significativamente. MMP2 e MMP9 foram reduzidas em A172. A expressão proteica de MMP2 e MMP9 foi induzida em U87-MG. O tratamento com FAE reduziu a expressão dos genes mTOR, TP53 e NFkB nas linhagens A172 e U87-MG. FAE induziu a morte celular nas linhagens tumorais. O tratamento com a FAE inibiu a proliferação celular, induziu a apoptose e regulou mediadores envolvidos na tumorigênese, com potencial para ser explorada em pesquisas futuras.

Palavras-chave: GBM. Antioxidantes. Flavonoides. Terpenos.

ABSTRACT

Psidium guajava (guava) is a fruit tree used in folk medicine, for its anti-inflammatory, antidiarrheal and healing properties, among others. Investigations show antitumor effects of bioactive compounds from *P. guajava*, but there is a lack of studies evaluating their therapeutic action in glioblastoma (GBM). GBM is a primary brain tumor with low survival and high mortality rate, in this sense, the investigation of new compounds that regulate tumorigenesis is stimulated. The objective of this project was to standardize the *P. guajava* leaf extract and evaluate the potential antitumor effect on GBM cell lines (A172 and U87-MG). The phytochemical and antioxidant properties of the crude extract (EB) of *P. guajava* and fractions were subjected to qualitative and quantitative evaluations and thin layer chromatography (HPTLC) and liquid chromatography (HPLC) and evaluation of cytotoxicity due to hemolysis. Proliferation and viability assays were performed with ethyl acetate fraction (FAE), selected after phytochemical analysis, on endothelial (EA-hy 926) and tumor cells (A172 and U87-MG). The potential of FAE on proliferation, genotoxicity, inflammation and invasion was evaluated in tumor cell lines. Antiapoptotic protein (BCL-2), proapoptotic protein (BAX) and metalloproteinases (MMP2 and MMP9) were analyzed by Western blotting. The inhibitory proteins of nuclear factor- κ B (IKK), Tyrosine-Protein Kinases (JAK1 and JAK3), Proto-Oncogene (MDM2), activator of transcription 3 (STAT3) and annexin A1 (AnxA1) were analyzed by immunocytochemistry. The levels of interleukin (IL-6) and interferon gamma (INF- γ) were quantified in the cell lysate supernatant and in the culture medium. Chromatographic analysis confirmed the presence of Quercetin, Gallic Acid, Catechin and Myricetin. The hemolysis test indicated no cytotoxicity at the concentrations tested. After viability and cytotoxicity tests, a concentration of 25% for A172 and 15% for U87-MG was determined in 24 hours. Treatment with FAE did not change the morphology of endothelial and tumor cells; however, an inhibitory effect on cell proliferation was observed in the A172 line after treatment with FAE at a concentration of 25% and in the U87-MG and EA-hy926 lines at a concentration of 15% within 24 hours. Furthermore, treatment with FAE in tumor lines, A172 and U87-MG, caused significant damage to DNA. In A172, FAE treatment induced INF- γ in the lysate supernatant; however, it was reduced in the culture medium supernatant. In U87-MG, treatment reduced INF- γ in the lysate supernatant, as well as in the medium supernatant. The treatment did not change the expression of IL-6 in the cell lysate

supernatant in both lines. However, there was a reduction in IL-6 in the supernatant of the A172 culture medium; as well as an increase in IL-6 in the supernatant of the U87-MG culture medium. In A172 cells, FAE induced AnxA1; however, in the U87-MG line FAE significantly reduced the expression of this protein. IKK expression was increased in both lines. The expression of JAK1 and JAK3 was reduced in A172 and U87-MG. MDM2 expression increased in A172 and reduced in U87-MG. STAT3 increased in A172 and reduced in U87-MG. In the cell lysate supernatant, AnxA1 expression was induced in A172; however, it was reduced in U87-MG after FAE treatment. BAX was not significantly changed. MMP2 and MMP9 were reduced in A172. Protein expression of MMP2 and MMP9 was induced in U87-MG. Treatment with FAE reduced the expression of *mTOR*, *TP53* and *NFkB* genes in lines A172 and U87-MG. FAE induced cell death in tumor cells. Treatment with FAE inhibited cell proliferation, induced apoptosis and regulated mediators involved in tumorigenesis, with potential to be explored in future research.

Keywords: *Psidium guajava*. GBM. Antioxidants. Flavonoids. Terpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Folhas de <i>Psidium guajava</i> .	13
Figura 2 – Principais vias de sinalização.	20
Figura 3 – Via de sinalização da proteína p53.	23
Figura 4 – Via de sinalização da apoptose.	25
Figura 5 – A) Percolação do EB. B) Frações orgânicas FAE, FC e FH.	33
Figura 6 – Fotomicrografia de fluorescência dos núcleos corados com <i>GelRed</i> nas células A172, após o tratamento com FAE (concentração de 800 µg/ml por 24 horas), evidenciando os diferentes tipos de danos avaliados pelo ensaio Cometa. Aumento de 400x, escala de 40 µm.	42
Figura 7 – Fitoquímicos por HPLC. Em A) Leitura do EB a 10%. B) Leitura da FAE. As setas indicam os picos correspondentes à miricetina.	47
Figura 8 – Fitoquímicos por HPTLC.	48
Figura 9 – Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> por hemólise	49
Figura 10 – Imagens microscópicas da linhagem A172 (10x e 40x).	50
Figura 11 – Ensaio de citotoxicidade celular com a FAE nas concentrações previamente determinadas nas linhagens EA-hy926, A172 e U87-MG.	51
Figura 12 – Ensaio de viabilidade e citotoxicidade nas linhagens EA-hy 926, A172 e U87-MG.	52
Figura 13 – Índice de danos obtidos pelo ensaio de genotoxicidade para as linhagens A172 e U87-MG.	53
Figura 14 – Fotomicrografia de fluorescência dos núcleos corados com <i>GelRed</i> nas células A172 e U87-MG, após o tratamento com FAE (24 horas).	53
Figura 15 – Dosagem de citocinas nas células de GBM em pg/ml.	55
Figura 16 – Expressão das proteínas AnxA1, IKK, JAK1, JAK3, MDM2 e STAT3.	57
Figura 17 - Expressão das proteínas ANX A1, BAX, MMP2 e MMP9.	60
Figura 18 – Expressão de genes por Real-Time PCR em células A172 e U87-MG.	61
Figura 19 – Fotomicrografia de fluorescência das linhagens A172 e U87-MG.	62
Figura 20 - <i>Dotplots</i> obtidos da citometria de fluxo.	62

Figura 21 – Compilação dos achados chave que sustentam as conclusões deste trabalho. 68

Fluxograma 1 – Delineamento experimental. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrões e diluições, fases móveis e derivatização utilizados em HPTLC.	36
Tabela 2 – Iniciadores de cadeia (<i>primers</i>) usados na RT PCR.	43
Tabela 3 – Análises fitoquímicas qualitativas.	46
Tabela 4 – Análises fitoquímicas quantitativas.	46
Tabela 5 – Índice de danos obtidos pelo ensaio de genotoxicidade para as linhagens A172 e U87-MG.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Serina/Treonina quinase 1
AlCl₃	Cloreto de alumínio
Anx A1	Anexina A1
APAF1	Fator de ativação pró apoptótico 1
ATCC	Banco americano de linhagens celulares
ATM	Serina/Treonina Quinase
ATR	Serina/Treonina Quinase
BAD	Fator pró-apoptótico
BAK	Fator pró-apoptótico
BAX	Regulador pró-apoptose X
BCL-2	Regulador de apoptose
BCL-x	Regulador de apoptose
BHE	Barreira hematoencefálica
Bid	Antagonista de morte de domínio de interação H3
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CDK	Quinase dependente de ciclina
CHK1/2	Ponto de verificação do ciclo celular cinases
DIABLO	Inibidor direto de apoptose
DMEM e EMEM	Solução de sais minerais, aminoácidos e compostos essenciais para o crescimento celular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EB	Extrato bruto
FADD	Proteína de associação de Fas com domínio de morte

FAE	Fração Acetato de etila
FAS	Receptor de morte da superfície celular
FC	Fração Clorofórmio
FeCl₃	Cloreto de ferro
FH	Fração Hexano
GBM	Glioblastoma
G2/M	Ponto de verificação no DNA durante a mitose
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IKα	Inibidor do fator nuclear- κ B α
Ikβ	Inibidor do fator nuclear- κ B β
IKK	Inibidor do fator nuclear- κ B
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INF-γ	Interferon gama
JAK1	Tirosina-Proteína Quinase JAK1
JAK 3	Tirosina-Proteína Quinase JAK3
MDM2	Proto-Oncogene MDM2
MMP2	Metaloproteinase da matriz 2
MMP9	Metaloproteinase da matriz 9
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina quinase
mTORC1	Complexo 1 da via mTOR
mTORC2	Complexo 2 da via mTOR
MOMP	Permeabilidade à membrana externa mitocondrial
NaCO₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

NFkB	Fator nuclear kappa B
NOXA	Proteína Noxa
OMI	Serina Proteinase
<i>P. guajava</i>	<i>Psidium guajava</i>
PBS	Solução tampão
PCR-RT	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase 1
pH	Potencial de hidrogênio
PI3K	Fosfoinosítídeo-3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína quinase C
PTEN	Homólogo de tensina
PUMA	Fator pró-apoptótico
p53	Supressor tumoral p53
p21	Proteína quinase inibidora de ciclo celular com peso de 21kDa
p27	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B
RF	Fator de retenção
Rho	Rho GTPase
SGK1	Quinase 1 regulada por soro e glicocorticoides
SMAC	Segundo ativador de caspase derivado de mitocôndrias
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TMZ	Temozolomida
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Tsc1/2	Complexo da esclerose tuberosa
XIAP	Inibidor de apoptose ligado ao X

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
M	Metros
cm	Centímetros
kDa	Kilodalton
ml	Mililitro
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
mg	Miligrama
nm	Nanómetro
C	Carbono
µl	Microlitro
N	Nitrogênio
mm	Milímetro
µm	Micrómetro
CO₂	Dióxido de Carbono
mM	Milimolar
M	Molar
<	Menor
>	Maior
IC₅₀	Metade da concentração inibitória máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Psidium guajava</i>	13
1.1.1 Composição química	13
1.1.2 Bioatividade dos compostos presentes nas folhas de <i>P. guajava</i>	14
1.2 Glioblastoma	15
1.2.1 Classificação histológica e molecular no GBM	16
1.3 Vias de sinalização e GBM	17
1.3.1 <i>PI3K/AKT/mTOR</i>	17
1.3.2 <i>TP53</i>	20
1.3.2.1 Funções mitocondriais controladas pela via p53	21
1.3.2.2 Via p53 e a autofagia	22
1.3.2.3 Via p53 e a hipóxia	22
1.3.2.4 Via p53 e o ciclo celular	22
1.3.3 Apoptose	24
1.4 Invasão e GBM	26
1.5 Inflamação e GBM	27
1.6 Bioativos de plantas medicinais como proposta terapêutica no GBM	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 Geral	32
2.2 Específicos	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Padronização do extrato fitoterápico e obtenção das frações	33
3.2 Atividade antioxidante	33
3.3 Análise de citotoxicidade in vitro por hemólise	34
3.4 Análises fitoquímicas qualitativas e quantitativas	34
3.5 Análises Cromatográficas	35
3.6 Linhagens celulares	37
3.7 Tempo de dobramento	37
3.7.1 Cultivo e análise da morfologia celular	37
3.8 Índice de citotoxicidade celular	39
3.9 Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular	39

3.10 Imunoensaio para dosagem de citocinas	40
3.11 Ensaio cometa	40
3.12 Análise da expressão proteica de AnxA1, IKK, JAK1, JAK3, MDM2 e STAT3	42
3.13 Análise da expressão proteica de AnxA1, BAX, MMP2 e MMP9	42
3.14 Análise da expressão gênica de <i>TP53</i> , <i>NFkB</i> e <i>mTOR</i>	43
3.14.1 Genes alvo	43
3.15 Ensaio apoptose	45
3.16 Análises estatísticas	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Caracterização fitoquímica	46
4.1.1 Terpenos, compostos fenólicos e alcaloides no EB e frações	46
4.1.2 Análises cromatográficas identificaram compostos fitoquímicos no EB e FAE	47
4.1.3 EB e FAE possuem maiores taxas de atividade antioxidante	48
4.1.4 EB e frações possuem baixa toxicidade no teste de hemólise	49
4.2 Cultura celular	49
4.2.1 Tempo de dobramento das células	49
4.2.2 O tratamento com FAE não altera a morfologia das células	49
4.2.3 A FAE diminui a proliferação celular nas linhagens A172 e U87-MG	50
4.2.4 FAE e a viabilidade celular das células endoteliaias e tumorais	51
4.2.5 FAE induziu danos ao DNA das células tumorais	52
4.2.6 Dosagem de citocina	54
4.3 Expressão proteica	56
4.3.1 O tratamento com FAE alterou a expressão das proteínas Anexina A1, IKK, JAK1, JAK3, MDM2 e STAT3	56
4.3.2 O tratamento com FAE alterou a expressão das proteínas ANXA1, BAX, MMP2 e MMP9	58
4.3.3 O tratamento com FAE reduziu a expressão gênica de <i>mTOR</i> , <i>TP53</i> e <i>NFkB</i>	61
4.3.4 A FAE induziu a morte celular nas linhagens tumorais	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	67

1. INTRODUÇÃO

1. 1 *Psidium guajava*

Psidium guajava é uma árvore nativa da América do Sul e sul do México, atualmente cultivada em áreas de clima tropical e subtropical, sendo a mais importante espécie da família Myrtaceae e popularmente chamada de goiaba (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017; Ruksiriwanich *et al.*, 2022).

A árvore pode atingir de 3 a 10 m de altura, possui raiz superficial e cascas lisas, esverdeadas ou amarronzadas (Embrapa, 2010). As folhas são longas dispostas de forma oposta com veias ramificadas (Figura 1) e as flores são brancas com quatro a cinco pétalas, 2 cm de comprimento, estames em forma de pincel e possui aroma (Irshad *et al.*, 2020).

Os frutos são do tipo baga, com casca verde-clara a amarelo, ovóides com diâmetros entre 3 e 10 cm e o peso varia de 100 g a 450 g, restando 4 a 5 pétalas nos frutos (Embrapa, 2010; Irshad *et al.*, 2020). A polpa é carnuda, podendo ser de cor branca, amarela ou vermelha e as sementes são numerosas e amareladas (Embrapa, 2010).

Figura 1 – Folhas de *Psidium guajava*.



Fonte: Elaborado pela autora.

1.1.1 Composição química

As folhas, frutos e sementes de goiaba contêm quantidades significantes de fenóis, óleo essencial, taninos, lectinas e vitaminas (Jamieson *et al.*, 2023). O fruto, possui grande quantidade de vitaminas A, C, E, K além de pectina, licopeno, potássio, fósforo, cálcio e magnésio; já as folhas possuem muitos flavonoides, especialmente a quercetina (Irshad *et al.*, 2020; Tousif *et al.*, 2022).

A goiaba é considerada uma superfruta por conter fibra dietética, minerais dietéticos, potássio, manganês, cobre, ácido fólico e vitaminas. Ainda; a goiaba contém quatro vezes mais vitamina C que as laranjas, além de nutrientes de baixa caloria (Jamieson *et al.*, 2023). Rica em antioxidantes, a fruta fresca apresenta alto nível de ácido ascórbico, miricetina e apigenina; ou seja, a grande quantidade de metabólitos fenólicos são responsáveis por sua alta atividade antioxidante e antidiabética. Entretanto, sua composição química pode variar de acordo com a estação, estágio de maturação e espécie (Irshad *et al.*, 2020; Tousif *et al.*, 2022).

A espécie e práticas do cultivo, por exemplo o tipo de solo, clima, irrigação, poda, entre outras podem influenciar na concentração dos compostos químicos (Irshad *et al.*, 2020).

1.1.2 Bioatividade dos compostos presentes nas folhas de *P. guajava*

A planta é usada no mundo todo devido a fruticultura para a alimentação, bem como planta medicinal (Tousif *et al.*, 2022). Embora a composição nutricional nas diferentes partes da goiaba varie, a fruta é considerada uma excelente fonte de ácidos ascórbicos, fenóis e carotenoides; além de 30,9% de fibra alimentar antioxidante; o que a torna uma importante fonte para prevenção de doenças crônicas (Tousif *et al.*, 2022). Extratos de folhas de goiaba possuem maior propriedade antioxidante, quando comparados aos frutos e sementes (Irshad *et al.*, 2020).

Principalmente nas folhas da *P. guajava* são encontrados metabólitos secundários como polifenóis, taninos, flavonoides, flavonas, proantocianidinas, benzoferonas, antocianidinas, óleo essencial, sesquiterpenóides, triterpenóides e saponinas (Jamieson *et al.*, 2023; Tousif *et al.*, 2022). Esses compostos possuem propriedades antidiarreicas, antioxidantes, antimicrobianas, hepatoprotetoras, hipoglicêmicas, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias e antivirais (Jamieson *et al.*, 2023; Tousif *et al.*, 2022).

Jiang e colaboradores (2020), identificaram os potenciais alvos correspondentes aos compostos bioativos presentes nas folhas de goiaba; e indicaram que esses compostos são capazes de regular a via Fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K)/AKT e a via de resistência a insulina (Jiang *et al.*, 2020). Além disso, extratos metanólicos e de acetato de etila diminuíram a quantidade de substâncias hepatotóxicas (Irshad *et al.*, 2020).

Os compostos bioativos da *P. guajava*, como o ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides (apigenina) e licopeno, também apresentam efeito antitumoral (Jamieson *et al.*, 2023; Tousif *et al.*, 2022). Os Psiguadialais A e B, sesquiterpenóides-difenil-metano e meroterpenóides isolados das folhas de goiaba tiveram fortes influências protetoras no desenvolvimento de hepatocarcinoma (Irshad *et al.*, 2020).

Estudos descrevem a ação antioxidante dos terpenos, compostos fenólicos e carotenoides, como os flavonoides, vitamina C e E encontrados em diferentes partes da planta como folhas, frutos, sementes, cascas, polpa e óleo, capazes de reduzir a ação de radicais livres, e neutralizando a toxicidade e mutagenicidade, assim prevenindo o câncer ou até mesmo atuando na migração e crescimento das células tumorais (Jamieson *et al.*, 2023; Lok *et al.*, 2023; Tousif *et al.*, 2022).

A mistura enriquecida com terpenos da goiaba como o guajadial, psidial A e psiguadial A e B é capaz de inibir a proliferação de linhagens tumorais humanas de leucemia, mama, ovário, pulmão, melanoma, próstata, cólon e rim (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017).

A goiaba apresenta efeito antitumoral na migração celular e crescimento do tumor, inibindo a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), interleucinas (IL-6, IL-8) e metaloproteinases (MMP2 e MMP9) (Jamieson *et al.*, 2023); além do efeito citotóxico e apoptótico da fração hexano, suprimindo a via de sinalização Serina/Treonina quinase 1 (AKT)/ Alvo mecanístico da rapamicina quinase (mTOR) em câncer de próstata (Hosseini *et al.*, 2023; Jamieson *et al.*, 2023).

O óxido β -cariofileno, apresenta efeito citotóxico e apoptótico em várias linhagens tumorais, suprimindo a via *PI3K/AKT/mTOR* e a expressão de genes anti-apoptóticos; além de induzir a expressão de p53 e p21 (Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017a; Joshi *et al.*, 2023).

1.2 Glioblastoma

O câncer é um problema mundial de saúde pública, e, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se 11.490 novos casos de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo 6.110 em homens e 5.380 em mulheres para cada ano do triênio 2023-2025 no Brasil (INCA, 2023). Entre os tumores do SNC, o glioblastoma

(GBM) é o tumor primário maligno mais comum em adultos, correspondendo a 49,1% de todos os tumores malignos cerebrais (Ostrom *et al.*, 2021).

O tratamento padrão consiste em cirurgia, radioterapia e quimioterapia com Temozolomida (TMZ); entretanto, o prognóstico é sombrio e pacientes com GBM apresentam baixa sobrevida global (mediana ~15 meses); com taxa de 6,8% em 5 anos (Chukwueke & Wen, 2019; Lin *et al.*, 2022; Ostrom *et al.*, 2021; Stupp *et al.*, 2009).

O microambiente tumoral é um fator importante na redução da sobrevida dos pacientes devido à imunossupressão; além da própria TMZ contribuir para a supressão imunológica intratumoral e induzir a linfopenia (Song *et al.*, 2021; Zhenjiang *et al.*, 2018).

A elevada infiltração difusa tecidual é a mais provável fonte de recorrência após a terapia; pois as células tumorais escapam da ressecção total, permanecem infiltradas no tecido cerebral, não recebem a dose mais alta de radioterapia e envolvem regiões com barreira hematoencefálica (BHE) intacta, o que diminui a biodisponibilidade de quimioterápicos. Associado a isso ocorre alta taxa de proliferação, vascularização, apoptose desregulada e necrose, o que resulta em uma elevada mortalidade (Louis *et al.*, 2016).

1.2.1 Classificação histológica e molecular no GBM

A classificação dos gliomas difusos por muito tempo, baseou-se nas características histológicas e morfológicas do tumor; no entanto, biomarcadores moleculares permitem maior acurácia no prognóstico (Louis *et al.*, 2021).

Em 2016, a WHO (*World Health Organization*) padronizou a classificação para estes tumores, considerando-se a classificação integrada entre histológica e molecular, permitindo melhor classificação do tumor, predição e a escolha das estratégias de tratamento mais precisas (Louis *et al.*, 2016).

Atualmente, a WHO reclassificou os gliomas difusos adultos em três tipos: *Astrocitoma IDH-mutante*, *Oligodendroglioma IDH-mutante e codeleção de 1p/19q*; e *Glioblastoma IDH-tipo selvagem* (Louis *et al.*, 2021). Dessa forma, além dos critérios histológicos e padrão de crescimento tumoral, inclui-se também características moleculares.

Apesar do Glioblastoma não apresentar mutação no gene Isocitrato desidrogenase (*IDH*), geralmente exibe amplificação ou mutação do Receptor do fator

de crescimento epidérmico (*EGFR*), Proto-Oncogene (*MDM2*) e inibidor de quinase dependente de ciclina 2A/B (*CDKN2A/B*), neurofibromatose tipo 1 (*NF1*), mutações no promotor da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*) e síndrome alfa-talassemia/retardo mental ligada ao cromossomo X (*ATRX*) (El Khayari *et al.*, 2022).

Outro biomarcador preditivo de resposta à quimioterapia é o gene O-6-metilguanina DNA metiltransferase (*MGMT*); pois trata-se de uma enzima de reparo de DNA que remove danos produzidos por agentes alquilantes como a TMZ (Wang *et al.*, 2023)

1.3 Vias de sinalização e GBM

1.3.1 *PI3K/AKT/mTOR*

A superexpressão do Receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) ocorre em 70-90% dos GBMs com amplificação do gene (Louis *et al.*, 2016). *EGFRvIII* (variante três) resulta da deleção dos exons 2 a 7 do domínio extracelular do receptor, resultando em uma proteína truncada de 145 kDalton, constitutivamente ativa (Garima *et al.*, 2022).

Outra variante encontrada nas células-tronco de GBM é a variante *EGFRx*, que não possui os exons 2-7, também possui ausência dos exons 2-14 e codifica uma proteína EGFR que ativa constitutivamente STAT5 resultando na progressão tumoral (Huang *et al.*, 2024).

A expressão de *EGFRvIII* resulta na hiperfosforilação de *EGFR*, ativando vias como Proto-oncogenes (*RAS*)/Mitogen-Activated Protein Kinase (*MAPK*), Tirosina-Proteína Quinases (*JAK*)/ativador de transcrição (*STAT*) e preferencialmente a via de transdução de sinal *PI3K/AKT* (Garima *et al.*, 2022). *PI3K/AKT/mTOR* é responsável pela regulação do crescimento, motilidade, proliferação, apoptose, invasão, angiogênese, metástase, tráfego vesicular e sobrevivência (Glaviano *et al.*, 2023; Louis *et al.*, 2016, 2021).

As vias de sinalização *PI3K/AKT* e do *mTOR* atuam tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, sendo crucial no câncer; pois regulam o crescimento celular e parada do ciclo, apoptose e tradução de mRNA (Porta *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2021).

Existem três classes diferentes de *PI3Ks* que diferem em estrutura e substratos específicos; porém, a classe I é a mais comum no câncer humano (Wong *et al.*, 2021).

Os PI3Ks de classe I são heterodímeros formados por uma subunidade catalítica (p110) e outra adaptadora/reguladora (p85) (Porta *et al.*, 2014).

A ligação de citocinas ou fatores de crescimento aos receptores resulta na autofosforilação dos resíduos de tirosina, recrutando PI3K para a membrana e ligando-se aos resíduos de fosfotirosina dos receptores ou adaptadores do fator de crescimento através de um dos domínios com homologia de Src 2 (SH2) presente na unidade adaptadora (Porta *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2021).

Após sua ativação, PI3K leva à produção de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PI3,4,5-P3, também chamada de PIP3) a partir do substrato fosfatidilinositol-4,4-bifosfato (PI-4,5-P2, também chamada de PIP2), que recruta proteínas sinalizadoras como proteína serina/treonina quinase-3'-fosfoinosítídeo quinase 1 dependente (PDK1) e AKT/ proteína quinase B (PKB), que regula mecanismos envolvidos na sobrevivência celular e progressão do ciclo celular (Porta *et al.*, 2014).

As proteínas AKT possuem um domínio de homologia pleckstrina que apresenta afinidade com PIP3 e PIP2, e esta ligação de fosfolípídeos desencadeia a translocação de AKT quinases para a membrana celular por PIP3, após a fosforilação por PIP2 pelo PI3K (Bao *et al.*, 2021).

AKT/PKB pode atuar na sobrevivência celular, inativando fatores pró-apoptóticos como BAD e procaspase-9; bem como Faz-ligante (Faz-L); além de ativar a quinase I κ B (IKK), que regula positivamente o fator de sobrevivência Fator nuclear kappa B (NF κ B) (Bao *et al.*, 2021; Glaviano *et al.*, 2023; Porta *et al.*, 2014).

Uma das proteínas alvo de AKT é mTOR, capaz de regular o crescimento e proliferação celular através da biossíntese de ciclina D1, fator induzível por hipóxia (HIF) e VEGF (Wong *et al.*, 2021). A atividade de mTOR em células normais é controlada por reguladores positivos, como fatores de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e seu receptor cognato (IFGR-1), membros da família do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER) e ligantes associados e receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFRs) e seus ligantes (Porta *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2021).

Os reguladores negativos de mTOR incluem fosfatase e homólogo de tensina (PTEN); pois inibe a sinalização através de PI3K/AKT e o complexo de esclerose tuberosa (TSC1) e (TSC2) (Yang *et al.*, 2022). A via mTOR atua como um efetor crucial nas vias de sinalização celular regulando processos como a apoptose,

autofagia, síntese proteica, metabolismo energético e angiogênese, sendo sugerido como um importante alvo terapêutico (Javid *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2022).

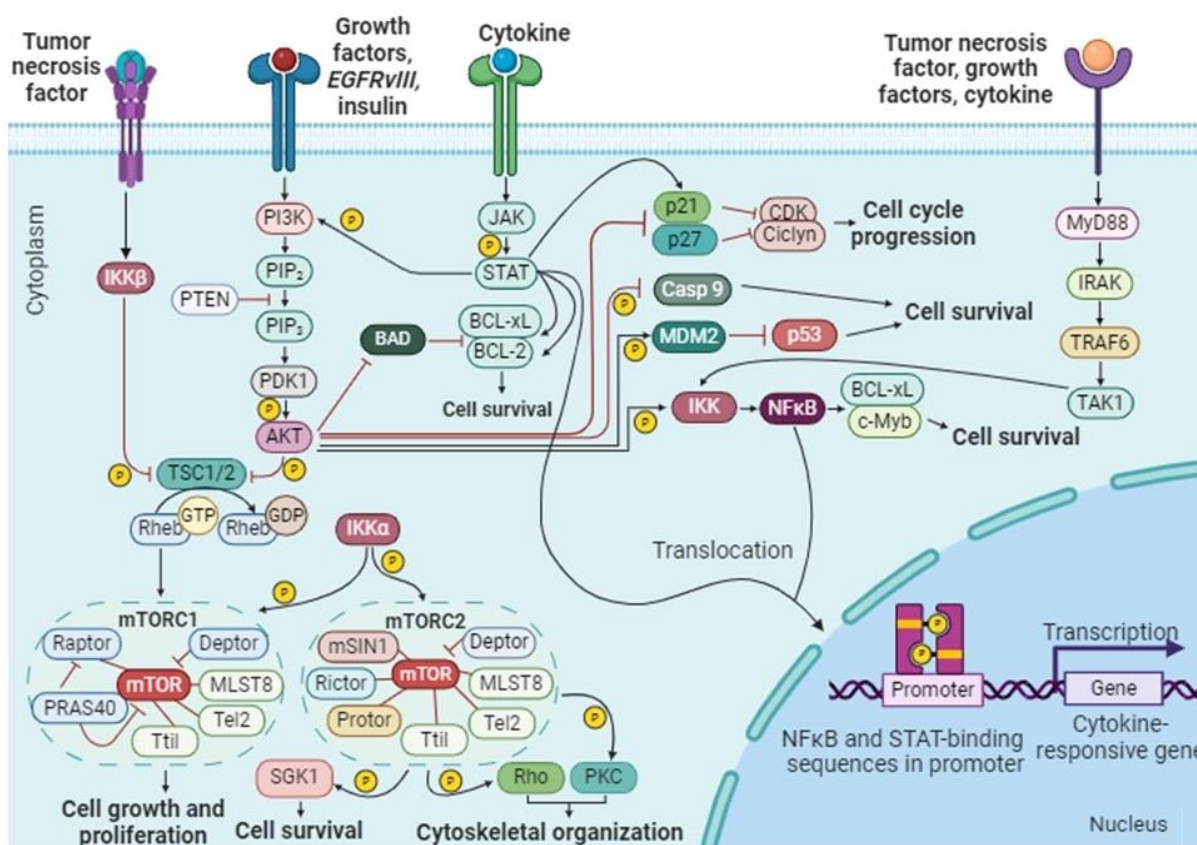
O mTOR é composto por dois complexos funcionalmente distintos nas células: mTORC1 e mTORC2 (Porta *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2022). O mTORC1 é composto por mTOR, Raptor, mLST8 e PRAS40; além de ativar a proteína ribossômica S6 quinase p70 (S6K) e inativar a proteína 1 de ligação a eIF4E (4EBP1), resultando na tradução de proteínas e crescimento celular (Hay & Sonenberg, 2004; Memmott & Dennis, 2009). O mTORC2 é composto por mTOR, Rictor, Sin1 e mLST8 (Memmott & Dennis, 2009; Porta *et al.*, 2014). Esse complexo pode ativar AKT e promover a proliferação e sobrevivência celular; além de inibir a apoptose o que corrobora com a tumorigênese (Memmott & Dennis, 2009; Porta *et al.*, 2014).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) e/ou seu receptor (EGFR), altamente mutado e ativado constitutivamente no GBM, também atua como ativador de NFkB (Gray *et al.*, 2014). Inclusive, o EGFR oncogênico ativa NFkB através do mTORC2, promovendo uma cascata de sinalização que promove a quimioresistência (Tanaka *et al.*, 2011).

No câncer, mutações em PI3K e suas subunidades reguladoras e a perda de PTEN pode levar a ativação exacerbada de PI3K, independente dos fatores de crescimento, desregulando mTOR (Wong *et al.*, 2021). A quinase 1 regulada por soro e glicocorticoides (SGK1), extremamente dependente da fosforilação de mTOR, medeia processos importantes como a proliferação celular através da fosforilação de Mouse Double minutes 2 (MDM2), que atua na ubiquitinação de p53 e degradação proteossomal (Talarico *et al.*, 2016).

A figura 2 resume as principais vias de sinalização abordadas nesse estudo; bem como possíveis interações entre elas.

Figura 2 – Principais vias de sinalização. Fatores de necrose tumoral, crescimento, insulina ou citocinas resultam na ativação de PI3K, que leva à produção de PIP3 a partir de PIP2, recruta PDK1 e fosforila AKT. Reguladores negativos de mTOR incluem PTEN e TSC1/2. IKK α fosforila os complexos mTOR. mTORC2 fosforila SGK1 e Rho e PKC, envolvidos nos processos de sobrevivência e organização do citoesqueleto, respectivamente. I κ B (IKK) ativa NF κ B, que induz a expressão de genes pró-inflamatórios. AKT também pode inativar BAD, que por sua vez, inativa BCL-xL e BCL-2, presentes na via JAK/STAT resultando também na sobrevivência celular. A inativação de p21, p27 e da fosforilação da caspase 9, mediadas por AKT também podem resultar na progressão do ciclo e sobrevivência. A fosforilação de MDM2 regula negativamente a atividade de p53. Criado com BioRender.com.



Fonte: Elaborado pela autora.

1.3.2 TP53

O gene supressor tumoral *TP53*, localizado no cromossomo humano em 17p13.1 é responsável por codificar a proteína p53 que possui 393 aminoácidos em sua composição e desempenha um papel crucial na homeostase celular (Zhang *et al.*, 2018). A proteína p53 atua como fator de transcrição controlando genes responsivos durante o estresse celular, a fim de garantir a estabilidade e integridade genômica, além de prevenir a tumorigênese, controlar a proliferação celular e sobrevivência (Figura 3) (Shi *et al.*, 2020; Y. Zhang *et al.*, 2018).

Ainda, a p53 contribui para respostas adaptativas a mudanças no âmbito celular, na disponibilidade de oxigênio e nutrientes; nos metabolismos do piruvato e aminoácidos, na biossíntese e oxidação de ácidos graxos, no metabolismo do ferro, hipóxia, mitofagia, autofagia, além da capacidade de promover a apoptose através da indução de membros da família BCL-2 (Lahalle *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2018).

Na presença de sinais de estresse, a proteína p53 é capaz de regular positivamente o gene *PTEN* e inibir tanto a via IGF-1-AKT quanto a via mTOR de acordo com a disponibilidade de nutrientes (Chen *et al.*, 2020). A p53 está alterada em aproximadamente 90% dos GBMs, porém é de suma importância por atuar no ponto de verificação da fase G1 em resposta ao dano no DNA, ativando a transcrição de p21 e reparando o DNA antes da divisão celular (Louis *et al.*, 2016; Y. Zhang *et al.*, 2018).

Entre essas alterações são descritas mutações somáticas ou germinativas; além de outras alterações genéticas ou epigenéticas capazes de modificar a atividade de reguladores da proteína p53 e promover a carcinogênese (Lahalle *et al.*, 2021). Além da mutação com ganho de função promover a inflamação por meio da sinalização do fator de necrose tumoral (TNF- α) através do NFkB e impactando de forma negativa na sobrevida; a superexpressão correlaciona-se com pior prognóstico em GBM; podendo contribuir como marcador ou alvo para futuras terapias (Ham *et al.*, 2019; Y. Zhang *et al.*, 2018).

1.3.2.1 Funções mitocondriais controladas pela via p53

A proteína p53 controla inúmeras funções mitocondriais, ao começar pelo controle da replicação e integridade do genoma mitocondrial, arquitetura e dinâmica mitocondrial, além da atividade da cadeia de transporte de elétrons e o fluxo de várias vias metabólicas que ocorrem nas mitocôndrias (Lahalle *et al.*, 2021).

Em resposta ao estresse oxidativo ou hipóxia, MDM2 presente na mitocôndria se transloca para a matriz mitocondrial, regulando a respiração através do sequestro de NADH; no entanto essa homeostase mitocondrial é controlada por MDM2, e se a respiração não for eficiente, é necessária a reciclagem das mitocôndrias através da autofagia (Lahalle *et al.*, 2021).

1.3.2.2 Via p53 e a autofagia

Além de regular a mitofagia, a p53 também regula a macroautofagia, processo que leva à síntese de vesículas formadas por membrana dupla que se fusionam com os lisossomos, a fim de reciclar macromoléculas e manter os metabólitos no interior da célula (Lahalle *et al.*, 2021).

Dependendo do dano ou estresse celular, p53 inibe ou estimula a autofagia através de vários mecanismos, um deles é a regulação da quinase mTORC1 que irá controlar o processo autofágico e a regulação de membros da família BCL-2 (Lahalle *et al.*, 2021).

1.3.2.3 Via p53 e a hipóxia

A redução dos níveis de oxigênio resulta em uma resposta celular coordenada por fatores de transcrição do HIF, além de membros da via p53 (Lahalle *et al.*, 2021).

Louis e colaboradores (2016) descrevem a hipóxia como um mecanismo capaz de promover a invasão tumoral pela ativação de HIF1, devido a mecanismos pró angiogênicos e efeitos diretos que induzem a migração celular tumoral (Louis *et al.*, 2016). A interação entre HIF1 α e MDM2, inibe a degradação de p53, pois a regulação negativa de MDM2 resulta na ativação de p53 em células neuronais hipóxicas (Lahalle *et al.*, 2021).

1.3.2.4 Via p53 e o ciclo celular

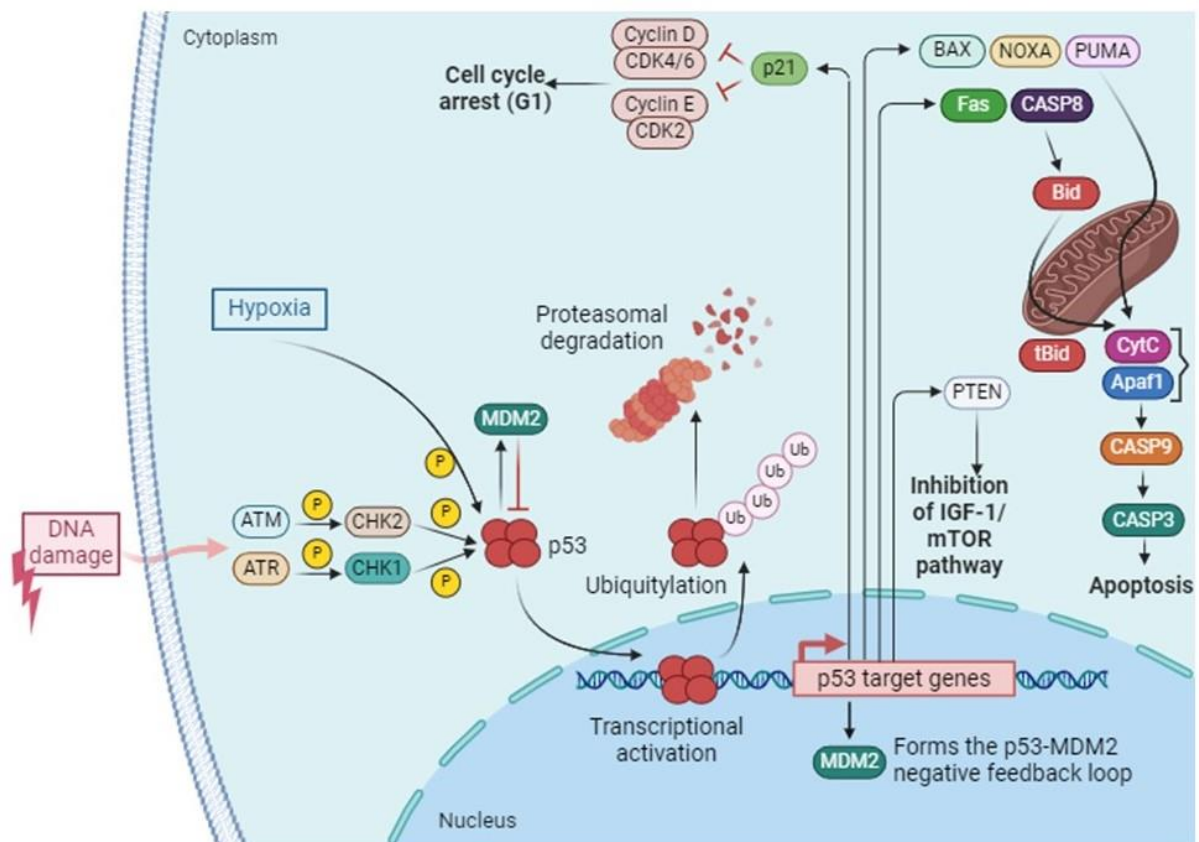
Os pontos de verificação do ciclo celular são cruciais para garantir a integridade genômica; pois caso o dano seja sustentável, sua ativação é acionada por sensores de ponto de verificação e ativadores de p53, como as Serina/Treonina Quinases (ATM e ATR) que estabilizam p53 e essa proteína, por sua vez, interrompe o ciclo celular para promover a transcrição de proteínas de reparo (Hernández Borrero & El-Deiry, 2021).

A proteína p21 é um inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK), importante no controle da progressão do ciclo celular ao interagir de forma direta e inibir complexos de CDK (Hernández Borrero & El-Deiry, 2021; Shamloo & Usluer, 2019). Como p21 interage com inúmeros complexos de CDK expressos ao longo do ciclo celular, acaba resultando na parada do ciclo em diferentes fases do ciclo celular, embora haja maior afinidade com as CDKs envolvidas na fase G1/S (Hernández Borrero & El-Deiry, 2021).

Essa interação de p21 com as ciclinas E/CDK2 e D/CDK4 promove a hiperfosforilação de Rb, resultando na liberação de E2F que regula a expressão de genes importantes na proliferação celular (Hernández Borrero & El-Deiry, 2021; Johnson & Schneider-Broussard, 1998). Já a associação de p21 com a ciclina B/CDK1 interrompe o ciclo celular na fase G2/M (Hernández Borrero & El-Deiry, 2021).

A figura 3 resume as principais vias de sinalização relacionadas a via de sinalização p53.

Figura 3 – Via de sinalização da proteína p53. Em resposta ao dano no DNA, ativação de oncogenes ou hipóxia as proteínas ATM e ATR fosforilam CHK2 e CHK1, respectivamente. Essas quinases, por sua vez, fosforilam e estabilizam p53, inibindo a interação com seu regulador negativo MDM2. A ubiquitinação ocorre para a degradação proteossomal de p53 e é mediada por MDM2. Além da transcrição de genes alvos, a p53 interage com BAX ou BCL-2 e está envolvida na indução da apoptose também pela transcrição de FAS. P53 transativa FAS, BAX, BAK, Bid, NOXA e PUMA, resultando na revogação e/ou degradação de membros da família BCL-2, MOMP, liberação de citocromo C e na ativação de caspases. A proteína p21 inibe complexos de CDK e resulta na parada do ciclo celular. *PTEN* é um dos genes alvos de p53, que inibe as vias IGF-1-AKT/mTOR. Criado com BioRender.com.



Fonte: Elaborado pela autora.

1.3.3 Apoptose

A morte celular programada ou apoptose celular é um processo biológico imprescindível no desenvolvimento normal e homeostase. Todavia, a regulação anormal desse processo pode resultar em diversas patologias como distúrbios imunológicos, neurodegenerativos e câncer (Morana *et al.*, 2022; Tait & Green, 2010).

Fatores como a hereditariedade ou defeitos adquiridos nas vias de morte celular estão fortemente associados à tumorigênese; alterações no aumento da expressão de genes anti-apoptóticos como *BCL-2* ou a redução da expressão do gene apoptótico *BAX* (Lopez *et al.*, 2022).

A promoção da apoptose por p53 ocorre tanto pela via intrínseca através da expressão e interação com membros da família *BCL-2* presentes na mitocôndria, quanto pela via extrínseca, ao aumentar a transcrição de *FAS*, ambas as vias representadas na figura 4 (Shi *et al.*, 2020).

Na via extrínseca ou via do receptor de morte, a detecção de um estímulo externo ativa receptores de membrana da família do receptor do TNF, recruta moléculas adaptadoras como a proteína de domínio de morte associada a *FAS* (*FADD*), que após ligar-se, ativa a caspase iniciadora 8 (Tait & Green, 2010). A ligação do ligante TNF ao seu receptor, resulta na ativação de *NFκB* e induz a inflamação (Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). A caspase 8 cliva e ativa as caspases efetoras 3 e 7 (Birkinshaw & Czabotar, 2017; Lopez *et al.*, 2022).

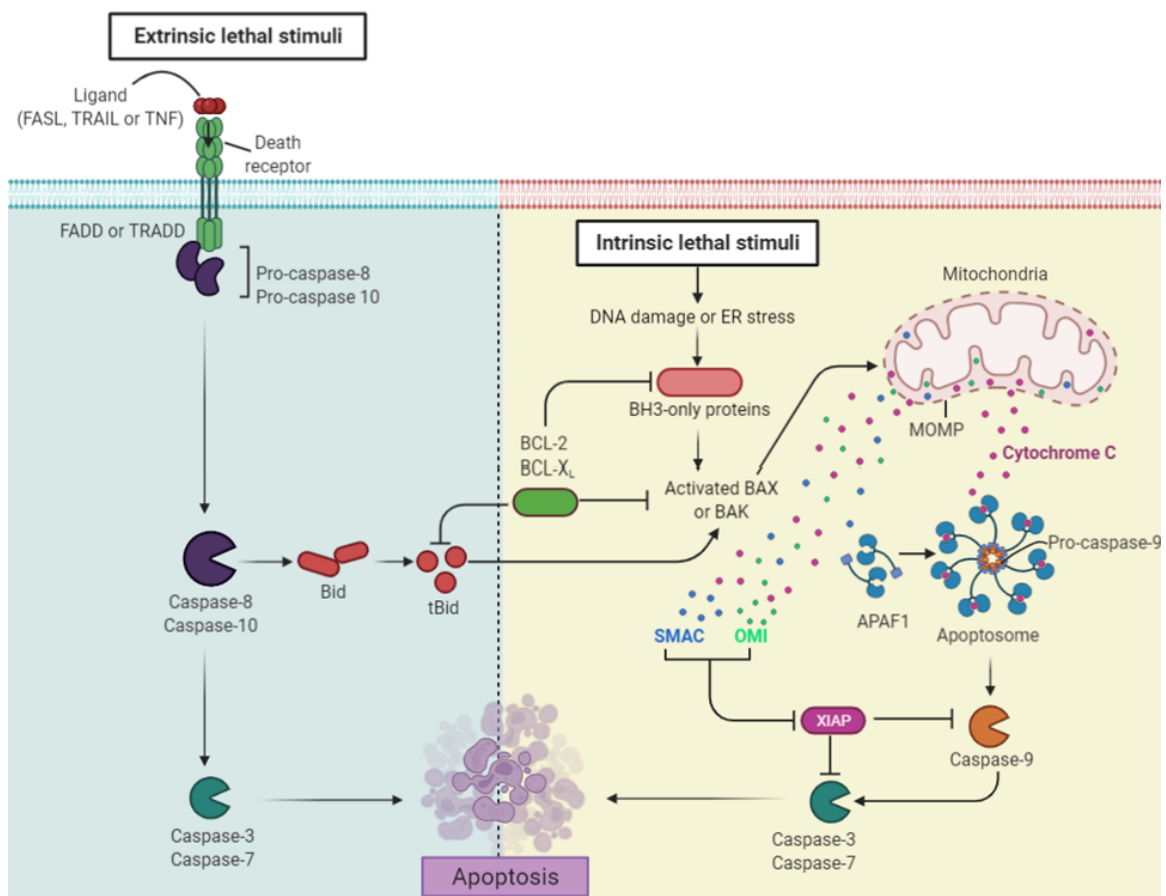
No GBM, o ligante 10 da superfamília do Fator de Necrose Tumoral (*TNFSF10*) induz a apoptose ao ligar-se com o membro 10B da superfamília do Receptor do Fator de Necrose Tumoral (*TNFRSF10B*); o que resulta na ativação da caspase 8 (Louis *et al.*, 2016).

O gene regulador de apoptose *BCL-2* e outros membros da família *BCL-2* são essenciais, regulando a integridade da membrana mitocondrial de células saudáveis e sua permeabilização em resposta à estímulos apoptóticos (Lopez *et al.*, 2022).

Na via intrínseca ou via mitocondrial, a ativação ocorre a partir do dano ao DNA causado por substâncias tóxicas ou privação de fator de crescimento (Birkinshaw & Czabotar, 2017; Tait & Green, 2010). *BAX* e *BAK* são os principais efetores dessa via; quando ativadas, permeabilizam a membrana externa mitocondrial (*MOMP*), o que leva à liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo C, o segundo ativador de caspase derivado de mitocôndrias (*SMAC*)/inibidor direto de apoptose (*DIABLO*) e a Serina Proteinase (*OMI*) presentes no espaço intramembranar, conduzindo a

ativação de caspases (Tait & Green, 2010; Tirapelli *et al.*, 2017). Após ser liberado pela mitocôndria, o citocromo C se liga ao fator de ativação pró apoptótico 1 (APAF1) e forma o apoptossomo, responsável pela ativação de um iniciador caspase 9, desencadeando uma cascata de caspases que cliva e ativa as caspases 3 e 7 (Tait & Green, 2010; Tirapelli *et al.*, 2017). Todavia, o inibidor de apoptose ligado ao X (XIAP) medeia a resistência à apoptose ao ser capaz de suprimir a atividade das caspases, e resultar em uma baixa sobrevida de pacientes com GBM (Tirapelli *et al.*, 2017). A figura 4 resume as principais vias de sinalização da apoptose.

Figura 4 – Via de sinalização da apoptose. Na via extrínseca, TNF é ativado e recruta FAS (FADD) que se liga e ativa as caspases 8 e 10. Essas por sua vez, clivam e ativam as caspases 3 e 7 efetoras da apoptose. Na via intrínseca, após o dano no DNA são ativados BAX e BAK e permeabilizam a membrana externa mitocondrial (MOMP), o que leva à liberação de citocromo C, SMAC/DIABLO e OMI. O citocromo C se liga ao APAF1 e forma o apoptossomo, que ativa a caspase 9, desencadeando a cascata de caspases que cliva e ativa as caspases 3 e 7 e leva à apoptose. XIAP é um supressor da atividade das caspases. Criado com BioRender.com.



Fonte: Elaborado pela autora.

1.4 Invasão e GBM

Mecanismos que promovem a propriedade invasiva nas células de GBM incluem motilidade, interações célula-matriz e célula-célula, remodelação de matriz extracelular (MEC) e microambiente (Louis *et al.*, 2016).

A MEC é composta por centenas de moléculas que interagem de forma complexa e extremamente organizada (Belousov *et al.*, 2019). Glicoproteínas estruturais (colágenos, elastinas, fibronectinas e lamininas), proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs) são as principais macromoléculas presentes na MEC (Belousov *et al.*, 2019).

Entender como a MEC se comporta é importante, por estar envolvida com a determinação do destino celular, migração, maturação, diferenciação celular, sobrevivência, homeostase tecidual e invasão de células tumorais (Belousov *et al.*, 2019).

Quase todos os tipos tumorais secretam altos níveis de IL-6 e devido à influência direta dessa citocina com a invasividade de alguns tipos tumorais, a alta expressão de IL-6 está associada ao mau prognóstico (Li *et al.*, 2010). Essa regulação autócrina de IL-6 no GBM é descrita desde 1990, e a interação dessa citocina com a via JAK/STAT, pode induzir a invasão no GBM, além de favorecer a formação do tumor e a angiogênese (Li *et al.*, 2010).

A IL-6 ao se ligar ao receptor, ativa JAKs que induzem a fosforilação de STAT3 e promove a translocação para o núcleo (Aliyu *et al.*, 2022). No núcleo, STAT3 é capaz de regular a expressão de MMP2 e MMP9 (Aliyu *et al.*, 2022). Ao secretar enzimas proteolíticas, como as MMP2 e MMP9 que desorganizam a MEC, as células tumorais se tornam extremamente invasivas (Louis *et al.*, 2016).

Os astrócitos associados ao tumor também secretam proteases e citocinas, como a IL-6, a fim de aumentar a expressão de MMPs pelas células tumorais (Chouleur *et al.*, 2020). A ativação recíproca entre as células tumorais e os astrócitos associados ao tumor apura os processos de migração e invasão através da atividade constitutiva de STAT3 e a expressão a jusante de IL-6 na célula tumoral, que por sua vez, ativa STAT3 e aumenta a expressão de IL-6 nos astrócitos associados ao tumor (Chouleur *et al.*, 2020).

Outro fator importante é a expressão de vários receptores de integrinas que atuam na interação entre moléculas e o espaço extracelular, levando a alterações no citoesqueleto e ativando vias como AKT, mTOR e MAPK (Louis *et al.*, 2016). A

interação da integrina $\beta 3$ com a variante mutante *EGFRvIII* induz a ativação das vias de sinalização das kinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2)/(MAPK), AKT e STAT3 no GBM; além de regular positivamente MMP2 e MMP9 promovendo a invasão (Monteiro *et al.*, 2017).

Geralmente essas integrinas são recrutadas para a membrana das células tumorais em resposta à hipóxia; pois essa baixa oxigenação tumoral promove a invasão das células tumorais no cérebro saudável a fim de evitar esse ambiente desfavorável (Monteiro *et al.*, 2017).

1.5 Inflamação e GBM

No SNC, a inflamação é atribuída à oncogênese do GBM (Ham *et al.*, 2019; Zhenjiang *et al.*, 2018). O fato de as células tumorais terem a capacidade de transformar a resposta imune em inflamação crônica, favorece a recidiva tumoral através da nutrição de células tronco tumorais, transição epitélio-mesênquima e resulta em multirresistência (Chen *et al.*, 2022).

A micróglia é a célula imune inata mais abundante no neuroparênquima e sua ativação pode levar ao reparo ou ruptura da BHE; inclusive, durante a inflamação, a micróglia e células imunes periféricas (leucócitos) podem aumentar a permeabilidade por meio da interleucina-1 β (Arvanitis *et al.*, 2020).

As citocinas inflamatórias e a angiogênese induzidas pelo crescimento tumoral, aumentam a BHE e inibem a entrada de células imunes funcionais no cérebro (Chen *et al.*, 2022). O aumento da inflamação no microambiente tumoral exacerba a resposta inflamatória através da secreção de citocinas, favorecendo o crescimento e progressão tumoral (Chen *et al.*, 2022).

O GBM apresenta uma forte assinatura inflamatória devido à produção contínua de citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em inflamação crônica no microambiente tumoral e na ativação de cascatas de sinalização inflamatória como HIF-1 α , NF κ B e STAT3 (Chen *et al.*, 2022).

A maioria dos tumores sólidos exibem um microambiente ácido e hipóxico levando à ativação de NF κ B induzida por TNF- α que induz a expressão de IL-6, todos altamente expressos em GBM (Aggarwal *et al.*, 2009; Ham *et al.*, 2019; McFarland *et al.*, 2013; Shalapour & Karin, 2015; Singh *et al.*, 2019).

Em vários tipos tumorais, inclusive no GBM o NF κ B é ativado constitutivamente e reside no núcleo (Gray *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010). O NF κ B representa uma

família de fatores que induzem a transcrição; ou seja, regulam vários genes envolvidos nas respostas imune e inflamatória (Bassères & Baldwin, 2006; Gray *et al.*, 2014; Hoffmann & Baltimore, 2006; Liu *et al.*, 2017).

Em mamíferos, cinco membros estruturalmente relacionados compõem essa família: NFkB1 (também denominado p50 e seu precursor p105), NFkB2 (também denominado p52 e seu precursor p100), RelA (também denominado p65), RelB e c-Rel (Lin *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2017; Vallabhapurapu & Karin, 2009). O heterodímero p65/p50 é predominante no SNC (Gray *et al.*, 2014).

A família de proteínas NFkB são caracterizadas por sua estrutura única, pois possuem um domínio de homologia Rel N terminal (RHD), responsável pela formação de dímeros, ligação ao DNA e associação com inibidor de NFkB (Ikb) (Lin *et al.*, 2010).

A translocação de NFkB para o núcleo, requer um sinal de localização nuclear (Lin *et al.*, 2010). Em células quiescentes, os dímeros de NFkB são silenciados no citoplasma por proteínas Ikb que mascaram o sinal de localização nuclear (Lin *et al.*, 2010). As proteínas Ikb apresentam domínios de repetição de anquirina, permitindo a ligação ao RHD e impedindo que o NFkB se ligue ao DNA (Gray *et al.*, 2014). A ativação de IKK, fosforila e desencadeia a degradação de Ikb α dependente de ubiquitina no proteassoma, e resulta na translocação nuclear rápida e transitória de membros da família NFkB (Lin *et al.*, 2010).

IKK é formado por duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e uma subunidade reguladora, o modulador essencial NFkB (NEMO ou IKK γ) e sua ativação se dá por diferentes estímulos como citocinas, fatores de crescimento, mitógenos, componentes microbianos e estresse (Lin *et al.*, 2010).

Um dos mais potentes ativadores de NFkB, é o TNF, citocina multifuncional, que atua na sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular; além de exercer funções biológicas por meio da ativação de NFkB (Gray *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2019). No SNC, a molécula pró-inflamatória TNF- α é secretada por micróglia, astrócitos e alguns neurônios; e a sinalização ocorre através de dois receptores: o receptor 1 do TNF (TNFR1) que é expresso na maioria das células e o receptor 2 do TNF (TNFR2), geralmente expresso em micróglia e oligodendrócitos (Gray *et al.*, 2014).

Outra citocina inflamatória é a IL-6; a qual a expressão aberrante foi associada à formação do GBM, grau de malignidade, prognóstico e angiogênese através da regulação positiva de VEGF; além de aumentar o potencial invasivo induzindo a

expressão de MMP2 e MMP9 em células tumorais e normais (Li *et al.*, 2010b; Loeffler *et al.*, 2005; Shan *et al.*, 2015). Em gliomas, é descrita como uma das causas de radioresistência e marcador prognóstico (Hori *et al.*, 2019; Lim *et al.*, 2018).

A IL-6 secretada pelas células GBM ativa STAT3 nos astrócitos que estimula as células tumorais; e essas por sua vez, dependentes de STAT3, secretam ainda mais IL-6 (Chen *et al.*, 2022). Essa ativação recíproca de IL-6 e STAT3 resulta em um processo crônico inflamatório, a fim de exacerbar o crescimento e evasão tumoral (Chen *et al.*, 2022).

Além da IL-6, a IL-8 também favorece um microambiente inflamatório que promove a invasão e crescimento do GBM (Chen *et al.*, 2022). Essas células tumorais também secretam IL-33, que possui ação pró-tumorigênica em vários cânceres; e principalmente no GBM está associada ao mau prognóstico; pois induz a proliferação, migração e invasão (Chen *et al.*, 2022; de Boeck *et al.*, 2020).

Outra citocina, o interferon (IFN- γ) é secretado por células T efectoras, como as células T auxiliares CD4⁺ (Araújo *et al.*, 2021). Essa citocina, possui função antiproliferativa e efeitos antitumorais através da indução de p16 e p21 que atuam como inibidores do ciclo celular (Bello *et al.*, 2014; Owen *et al.*, 2019).

O seu papel na proteção da tumorigênese tem sido explorado demonstrando que o tratamento com IFN- γ diminuiu a proliferação celular e induziu a apoptose; além de diminuir a migração das linhagens de GBM (Das *et al.*, 2009; Hotfilder *et al.*, 2000; Knüpfer *et al.*, 1997, 2001; Kominsky *et al.*, 2000).

Contudo, o problema é que o microambiente tumoral busca alternativas para evadir o sistema imunológico, suprimindo a resposta imune. Apesar da ação antitumoral do IFN- γ , essa citocina pode ativar a via JAK/STAT e resultar na expressão e ativação de IRF-1, que induz a expressão do ligante receptor inibitório imune (PD-L1) nas células tumorais; impedindo a ação de defesa das células T e induzindo sua morte (Qian *et al.*, 2018).

Outro mediador importante no ambiente tumoral é a proteína Anexina A1 (AnxA1), que faz parte da superfamília das Anexinas, com 12 membros já descritos, sendo formada por 346 aminoácidos e peso molecular de 37 kDa (Araújo *et al.*, 2021). Sua expressão varia de acordo com o tipo e grau, podendo atuar como supressora ou promotora de tumor (Gastardelo *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2022). Ou seja, quanto maior a diferenciação e o grau do tumor, maior a expressão da AnxA1 (Chen *et al.*, 2022).

A AnxA1 também é capaz de mediar o escape imune tumoral através da ativação de NFkB (p65) e regular positivamente a IL-8, interleucina produzida por vários tumores, induzindo fenótipos de câncer mais invasivos, como o GBM (Chen *et al.*, 2022).

Apesar da expressão ser limitada no cérebro, estudos anteriores encontraram superexpressão em GBM e uma correlação positiva entre AnxA1 e MMP9, sugerindo que a AnxA1 pode induzir a expressão de MMP-9 e resultar na progressão tumoral (Tadei *et al.*, 2018).

A superexpressão de AnxA1 no GBM se correlaciona com a baixa sobrevida; inclusive, no proteoma de linhagens celulares de GBM, a AnxA1 apresentou significância prognóstica, sendo inversamente relacionada à sobrevida global, pois está diretamente ligada à proliferação, migração, angiogênese e possivelmente por promover a invasão do GBM (Chen *et al.*, 2022; Cheng *et al.*, 2013; Mallawaarachy *et al.*, 2015).

1.6 Bioativos de plantas medicinais como proposta terapêutica no GBM

Produtos vegetais naturais consistem em importante reserva de compostos bioativos com extensa atividade terapêutica. As plantas têm sido amplamente usadas como medicamentos fitoterápicos, aumentando cada vez mais a busca por novos compostos bioativos (Zhang *et al.*, 2023). Nesse sentido, podemos citar a Vincristina, quimioterápico obtido dos alcalóides da planta *Catharanthus roseus* usado até hoje em casos onde as terapias atuais não demonstram eficácia (Shukla *et al.*, 2023). Esse agente quimioterápico se liga às fibrilas de tubulina, prevenindo a polimerização do filamento e inibindo a mitose das células tumorais (Shukla *et al.*, 2023).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais é regulamentada pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (ANVISA 5813/16) e pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do Sistema Único de Saúde. A publicação destas políticas no país tem fomentado iniciativas acadêmicas e governamentais a favor de um reconhecimento e fortalecimento dessas terapias como forma científica e segura de tratamento, da mesma forma como já são vistas em diversos países (Boccolini & Boccolini, 2020).

Bioativos isolados de plantas podem contribuir para o sucesso do tratamento ou do prognóstico do indivíduo que desenvolve câncer (CHAUDHARI *et al.*, 2021). Nos últimos 60 anos, vários compostos contribuíram e ainda contribuem para o sucesso

do tratamento de câncer; onde aproximadamente 50% deles, foram isolados de produtos naturais (Abbas *et al.*, 2020; Mann, 2002).

Um fator limitante no tratamento quimioterápico do GBM é a BHE; pois dificulta a passagem de agentes terapêuticos. No entanto, flavonoides e os diferentes subtipos são descritos como neuroprotetores capazes de atravessar a BHE através de vários mecanismos de transporte transcelular ou junções entre células endoteliais da BHE (Sánchez-Martínez *et al.*, 2022; Youdim *et al.*, 2004).

Em células de GBM, a quercetina foi capaz de direcionar vias moleculares importantes; como desregular os genes apoptóticos *BAX/BCL-2*, e interromper o ciclo celular nas fases G2/M; além de prejudicar a migração e invasão celular pela regulação negativa de MMP2 e MMP9 (Liu *et al.*, 2017).

A quercetina também suprimiu o tumor induzindo p53, aumentou os níveis de capazes 3 e 7, diminuiu os níveis da proteína AKT e elevou a eficácia do tratamento com TMZ em células de GBM (Kim *et al.*, 2013; McLendon *et al.*, 2008; Tavana *et al.*, 2020).

Diante do exposto e da escassez de estudos sobre os extratos de *P. guajava* em GBM, avaliamos a potencialidade antitumorigênica do extrato de folhas de goiaba, bruto e frações, em linhagens celulares de GBM.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Padronizar o extrato de folhas de goiaba (*Psidium guajava*) e avaliar a atividade antitumoral do extrato e frações em linhagens celulares de glioblastoma.

2.2 Específicos:

1. Avaliar as propriedades fitoquímicas e antioxidantes do extrato alcoólico de *P. guajava* bruto e em diferentes frações.
2. Avaliar a atividade antiproliferativa e citotoxicidade do extrato e frações em cultura de células de glioblastoma.
3. Avaliar a genotoxicidade nas diferentes linhagens.
4. Avaliar as citocinas IL-6 e INF- γ .
5. Avaliar a expressão proteica de AnxA1, IKK, STAT3, JAK-1, JAK-3, MDM2, BAX, BCL-2, MMP2 e MMP9 nas células.
6. Avaliar a expressão dos genes *TP53*, *NFkB*, *mTOR*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

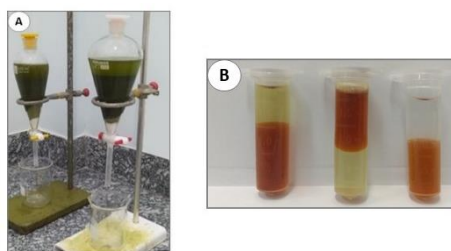
3.1 Padronização do extrato fitoterápico e obtenção das frações

A pesquisa está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), Cadastro nº A016810.

A coleta das folhas, cujas exsiccatas foram depositadas no herbário IRINA DELANOVA GEMTCHUJNICOV (BOTU), sob o nº. 34715, realizada em agosto/2020 e, no momento da coleta, o espécime apresentava frutos verdes. Após a limpeza e secagem do material coletado, o extrato foi obtido por percolação do peso seco de 20 g de folhas trituradas em 100 ml de álcool 70% por 24h (Figura 5A) (Andrade *et al.*, 2019). O álcool foi extraído por rotaevaporização em pressão reduzida a 175 milibar e temperatura máxima de 45°C, evitando perda das propriedades do material, na obtenção do extrato bruto (EB). Esse EB foi pesado, e cada 0,9917 g foram diluídos em 9 ml de água destilada (EB 10%). Com a diluição, a solução produzida está na concentração de 99170 µg/ml devido à padronização anterior.

Os solventes acetato de etila, clorofórmio e hexano foram misturados ao EB 10% na mesma proporção, por 24h (Figura 5B), para obtenção das frações orgânicas. Os solventes foram eliminados por evaporação e as substâncias que passaram para as porções orgânicas foram pesadas, re-eluídas em 2 ml de água destilada e filtradas, obtendo-se então as Frações Acetato de Etila (FAE), Clorofórmio (FC) e Hexano (FH).

Figura 5 – A) Percolação do EB. B) Frações orgânicas FAE, FC e FH.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato e frações foi determinada através da capacidade de sequestro de radicais livres com o uso de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Foi adicionada a solução de DPPH a 2,4 mg/100 ml nas amostras e mantidas no escuro por 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 520 nm. As

determinações foram feitas em triplicata. O percentual de inibição do radical livre DPPH é descrita como atividade antioxidante (Rufino, 2007).

3.3 Análise de citotoxicidade *in vitro* por hemólise

A citotoxicidade do EB, FAE, FC e FH foi avaliada pela análise de hemólise (Desoti *et al.*, 2011). Solução glicosilada (5%) de sangue humano (4%) foi misturada a diferentes concentrações (2%; 4%; 6%; 8% e 10%) adicionadas em suspensões de 1 ml de hemácias. Para o controle positivo foi adicionado 1 ml de triton 1%, e no controle negativo será adicionado 1 ml de solução glicosilada, ambos na solução de hemácias. As amostras e controles foram levados em banho-maria a 37°C por 15 minutos, centrifugados à 1.500 RPM por 5 minutos e, posteriormente, mensurados no espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o equipamento com solução glicosilada.

3.4 Análises fitoquímicas qualitativas e quantitativas

As análises fitoquímicas foram realizadas a fim de identificar a presença de produtos do metabolismo vegetal de interesse farmacológico em EB, FH, FC e FAE. Primeiro, foi realizada a análise qualitativa de Sesquiterpenos adicionando 1 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 2 ml do extrato e frações, sendo que a coloração marrom avermelhada indica a presença de terpenoides com 15 C (Dahanayake *et al.*, 2019).

A presença de compostos fenólicos do tipo Cumarinas foi investigada usando tubos de ensaio com 1 ml das soluções extrativas, tampados com papel filtro impregnado em solução aquosa de NaOH (10%) em banho-maria por 10 minutos. O papel filtro foi retirado e examinado sob luz ultravioleta. A presença de cumarinas na amostra é evidenciada pela presença de fluorescência (Cristina & Lima, 2016).

Posteriormente, foram realizadas análises fitoquímicas quantitativas de compostos fenólicos. O método de Folin-Ciocalteu foi usado para avaliar Polifenóis totais nas amostras (Figueiredo *et al.*, 2014; Saroni Arwa *et al.*, 2015), utilizando ácido gálico (Dinâmica -1274) para construção da curva padrão (0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 $\mu g/ml$), com carbonato de sódio ($NaCO_3$) a 10% (1,5 ml) e Folin-Ciocalteu (0,5 ml) como reagentes reveladores colorimétricos da curva e amostras para leitura em espectrofotômetro (Kasuaki) a 760 nm.

Para quantificar compostos Fenóis do tipo Flavonoides foi utilizada a reação estável que forma o Cloreto de Alumínio ($AlCl_3$); usando a Quercetina (Sigma – Q4951) para construção da curva padrão (diluição seriada a partir de 25 $\mu g/ml$ até

1,56 µg/ml). As amostras foram armazenadas no escuro por 10 minutos e a leitura da mistura de 1 ml das diferentes concentrações da curva ou 1 ml das amostras adicionadas a 1 ml de solução alcóolica de AlCl_3 a 2% foi realizada em 415 nm no espectrofotômetro (Figueiredo *et al.*, 2014; Saroni Arwa *et al.*, 2015).

Na quantificação de Alcaloides totais, foi utilizada atropina (Sigma – A0132) para a construção da curva padrão em alíquotas (0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 ml). Foi utilizado o método em que alcaloides que passaram para uma porção clorofórmica após alcalinização com NaOH 2N são revelados pelo reagente verde de bromocresol dissolvido em solução tamponada a pH 4,7 com ácido cítrico. A curva foi mensurada a 470 nm no espectrofotômetro (Shamsa *et al.*, 2008).

Por fim, a quantificação de terpenos totais foi realizada usando o Ácido ursólico (U850100 – Toronto Research Chemicals) para construção da curva padrão (diluição seriada a partir de 100 µg/ml até 6,25 µg/ml). A mistura de 200 µL das diferentes concentrações da curva/ amostras, com 300 µL de solução vanilina 5% em ácido acético glacial e 1 ml de ácido sulfúrico foram incubadas a 70°C por 30 minutos. Após atingirem temperatura ambiente, foram adicionados 5 ml de ácido acético glacial e lidos em 573 nm no espectrofotômetro (Chang *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2015).

3.5 Análises Cromatográficas

Para aprofundar as análises fitoquímicas, foram realizadas leituras cromatográficas em camada delgada (*high performance thin layer chromatography* – HPTLC) e líquida (*high performance liquid chromatography* – HPLC).

No HPTLC, foi utilizado o aplicador automático CAMAG Linomat 5 (Lab. Multidisciplinar II/UNIFIPA), com gás N (60 psi) e em placas delgadas (0,2 mm) de sílica 20X20 cm (Ref. 818333 – Macherey-Nagel/Alemanha – ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254). O método de aplicação foi o mesmo em todas as análises, usando seringas Hamilton de 100 µL, velocidade da dosagem 50 nL/s, pré-dosagem de descarte de 0,2 µL, bandas com aplicação de 10 µL e tamanho de 8 mm e distância entre bandas de 5 mm. O EB 10% e as frações (FAE, FC e FH) foram analisadas por esse método. Todos os padrões, eluentes e reveladores usados nas análises cromatográficas estão descritos na tabela 1.

As análises por HPLC foram realizadas apenas no EB 10% e FAE, pois as frações FC e FH não apresentaram compostos de interesse. Essas análises foram executadas pela Central Analítica – Instituto de Química – USP em modo gradiente, equipado com

uma coluna ACE Generix C18 (150 x 4.6 mm – 5 µm). A fase móvel foi água 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), fluxo: 1 ml/min, segundo o método descrito por Jia e colaboradores (2015).

Tabela 1 – Padrões e diluições, fases móveis e derivatização utilizados em HPTLC.

Padrão	Fase Móvel	Derivatização
Ácido Gálico (Dinâmica1274) 100 µg/ml (Metanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Ácido Fórmico (5:4:0,2) (Doshi & Une, 2016)	FeCl ₃ 0,2% (Possebon <i>et al.</i> , 2018)
Berberina (Sigma B2151) 100 µg/ml (Metanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Metanol / Ácido Fórmico (6:6:3:0,3) (Shailajan <i>et al.</i> , 2019)	Dragendorff 1% (Dahanayake <i>et al.</i> , 2019; Possebon <i>et al.</i> , 2018)
Catequina (Sigma C1251) 500 µg/ml (Metanol)	Acetato de Etila / Tolueno / Metanol / Ácido Fórmico (70:30:10:5)	1 g de vanilina em 30 ml de ácido acético foi acidionado a 70 ml de ácido fosfórico. Essa solução de ácidos foi diluída em etanol na proporção de 30/70 (Glavnik <i>et al.</i> , 2009; Vovk <i>et al.</i> , 2005)
Kaempferol (Sigma 60010) 100 µg/ml (Etanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Ácido Fórmico (5:4:0,2) (Doshi & Une, 2016)	NP-PEG 1% observado em UV (Dourado & Ladeira, 2008)
Luteolina (Sigma L9283) 100 µg/ml (Etanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Ácido Fórmico (5:4:0,2) (Doshi & Une, 2016)	NP-PEG 1% observado em UV (Dourado & Ladeira, 2008)
Quercetina (Sigma Q4951100) 100 µg/ml (Metanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Ácido Fórmico (5:4:0,2) (Doshi & Une, 2016)	NP-PEG 1% observado em UV (Dourado & Ladeira, 2008)
Resveratrol (Merck R5010) 100 µg/ml (Etanol)	Tolueno / Acetato de Etila / Ácido Fórmico (5:4:0,2) (Doshi & Une, 2016)	

Rutina Cat#R701800) 100 µg/ml (Metanol)	(TRC-Canada Tolueno / Acetato de Etila / Ácido Acético / Ácido Fórmico / Metanol (3:9:1:1:1) Adaptado (Doshi & Une, 2016)	NP-PEG 1% observado em UV (Dourado & Ladeira, 2008)
--	---	---

Fonte: Elaborado pela autora.

3.6 Linhagens celulares

As linhagens tumorigênicas de glioblastoma (A172 e U87-MG) foram obtidas do banco de linhagem de células americano (ATCC). A linhagem EA-hy 926 (endotelial de veia umbilical), obtida do banco de células do Rio de Janeiro, foi utilizada nos testes de citotoxicidade e viabilidade celular para auxiliar na seleção das dosagens das soluções extrativas; pois trata-se de células que desempenham um papel crucial na formação da (BHE).

3.7 Tempo de dobramento

O tempo de dobramento (PDT; *population doubling time*) das linhagens A172 e U87-MG foi calculado conforme descrito (Peres & Curi, 2005):

$$r = 3,32 (\log N_h - \log N_i) / (t_2 - t_1)$$

$$PDT = 1/r$$

Nota:

r = taxa de multiplicação celular

N_h = número de células coletadas no período final

N_i – número de células inoculadas no tempo inicial (zero)

3,32 = uma constante

3.7.1 Cultivo e análise da morfologia celular

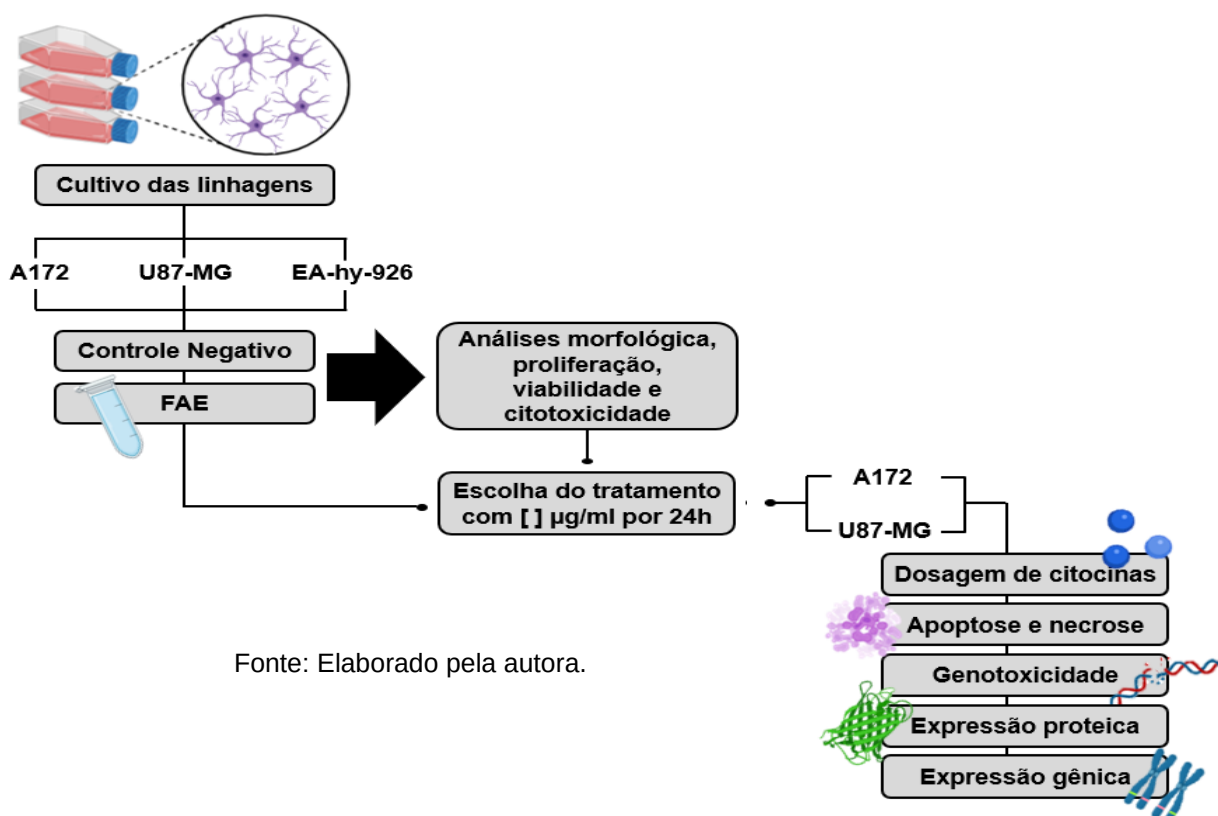
A linhagem A172 foi semeada em meio completo (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 mg/ml de penicilina/streptomicina. A linhagem U87-MG foi semeada em meio completo (EMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 25 mg/ml de penicilina/estreptomicina). A linhagem EA-hy926 endotelial foi semeada em meio completo (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 25 mg/ml de penicilina/estreptomicina). Essas células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e umidade controlada, até obeterem 80% de confluência.

O crescimento e morfologia celular foram avaliados diariamente em microscópio invertido de contraste de fase *Olympus CKX41*, quando confluyente, o material foi submetido à tripsinização e subdividido em três réplicas.

Para a análise de citotoxicidade e viabilidade celular, foram realizados dois experimentos com cada linhagem celular usando apenas a FAE; um experimento controle (sem tratamento, apenas com meio de cultura) e outro com a FAE, fração selecionada após as análises de padronização, em 6 diferentes concentrações (5% (145 µg/ml), 10% (290 µg/ml), 15% (435 µg/ml), 20% (580 µg/ml), 25% (725 µg/ml) e 50% (1.450 µg/ml)) a serem tratados por 24h.

A partir dos resultados obtidos na análise citada acima, foi escolhida a concentração mais próxima do IC_{50} , de acordo com os testes estatísticos. Para as análises abaixo descritas (dosagens de citocinas, apoptose, genotoxicidade, expressão proteica e gênica) foram realizados dois experimentos com cada linhagem celular, processadas em maior número, um experimento controle (sem tratamento, porém com o agente diluidor – Dimetilsulfóxido 1%) e outro com a FAE na concentração de 25% (800 µg/ml) na A172 e 15% (480 µg/ml) na U87-MG, a serem tratadas por 24h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e executados no Laboratório de Cultura Celular do Centro Universitário Padre Albino – Catanduva. O fluxograma a seguir, mostra a sequência experimental adotada no projeto.

Fluxograma 1 – Delineamento experimental.



3.8 Índice de citotoxicidade celular

Nessa análise, foi realizada uma curva de crescimento para cada concentração a ser testada, com contagem de células cultivadas em placas de cultura de 96 poços, semeadas na concentração de 1×10^4 em 100 μL de meio completo (DMEM, EMEM e DMEM F12) suplementados conforme descrito anteriormente e mantidas a 37°C com 5% de CO_2 , por 24 horas, até a adesão.

O meio de cultura completo foi substituído por meio de cultura sem soro, a fim de sincronizar todas as células no estado G_0/G_1 do ciclo celular. Após 24h horas, o meio de cultura foi substituído por meio completo e adicionada a FAE a ser estudada nas concentrações já descritas. As células foram tripsinizadas após 24h e contadas em câmara de Neubauer.

3.9 Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular

O ensaio colorimétrico de citotoxicidade utiliza um corante que altera seus espectros de absorção após a redução de células. A mudança da taxa de absorção é diretamente proporcional ao número de células vivas.

O ensaio foi realizado com células cultivadas em placa de cultura de 96 poços na concentração de 1×10^4 células em 100 μL de meio completo e mantidas a 37°C com 5% de CO_2 , por 24 horas, até adesão. Então, o meio de cultura completo foi substituído por meio de cultura sem soro e após 24 horas, este meio foi retirado e adicionou-se a FAE nas concentrações desejadas.

Para este ensaio, foi usado o kit *Cell Cytotoxicity Assay* (Abcam – ab112118). Após 24 horas, cada poço recebeu 20 μL do componente A e foram encubadas por mais 24 horas, seguindo para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm e 605 nm.

Após a leitura, foi aplicado o teste estatístico para analisar a viabilidade celular *versus* concentração. Foi calculada também a razão $\text{OD}_{570 \text{ nm}} \div \text{OD}_{605 \text{ nm}}$ para as amostras (R_{amostra}), controle (R_{controle}) e o meio de cultura (R_0).

A porcentagem de células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula, segundo recomendações do fabricante:

$$\% \text{ Células viáveis} = 100 \times (R_{\text{amostra}} - R_0) \div (R_{\text{controle}} - R_0)$$

O valor de IC_{50} representa o ponto médio da concentração inibitória máxima capaz de inibir funções biológicas, com base em dados farmacológicos referentes a curva dose-resposta. A partir do valor de IC_{50} , foi possível calcular a concentração necessária da substância capaz de reduzir 50% da viabilidade celular. Também foi possível calcular o índice de seletividade considerando-se o IC_{50} das células controles e IC_{50} das células tumorais.

3.10 Imunoensaio para dosagem de citocinas

O Multiplex imunoensaio é uma técnica capaz de dosar proteínas diferentes presentes na mesma amostra, de forma simultânea. Nesse estudo, foram detectadas as citocinas IL-6 e INF- γ , usando o kit MILLIPLEX *Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel A* (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) nos sobrenadantes do lisado celular e do meio de cultura. O sobrenadante do macerado/lisado celular foi obtido adicionando-se 495 μ L de Phosphosafe e 5 μ L de inibidor de protease no *pellet*, segundo instruções do fabricante. O ensaio de Bradford foi realizado a fim de quantificar proteínas. Em seguida, as amostras foram diluídas nas concentrações de 250 μ g/ml.

Após adicionar as *beads* magnéticas que se ligam aos analitos através de anticorpos específicos e das amostras, a placa foi incubada pelo tempo indicado. O anticorpo biotilado de detecção foi adicionado e em seguida o complexo estreptavidina-ficoeritrina. Foram usados 25 μ L de sobrenadantes do meio e do lisado celular para uma placa de 96 poços, seguindo instruções do fabricante.

A análise foi realizada através do equipamento de leitura Luminex xMAP, que através de um fluxo de laser duplo, sendo um específico à *bead*, identifica o analito, e o outro determina a magnitude do sinal emitido pela ficoeritrina ligada ao imunocomplexo formado durante a reação. A leitura foi baseada na curva de concentração de padrões fornecidos pelo kit e os resultados expressos em pg/ml. Os resultados foram analisados através o software MILLIPLEX Analyst 5.1 (Merck KgaA, Darmstadt, Germany).

3.11 Ensaio cometa

As células A172 e U87-MG foram cultivadas em placas de 12 poços na concentração de 1×10^5 , tratadas por 24 horas, conforme descrito anteriormente; bem como os respectivos controles não tratados. Essas células foram tripsinizadas, e o

conteúdo foi retirado e adicionado em um tubo falcon de 15 ml, com posterior centrifugação.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células formado foi misturado com 120 µL agarose de baixo ponto de fusão/*Low Melting Temperature agarose* (LMP) 0,5% e colocado sobre lâminas de extremidades foscas que foram previamente mergulhadas em uma mistura de PBS (Phosphate buffer solution) e agarose de ponto de fusão normal/*Normal Melting agarose* (NMP) 1,5%, formando uma fina película sobre a lâmina. Em seguida, o material disposto nas lâminas foi coberto com lamínulas e levados geladeira por 30 minutos para solidificar a agarose *Low Melting*.

Após a solidificação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Lauril e NaOH 10 M, pH 10), a 4°C durante 1 h. Em seguida, foram imersas em solução de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH 13) por 30 min, seguida de eletroforese por 20 min (25V e 300 mA). As lâminas foram transferidas para um recipiente com 4 ml de solução de neutralização (Tris 0,4 M, água destilada, pH 7,7) por 5 minutos, três vezes; seguindo para a fixação com etanol 100% por 10 minutos. Logo após, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e armazenadas em geladeira, até a análise.

Na coloração, foram adicionados sobre cada lâmina 100 µL de solução de coloração (*GelRed Nucleic Acid Stain* 10.0000x, NaCl 1M, H₂O destilada) por 5 min e visualizadas em microscópio de fluorescência, no aumento de 400x.

As células foram classificadas visualmente de acordo com o comprimento da cauda em:

Classe 0 – sem dano aparente;

Classe 1 – cauda curta, menor que o diâmetro do núcleo;

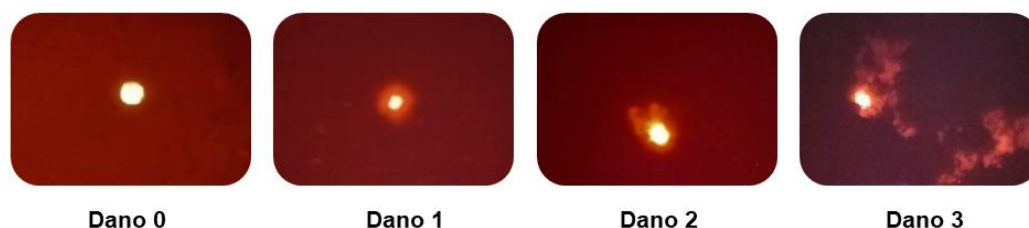
Classe 2 – comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo;

Classe 3 – comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo.

Foram analisadas 100 células por grupo experimental. Os núcleos celulares foram classificados de acordo com a classe de dano, determinada pela porcentagem de DNA e tamanho da cauda do cometa através do *software CometScore* versão 2.0 (Ashino *et al.*, 2021; KOBAYASHI *et al.*, 1995).

Todas as etapas foram realizadas ao abrigo de luz; ou seja, em sala escura e com temperatura de 18°C, devido ao calor, a fim de evitar danos adicionais ao DNA.

Figura 6 – Fotomicrografia de fluorescência dos núcleos corados com *GelRed* nas células A172, após o tratamento com FAE (concentração de 800 µg/ml por 24 horas), evidenciando os diferentes tipos de danos avaliados pelo ensaio Cometa. Aumento de 400x, escala de 40 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.12 Análise da expressão proteica de AnxA1, IKK, JAK1, JAK3, MDM2 e STAT3

No ensaio imunocitoquímico, foram usadas lamínulas circulares de 13 mm gelatinizadas em placas de 24 poços. Todos os poços foram lavados com PBS 3 vezes por 5 minutos e fixados com Paraformaldeído 4% por 10 minutos a 4°C. Para esse ensaio, foi utilizado o kit *EnVision FLEX K8000* (Agilent), seguindo recomendações do fabricante. Por fim, as lamínulas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas e montadas em lâminas. A análise foi feita no microscópio, com o auxílio do software *Leica*.

Os anticorpos primários usados foram IKK (*Abcam*; Ab178870) e MDM2 (*Abcam*; Ab260074) ambos na diluição 1:50; JAK1 (*Elab*; E-AB22202) e STAT3 (*Elab*; E-AB32981) ambos na diluição 1:200; JAK3 (*Elab*; E-AB31846) na diluição 1:100; AnxA1 (*ThermoFisher/EUA*; Cat. Nº 71-3400) na diluição 1:1000, diluídos em PBS 1% albumina, segundo recomendações dos fabricantes. Para controle da reação, foi omitido o anticorpo primário. As análises das imunomarcações da proteína foram realizadas através da densitometria por campo (unidades arbitrárias de 0 a 255) usando o analisador de imagem *Leica Image Analysis*.

3.13 Análise da expressão proteica de AnxA1, BAX, MMP2 e MMP9

No ensaio de *Western blotting*, as linhagens celulares A172 e U87-MG foram cultivadas em frascos de 25 cm² (3 x 10⁶ células) até 80% de confluência, raspadas em tampão de lise e centrifugadas para a extração de proteínas. A concentração de proteínas nas células foi determinada pelo ensaio de Bradford (*Biorad*, Hemel Hempsted, UK).

Uma alíquota foi misturada (1:1) com 2x *loading buffer* (Tris base a 125 mM, pH 6,8, com mercaptoetanol a 10%, dodecil sulfato de sódio a 4%, glicerol a 20%, azul de bromofenol a 0.1%) e desnaturada em água a 100°C por 5 minutos. As amostras (50 µg de proteína) e os marcadores de peso molecular foram separados em gel SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio a 10% – gel de poliacrilamida a 10%) e transferidas para membrana de nitrocelulose.

Após a eletroforese, a membrana foi incubada com 5% de leite em pó desnatado em TBS-T por 1h em temperatura ambiente, com os anticorpos policlonais anti-AnxA1 (*ThermoFisher/EUA*; Cat. Nº 71-3400), anti-BAX (*Abclonal*; A0207), anti-MMP2 (*Abclonal*; A6247) anti-MMP9 (*Abclonal*; A2095) e anti-β-actina (*Sinalização Celular, Boston, Massachusetts, EUA*; 1:5.000) como controle por 1 h a 4 ° C.

A membrana foi lavada com TBS-T e incubada com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG HRP conjugado (Promega) e o produto da reação será revelado com DAB (Kit DAB, *Invitrogen*). A quantificação proteica foi realizada por densitometria (unidades arbitrárias: 0 a 255) através do analisador de imagens *Software Leica Image Analysis*.

3.14 Análise da expressão gênica de *TP53*, *NFκB* e *mTOR*

3.14.1 Genes alvos

Os genes estudados (*TP53*, *NFκB* e *mTOR*) foram selecionados previamente com base em possíveis marcadores identificados anteriormente (Ham *et al.*, 2019c; Lahalle *et al.*, 2021; Louis *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2018). A sequência de nucleotídeos dos genes foi obtida através da ferramenta *Primer BLAST* – *NCBI* e se encontra na tabela 2.

Tabela 2 – Iniciadores de cadeia (*primers*) usados na RT PCR.

Sequência	
<i>NFκB forward</i>	5' GCAGCACTACTTCTTGACCACC 3'
<i>NFκB reverse</i>	3' TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC 5'
<i>mTOR forward</i>	5' AGCATCGGATGCTTAGGAGTGG 3'
<i>mTOR reverse</i>	3' CAGCCAGTCATCTTTGGAGACC 5'
<i>TP53 forward</i>	5' CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG 3'
<i>TP53 reverse</i>	3' TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC 5'

Fonte: Elaborado pela autora.

A análise da expressão gênica de *TP53*, *NFkB* e *mTOR* no macerado celular foi avaliada por RT-PCR. Para a extração de RNA, foi usado Trizol™ (*Invitrogen*) e tratado com 10U de deoxiribonuclease ribonuclease (RNase)-free por 1 hora a 37°C. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria através do Qubit™ 4 (*Thermo Fisher Scientific*).

Para a síntese do cDNA foram utilizados 200 ng de RNA total e o kit *Platus Transcriber RNase H-cDNA First Strand kit* (*Sinapse biotecnologia*). Todas as reações foram preparadas em triplicata, inclusive o controle endógeno, o GAPDH; melhor gene normalizador para controle endógeno. Em seguida as reações foram processadas em volume final de 20µL *SYBR® Green PCR Master Mix* e 100nM de cada primer, segundo protocolo da Applied Biosystems.

Após incubação por 5 minutos a 65°C, a temperatura foi reduzida para 42°C por 60 minutos; em seguida a temperatura foi elevada para 70°C por 5 minutos e mantidas a 12°C até a próxima etapa. Em seguida, o programa continuou com 40 ciclos de 5 segundos a 95°C e 10 segundos a 60°C para anelamento dos primers.

A amplificação foi realizada através do kit *Brilliant III Ultra fast SyBR green* (*Agilent - 600882*), a aquisição dos dados e a *melting curve* foram procedidos por meio do equipamento AriaMX (*Agilent*). O *software* AriaMX (*Agilent*) foi utilizado para o processamento dos dados. As reações foram analisadas pelo *software* AriaMX (*Agilent*).

A normalização foi realizada através da média geométrica do gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), utilizado como controle interno (controle endógeno). A análise dos resultados da RT PCR foi a partir dos valores de Ct (*Cycle threshold*) de cada amostra, calculando as médias das triplicatas. A seguir, foi calculado o ΔCt a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse pela média do controle interno. Para o cálculo do $\Delta-\Delta Ct$, a amostra controle foi usada como calibrador, sendo atribuído ao mesmo o valor de zero como resultado da subtração com seu próprio ΔCt . Nas demais amostras (tratadas com FAE), o cálculo do $\Delta-\Delta Ct$ resultou da diferença entre os valores de ΔCt de cada um deles em relação ao calibrador. Por fim, foi calculado o $2^{-\Delta-\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001) e os dados foram apresentados em uma escala logarítima de base 2 ($\log_2$). Considerou-se aumento ou redução significativa de expressão quando o valor de expressão foi duas vezes maior ou menor, em relação ao controle ou quando esteve acima ou abaixo de 1 quando apresentado na forma de $\log_2$.

3.15 Ensaio Apoptose

Para avaliar a apoptose, foi usado o *Apoptosis/Necrosis Assay kit (blue, green, red)* (Abcam, ab176749), capaz de detectar simultaneamente a apoptose nas células coradas em verde, necrose em vermelho e células vivas em azul. Foi usada a concentração de 1×10^5 células por tubo, tratadas por 24 horas, conforme descrito anteriormente; bem como os respectivos controles não tratados e controle positivo.

Após o tratamento, as células foram lavadas com tampão de ensaio e centrifugadas. Em seguida, foram resuspendidas em 200 μ L de tampão de ensaio, 2 μ L de *Apopxin Green Indicator*, 1 μ L de 7-AAD e 1 μ L de *CytoCalcein Violet 450* à temperatura ambiente por 30-60 minutos. Por fim, adicionou-se 300 μ L de tampão de ensaio e analisadas por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Para quantificar a ligação do *Apopxin Green Indicator* foi usado o canal FL1. Para medir a viabilidade celular com 7-AAD usou-se o canal FL3 e para o *CytoCalcein Violet 450* o canal violeta.

3.16 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva e teste de normalidade através do software *GraphPad Prism 5*. Para as amostras com distribuição normal, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA), e posteriormente o teste de *Bonferroni*. Os valores obtidos foram descritos como média $\pm$ S.E.M, e o limite de significância foi de 95%. Nas análises comparando duas amostras, foi usado o Teste T. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fitoquímica

4.1.1 Terpenos, compostos fenólicos e alcaloides no EB e frações

As análises fitoquímicas qualitativas confirmaram a presença de produtos do metabolismo vegetal, com propriedades terapêuticas (Tabela 3). Os flavonoides foram encontrados no EB e FAE; porém não em FC e FH. Já os terpenos e alcaloides foram vistos em todas as amostras.

Tabela 3 – Análises fitoquímicas qualitativas.

TESTES	EB	FC	FAE	FH
Identificação de Terpenos				
Saponinas	+	+	+	+
Teste para Sesquiterpenos	+	-	-	-
Teste para Triterpenos	+	-	-	+
Identificação Compostos Fenólicos				
Cloreto Férrico	+	-	+	-
Reação para Flavonoides				
Reação com Cloreto de Alumínio	+	-	+	-
Hidróxido de Sódio	+	-	+	-
Reação de Shinoda	+	-	+	-
Identificação genérica de Taninos				
Acetato Neutro de Chumbo	+	-	+	-
Acetato de Cobre	-	-	+	-
Identificação específica para Taninos				
Taninos gálicos (hidrolisáveis)	-	-	+	-
Taninos Catequímicos	-	+	-	+
Identificação de Cumarinas	+	-	+	-
Identificação de Alcaloides				
Reação de Bouchardat	+	+	+	+
Reação de Dragendorff	+	+	+	+
Reação de Mayer	-	-	-	+
Reação de Sheibler	+	+	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Nas análises fitoquímicas quantitativas o EB, FAE, FC e FH apresentaram, respectivamente, 2.100; 460; 520; 320 µg/ml de terpenos totais. O EB e FAE apresentaram 137,8 e 59,15 µg/ml de polifenóis totais e 586,5 e 192,9 µg/ml de flavonoides totais. O EB, FAE e FC apresentaram 1,95; 0,22; 0,102 µg/ml de alcaloides totais, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Análises fitoquímicas quantitativas.

	Terpenos	Compostos Fenólicos		Alcaloides
		Polifenóis	Flavonoides	
EB	2.100 µg/ml	137,8 µg/ml	586,5 µg/ml	1,95 µg/ml
FAE	460 µg/ml	59,15 µg/ml	192,9 µg/ml	0,22 µg/ml
FC	520 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0,102 µg/ml
FH	320 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml

Fonte: Elaborado pela autora.

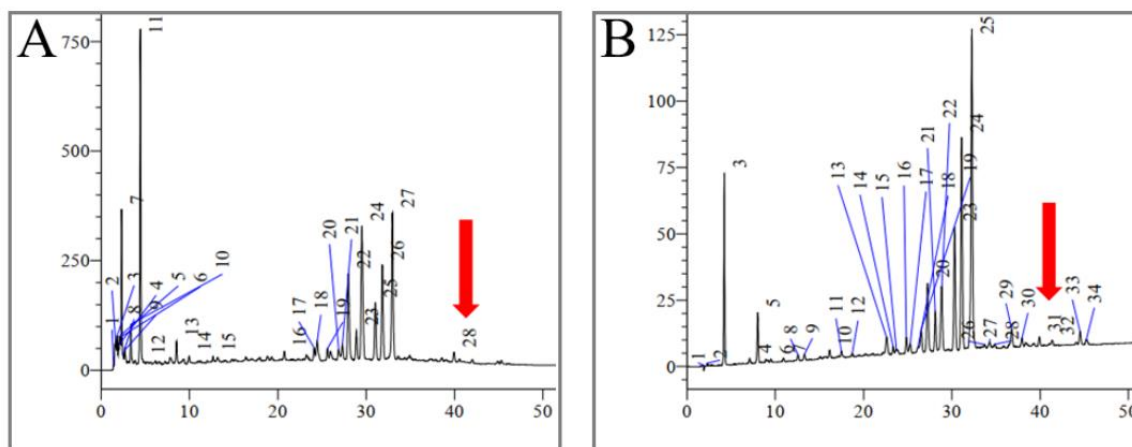
4.1.2 Análises cromatográficas identificaram compostos fitoquímicos no EB e FAE

As análises cromatográficas evidenciaram a presença do flavonoide miricetina no EB e FAE (Figura 7).

As análises cromatográficas indicaram também a presença dos flavonoides Catequina no EB e FAE com $R_f=0,6$ (Figura 8C), Quercetina no EB com $R_f=0,4$ (Figura 8^a), Rutina no EB, com $R_f=0,2$ (Figura 8H) e Luteolina no EB e FAE, com $R_f= 0,3$ (Figura 8E). A ausência do flavonoide Kaempferol e do polifenol Resveratrol foi evidenciada em todas as amostras, com os respectivos $R_f=0,6$ e $R_f=0,5$ (Figura 8F e 8G).

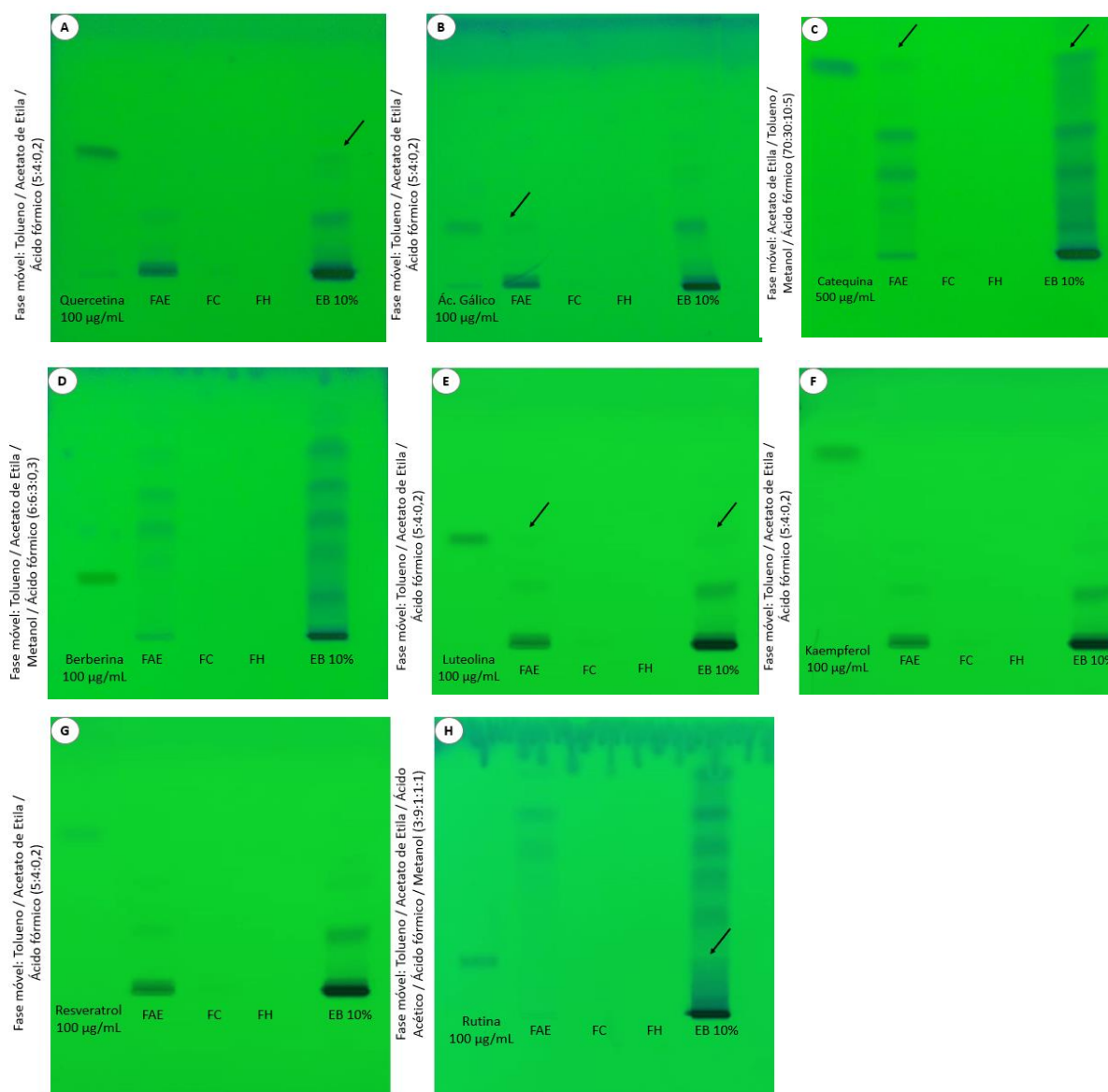
A presença do tanino Ácido Gálico foi evidenciada no EB e FAE e confirmados pela reação com o revelador Cloreto Férrico com $R_f= 0,2$ (8B). A ausência do alcaloide Berberina foi observada em todas as amostras, $R_f=0,2$ (Figura 8D).

Figura 7 – Fitoquímicos por HPLC. Em A) Leitura do EB a 10%. B) Leitura da FAE. As setas indicam os picos correspondentes à miricetina.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 8 – Fitoquímicos por HPTLC. A) Quercetina. B) Ácido Gálico. C) Catequina. D) Berberina. E) Luteolina. F) Kaempferol. G) Resveratrol. H) Rutina. As setas indicam bandas correspondentes aos respectivos padrões e EB em A e H, bem como, aos padrões, EB e FAE em B, C e E.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.3 EB e FAE possuem maiores taxas de atividade antioxidante

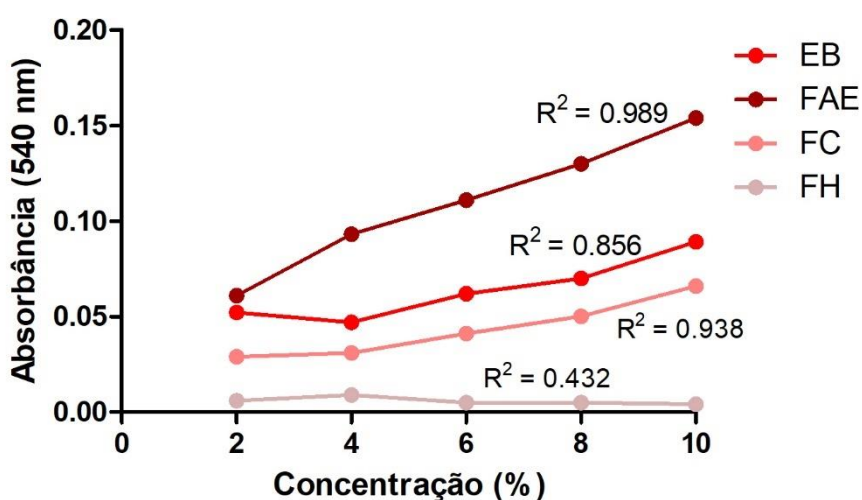
As análises demonstraram que o EB e a FAE possuem, respectivamente, 86,51% e 88,38% atividade antioxidante. FC e FH demonstraram menor atividade antioxidante, que foi de 3,94% e 0,93%, respectivamente.

4.1.4 EB e frações possuem baixa toxicidade no teste de hemólise

O teste de citotoxicidade *in vitro*, que avalia a hemólise provocada por diferentes concentrações do EB e frações, indicou que a concentração de nenhuma das amostras apresentou alta citotoxicidade nas concentrações testadas; bem como possível efeito protetor dos polifenóis. FH apresentou a menor citotoxicidade; o que talvez se deva a ausência de compostos bioativos; pois nos testes fitoquímicos qualitativos, quantitativos e cromatográficos essa fração apresentou menor presença de metabólitos vegetais.

Devido à maior quantidade de compostos fitoativos e atividade antioxidante, a FAE foi selecionada para os próximos ensaios.

Figura 9 – Teste de citotoxicidade *in vitro* por hemólise.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Cultura celular

4.2.1 Tempo de dobramento das células

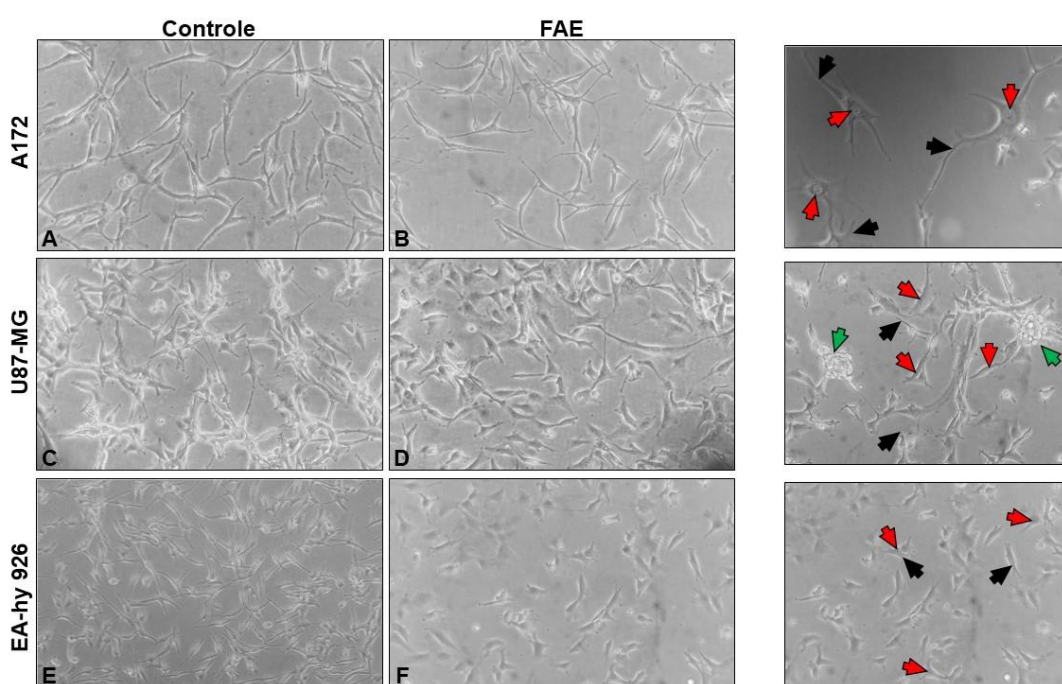
O tempo de dobramento celular da A172 foi de 38,15 horas; enquanto da U87-MG foi de 19,07 horas.

4.2.2 O tratamento com FAE não altera a morfologia das células

Inicialmente, as células A172, U87-MG e EA-hy 926 foram cultivadas e observadas em microscopia de contraste de fase diariamente. Morfologicamente, as linhagens celulares A172 (Figura 10A e 10B) e U87-MG (Figura 10C e 10D) são

caracterizadas por uma monocamada de células nucleadas com prolongamentos. O aspecto morfológico da linhagem EA-hy 926 consiste em uma monocamada de células nucleadas achatadas (10E e 10F). Dessa forma, ao serem observadas, todas essas linhagens de células não apresentaram alterações visíveis após serem expostas à FAE.

Figura 10 – Imagens microscópicas da linhagem A172 (10x e 40x). Imagens microscópicas da linhagem U87-MG (10x e 40x). Imagens microscópicas da linhagem EA-hy926 (10x e 40x). As setas vermelhas destacam os núcleos e as setas pretas, prolongamentos citoplasmáticos. As setas verdes “cachos” de células agrupadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.3 A FAE diminui a proliferação celular nas linhagens A172 e U87-MG

O ensaio de citotoxicidade celular, por meio da curva de crescimento foi realizado para as três linhagens estudadas, no qual foram comparadas as células tratadas ou não com a FAE nas concentrações de (5% (160 µg/ml), 10% (320 µg/ml), 15% (480 µg/ml), 20% (640 µg/ml), 25% (800 µg/ml) e 50% (1.600 µg/ml) em 24 horas.

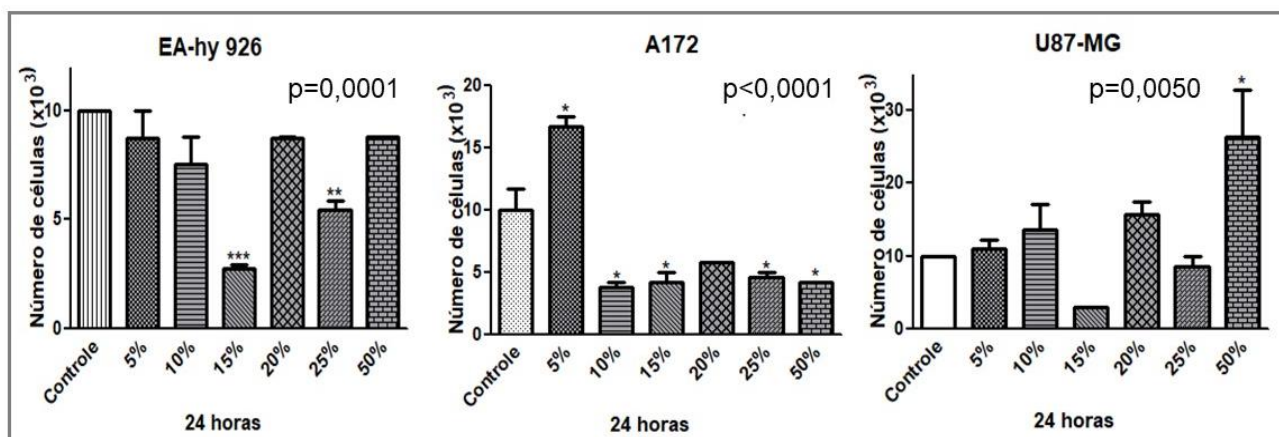
Na linhagem A172, foi observado um efeito inibitório da célula após o tratamento com FAE na concentração de 25% (800 µg/ml), demonstrando redução do crescimento dessas células tumorais em 24 horas, quando comparado as amostras controle (Figura 11).

Na linhagem U87-MG, a FAE na concentração de 15% (480 $\mu\text{g/ml}$), reduziu o crescimento dessas células tumorais em 24 horas, quando comparado as amostras controle (Figura 11).

Na linhagem EA-hy926, também foi observado um efeito inibitório da célula, após o tratamento com FAE na concentração de 15% (480 $\mu\text{g/ml}$), em 24 horas, quando comparado as amostras controle (Figura 11).

Como já era esperado, as células que não foram expostas a FAE apresentaram alta atividade proliferativa.

Figura 11 – Ensaio de citotoxicidade celular com a FAE nas concentrações previamente determinadas nas linhagens EA-hy926, A172 e U87-MG. EA-hy 926 demonstrou significância ao comparar o controle com as concentrações de 15% e 25% ($p=0,0001$). A172 não demonstrou significância na concentração de 20% quando comparadas ao controle; no entanto, foi significativa nas outras concentrações testadas ($p<0,0001$). A linhagem U87-MG demonstrou significância apenas na concentração de 50% ao comparar as concentrações testadas com o controle ($p=0,0050$).



Fonte: Elaborado pela autora. (*) = $p<0,05$ diferença significativa em relação ao controle; (**) = $p<0,005$ diferença significativa em relação ao controle; (***) = $p<0,0005$ diferença significativa em relação ao controle.

4.2.4 FAE e a viabilidade celular das células endoteliaias e tumorais

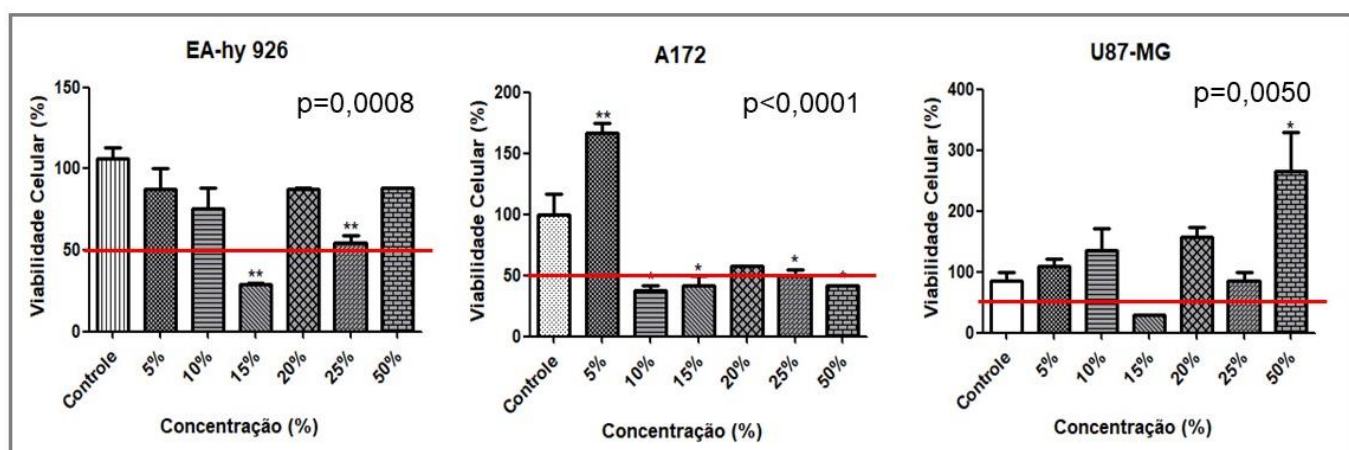
Na figura 12, os gráficos representam as taxas de viabilidade celular do ensaio colorimétrico de citotoxicidade. Houve diminuição da viabilidade celular em 24 horas na linhagem endotelial EA-hy 926, com a FAE nas concentrações de 15% (480 $\mu\text{g/ml}$), e 25% (800 $\mu\text{g/ml}$), sendo tóxica apenas na concentração de 15%; pois reduziu a viabilidade abaixo de 50% (Figura 12).

Na linhagem tumorigênica A172 após o tratamento, houve viabilidade alta para a concentração de 5% (160 µg/ml) em 24 horas (Figura 12). Entretanto, nas demais concentrações houve diminuição da viabilidade celular, todas próximas à 50% nas células tratadas; ou seja, a viabilidade se manteve próxima de 50%.

Na linhagem tumorigênica U87-MG após o tratamento, houve redução da viabilidade para a concentração de 15% (480 µg/ml) e aumento da viabilidade para a concentração de 50% (1.600 µg/ml). Através deste ensaio e do ensaio de citotoxicidade celular, considerou-se como melhores concentrações aquelas que estavam próximas de 50% da viabilidade celular.

Apesar da concentração de 15% (480 µg/ml), ter reduzido viabilidade nas células endoteliais, foi a concentração capaz de reduzir a viabilidade nas células U87-MG. Portanto, os experimentos a seguir foram realizados nas concentrações de 25% (800 µg/ml) para a A172 e 15% (480 µg/ml) para a U87-MG em 24 horas de tratamento.

Figura 12 – Ensaio de viabilidade e citotoxicidade nas linhagens EA-hy 926, A172 e U87-MG. A viabilidade foi reduzida em EA-hy 926 nas concentrações de 15% e 25% ($p=0,0008$). Na linhagem A172, apenas a concentração de 5% aumentou a viabilidade celular ($p<0,0001$). Por fim, na U87-MG, houve aumento da viabilidade na concentração de 50% ($p=0,0050$).



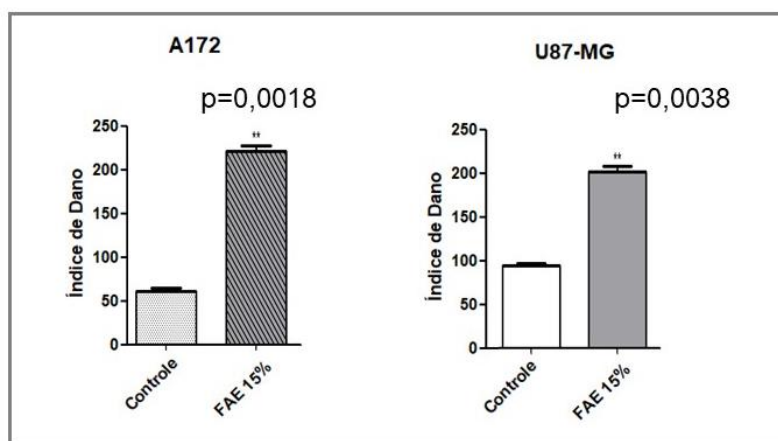
Fonte: Elaborado pela autora. (*) = $p<0,05$ diferença significativa em relação ao controle; (**) = $p<0,05$ diferença significativa em relação ao controle.

4.2.5 FAE induziu danos ao DNA das células tumorais

O ensaio do cometa possibilitou verificar a possibilidade de danos ao DNA das células das duas linhagens tumorais (A172 e U87-MG), após os tratamentos com a FAE por 24 horas e nas concentrações de 15 e 25% (Figura 13 e 14, Tabela 4). Nas

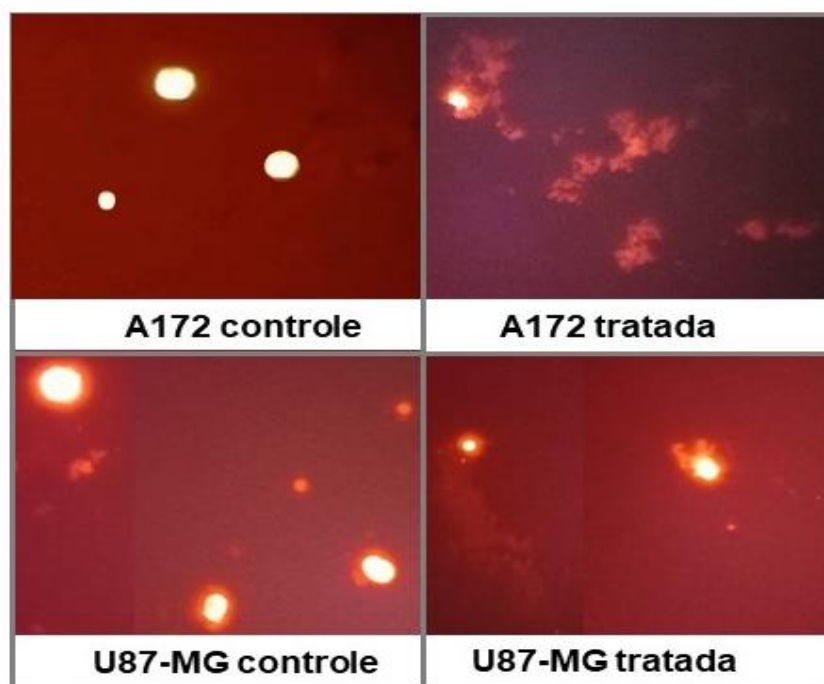
duas linhagens celulares, foi possível observar que houve danos significativos após o tratamento com a FAE. A apoptose celular pode ser identificada através da cauda do cometa; pois quando há dano, o DNA se move para a cauda do cometa (Majtnerová & Roušar, 2018).

Figura 13 – Índice de danos obtidos pelo ensaio de genotoxicidade para as linhagens A172 e U87-MG. Em ambas as linhagens a FAE induziu o dano ao DNA significativamente (A172, $p=0,0018$ e U87-MG, $p=0,0038$).



Fonte: Elaborado pela autora. (**) = $p<0,05$ diferença significativa do tratamento em relação ao controle.

Figura 14 – Fotomicrografia de fluorescência dos núcleos corados com *Ge/Red* nas células A172 e U87-MG, após o tratamento com FAE (24 horas).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 – Índice de danos obtidos pelo ensaio de genotoxicidade para as linhagens A172 e U87-MG.

	Probabilidade do cometa (%)	Cabeça do cometa (%)	Comprimento da cauda (px)	Área da cauda (px)	Cauda de DNA (%)	Valor de p
A172 controle	-1,17 +- 17,24	74,56 +- 40,23	5,37 +- 12,54	319,30 +- 638,04	25,42 +- 40,20	
A172 Tratada	12,20 +- 84,16	52,83 +- 40,50	20,00 +- 32,61	542,82 +- 32,61	49,85 +- 39,57	p>0,0001
U87-MG controle	0,94 +- 15,06	67,61 +- 39,58	6,49 +- 14,12	103,67 +- 211,74	22,14 +- 33,84	
U87-MG tratada	1,04 +- 20,87	75,04 +- 31,04	12,63 +- 12,87	228,01 +- 311,00	30,53 +- 35,34	p>0,0001

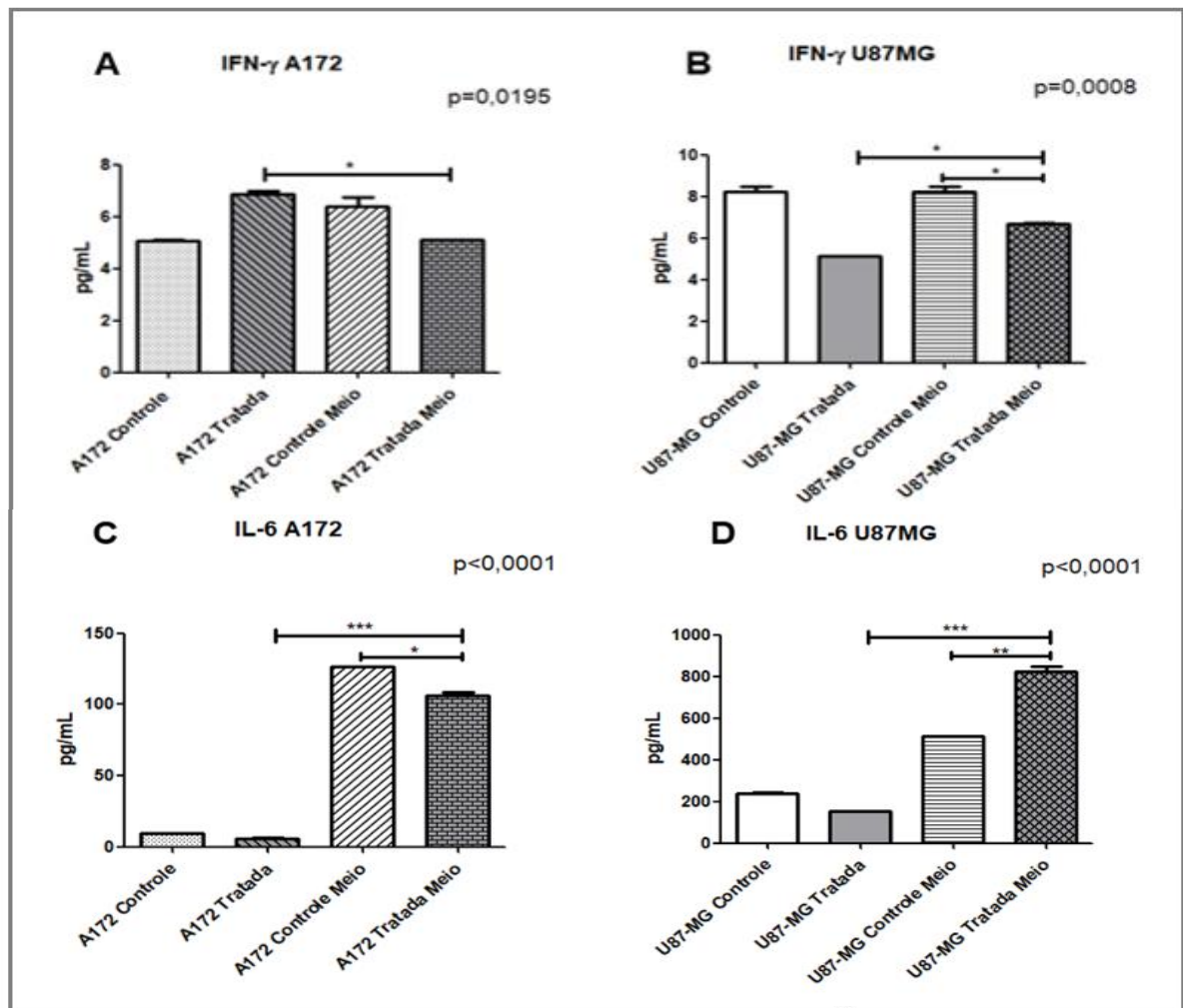
Fonte: Elaborado pela autora. Média e desvio padrão. *Software Cometscore 2.0*.

4.2.6 Dosagem de citocina

Na linhagem A172, o tratamento com a FAE aumentou a expressão de INF- γ no sobrenadante do lisado celular ($p<0,05$), mas reduziu a liberação dessa citocina no sobrenadante do meio de cultura (Figura 15A). Já na linhagem U87-MG, o tratamento com a FAE reduziu o nível de INF- γ no sobrenadante do lisado ($p<0,01$) e do meio ($p<0,05$) (Figura 15B).

O tratamento com a FAE não alterou a expressão de IL-6 no sobrenadante do lisado celular em ambas as linhagens celulares. Contudo, houve redução da liberação de IL-6 para o meio de cultivo, na linhagem A172 ($p<0,05$) (Figura 15C), bem como aumento no nível dessa citocina no meio na linhagem U87-MG ($p<0,01$) (Figura 15D), em resposta a administração da FAE.

Figura 15 – Dosagem de citocinas nas células de GBM em pg/ml. Em A) IFN- γ em A172 Controle x A172 Tratada: $5,0 \pm 7,0$. A172 meio do controle x A172 meio das células tratadas: $6,75 \pm 5,11$. Em B) IFN- γ em U87-MG Controle x U87-MG Tratada: $8,47 \pm 5,11$. U87-MG meio do controle x U87-MG meio das células tratadas: $8,47 \pm 6,60$. U87-MG Tratada x U87-MG meio das células tratadas: $5,11 \pm 6,6$. U87-MG Tratada x U87-MG meio do controle: $5,11 \pm 8,47$. U87-MG Controle x U87-MG meio das células tratadas: $8,47 \pm 6,6$. Em C) IL-6 em A172 Controle x A172 meio das células tratadas: $9,56 \pm 108,68$. A172 Controle x A172 meio do controle: $9,56 \pm 126,67$. A172 Tratada x A172 meio das células tratadas: $6,75 \pm 108,68$. A172 Tratada x A172 meio do controle: $6,75 \pm 9,56$. A172 meio do controle x A172 meio das células tratadas: $9,56 \pm 108,68$. Em D), IL-6 em U87-MG Controle x U87-MG meio das células tratadas: $240,02 \pm 850,61$. U87-MG controle x U87-MG meio do controle: $240,02 \pm 514,71$. U87-MG Tratada x U87-MG meio das células tratadas: $155,78 \pm 850,61$. U87-MG meio do controle x U87-MG meio das células tratadas: $240,02 \pm 850,61$. U87-MG Tratada x U87-MG meio do controle: $155,78 \pm 240,02$.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Expressão proteica

4.3.1 O tratamento com FAE modulou a expressão das proteínas AnxA1, IKK, JAK1, JAK3, MDM2 e STAT3

A expressão das proteínas pode ser observada em ambas as linhagens celulares, A172 e U87-MG.

Nas células A172, a FAE aumentou a expressão da AnxA1 ($p=0,0001$). Entretanto, na linhagem U87-MG a FAE reduziu significativamente a expressão dessa proteína ($p<0,0001$) (Figura 16A e B). A expressão da AnxA1 foi observada no citoplasma e núcleo.

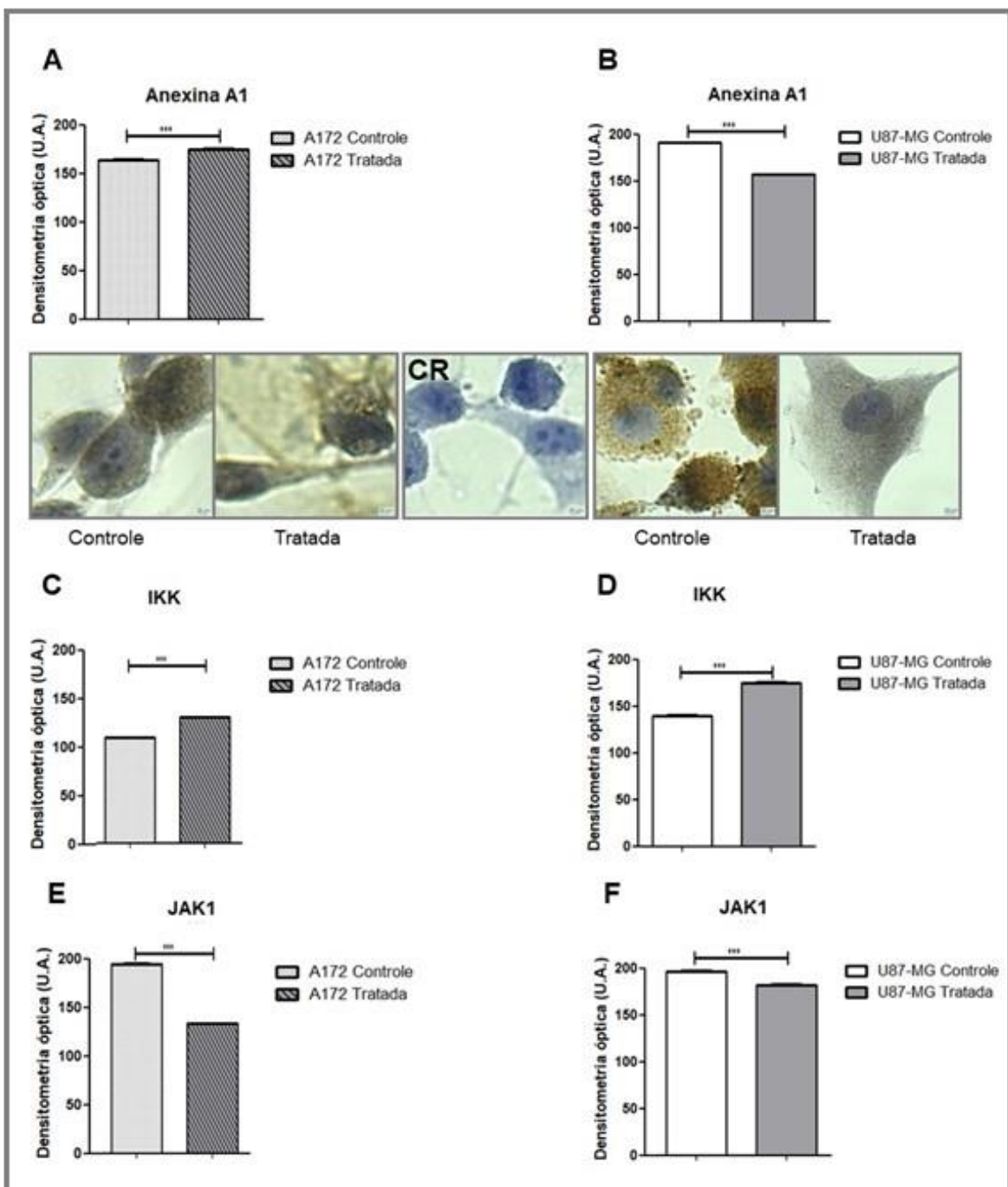
A expressão citoplasmática de IKK foi aumentada em ambas as linhagens após o tratamento com FAE ($p<0,0001$) (Figura 16C e D).

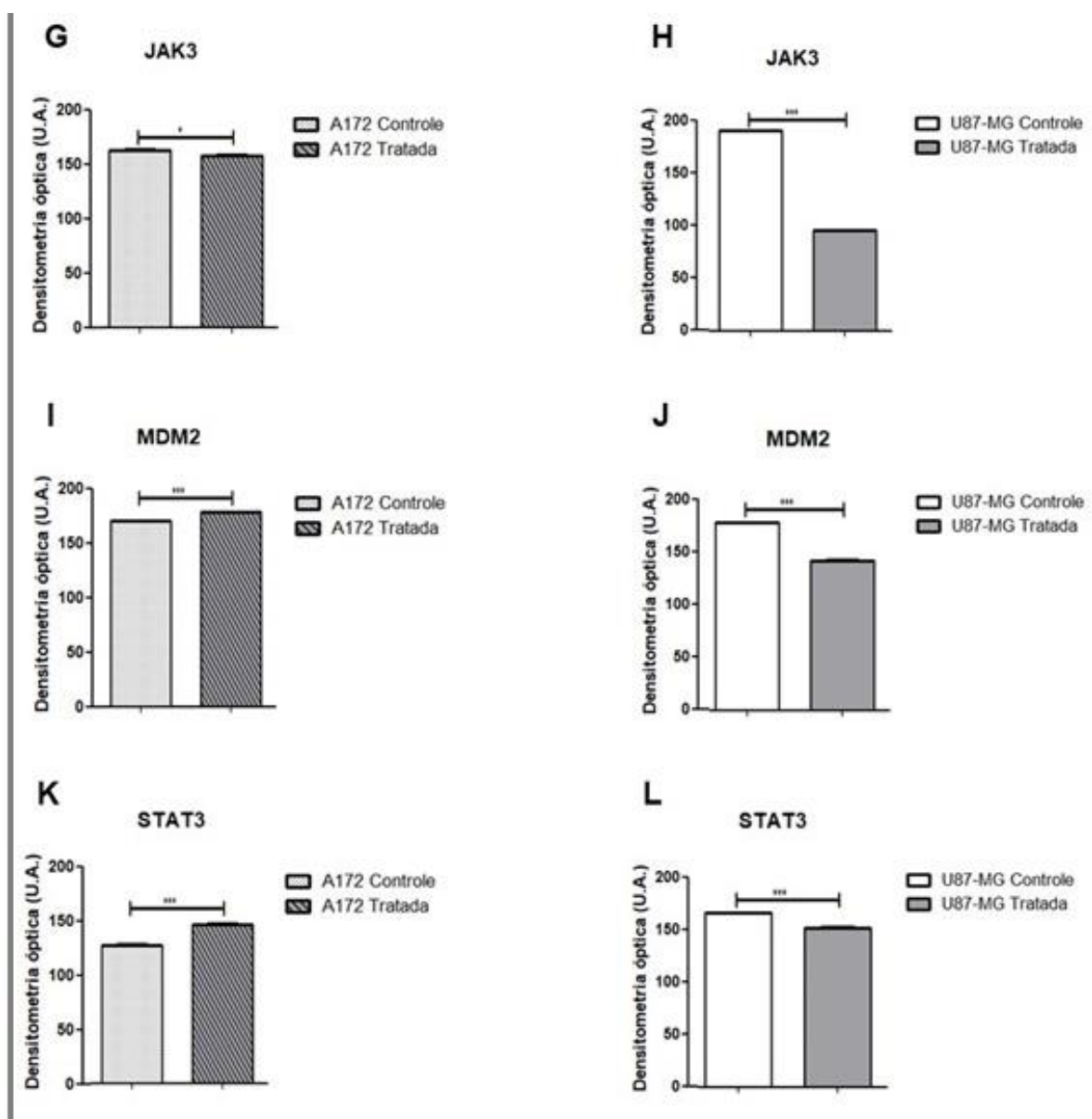
Com relação à expressão citoplasmática de JAK1, após o tratamento com FAE, tanto a A172 quanto a U87-MG demonstraram redução da expressão desta proteína (respectivamente $p<0,0001$ e $p=0,0004$) (Figura 16E e F). Similarmente, a FAE reduziu a expressão de JAK3 na A172 ($p=0,0178$) e U87-MG ($p<0,0001$) (Figura 16G e H).

A expressão nuclear de MDM2, foi aumentada na linhagem A172 ($p=0,0001$) e reduzida na U87-MG ($p<0,0001$), pelo tratamento com a FAE (Figura 16I e J). O mesmo padrão de expressão foi observado para a STAT3, que foi aumentada na linhagem A172 após o tratamento ($p<0,0001$) e reduzida na U87-MG ($p=0,0001$) (Figura 16K e L).

Figura 16 – Expressão das proteínas AnxA1, IKK, JAK1, JAK3, MDM2 e STAT3.

Em A, expressão da AnxA1 em A172 ($p=0,0001$) e B, expressão da AnxA1 em U87-MG ($p>0,0001$). Em C, expressão de IKK em A172 ($p>0,0001$) e D, expressão de IKK em U87-MG ($p>0,0001$). Em E, expressão de JAK1 em A172 ($p>0,0001$) e F, expressão de JAK1 em U87-MG ($p=0,0004$). Em G, expressão de JAK3 em A172 ($p=0,0178$) e H, expressão de JAK3 em U87-MG ($p>0,0001$). Em I, expressão de MDM2 em A172 ($p=0,0001$) e J, expressão de MDM2 em U87-MG ($p>0,0001$). Em K, expressão de STAT3 em A172 ($p>0,0001$) e L, expressão de STAT3 em U87-MG ($p=0,0001$).





Fonte: Elaborado pela autora. CR, controle da reação.

4.3.2 O tratamento com FAE alterou a expressão das proteínas AnxA1, BAX, MMP2 e MMP9

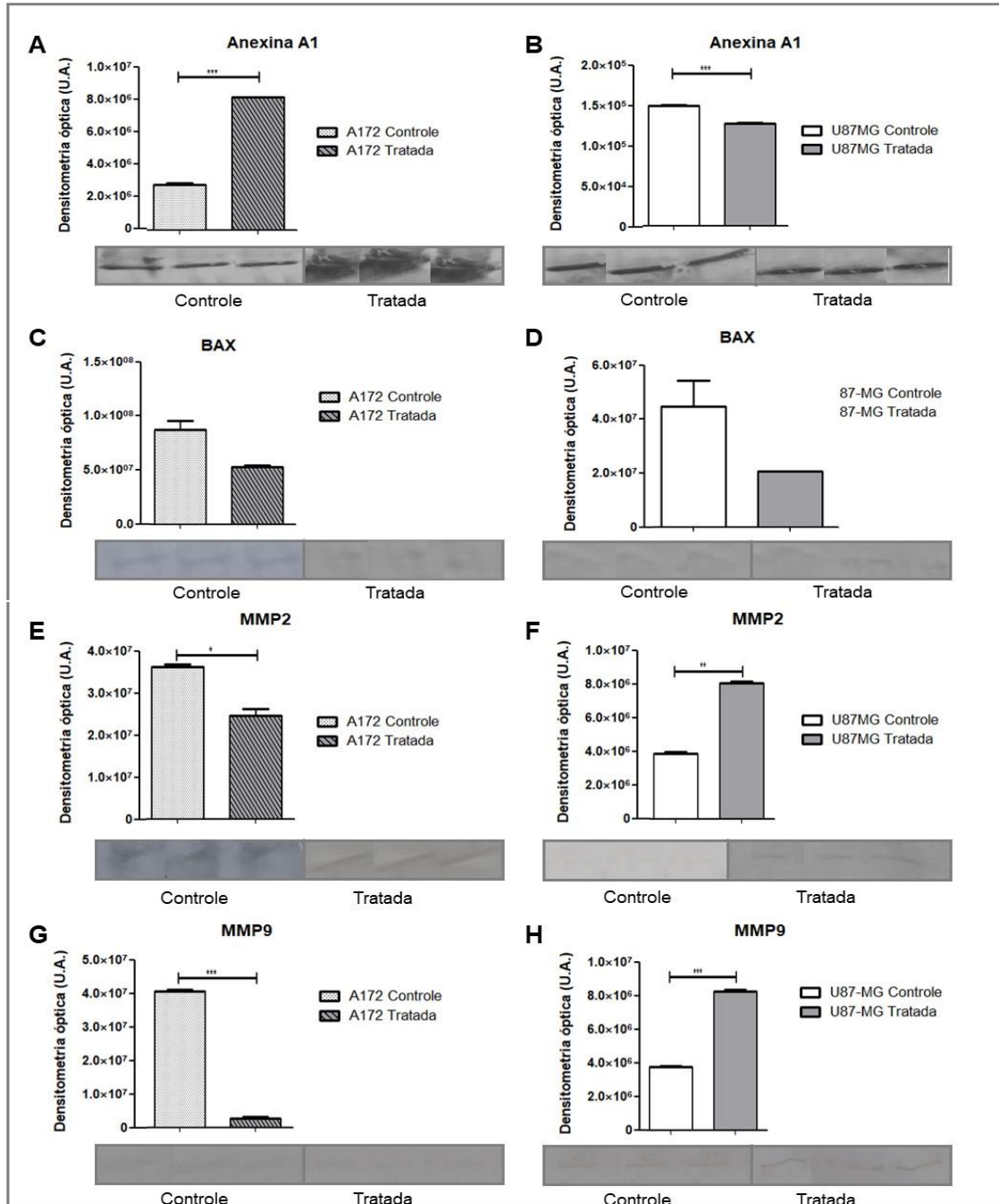
A expressão de AnxA1, foi induzida em A172 após o tratamento com FAE (A172, $p > 0,0001$); no entanto, foi reduzida em U87-MG após o tratamento com FAE (U87-MG, $p = 0,0002$) (Figura 17A e B).

A expressão de BAX, embora com tendência de redução, não foi alterada de maneira significativa em ambas as linhagens após o tratamento com FAE (A172, $p = 0,0535$; U87-MG, $p = 0,1278$) (Figura 17C e D).

Nossas análises demonstram redução significativa na expressão proteica de MMP2 e MMP9 em A172 após o tratamento com FAE (MMP2: A172, $p=0,0196$); e (MMP9: A172, $p=0,0004$) (Figura 17E e F).

A expressão proteica de MMP2 e MMP9 foi induzida em U87-MG após o tratamento com FAE (MMP2: U87-MG, $p=0,0016$) e (MMP9: U87-MG, $p=0,0006$) (Figura 17G e H).

Figura 17 – Expressão das proteínas AnxA1 (A, B), BAX (C, D), MMP2 (E, F) e MMP9 (G, H). A expressão proteica da AnxA1 foi induzida em A172 ($p < 0,0001$) e reduzida em U87-MG ($p = 0,0002$). BAX foi reduzida em ambas as linhagens (A172, $p = 0,0535$ e U87-MG, $p = 0,1278$). MMP2 e MMP9 foram reduzidas na linhagem A172 respectivamente ($p = 0,0196$ e $p = 0,0004$); entretanto ambas aumentaram após a FAE na linhagem U87-MG, respectivamente ($p = 0,0016$ e $p = 0,0006$).



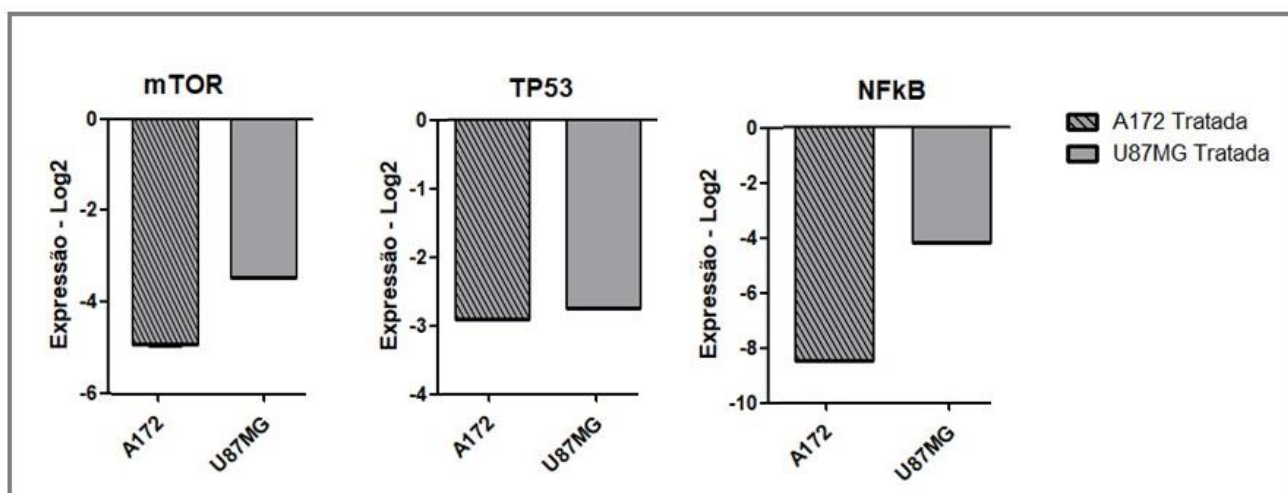
Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.3 O tratamento com FAE reduziu a expressão gênica de *mTOR*, *TP53* e *NFkB*

Os genes de interesse (*mTOR*, *TP53* e *NFkB*) estão envolvidos em cascatas relacionadas com a regulação do metabolismo, proliferação e inflamação (Figura 2). Nas linhagens tumorais, os genes envolvidos nessas cascatas foram modulados após o tratamento com FAE.

Os genes *mTOR*, *TP53* e *NFkB* tiveram suas expressões reduzidas nas células A172 e U87-MG após o tratamento com a FAE (Figura 18).

Figura 18 - Expressão de genes por Real-Time PCR em células A172 e U87-MG. As expressões do RNAm das vias foram analisadas após os tratamentos com FAE, em relação ao controle.

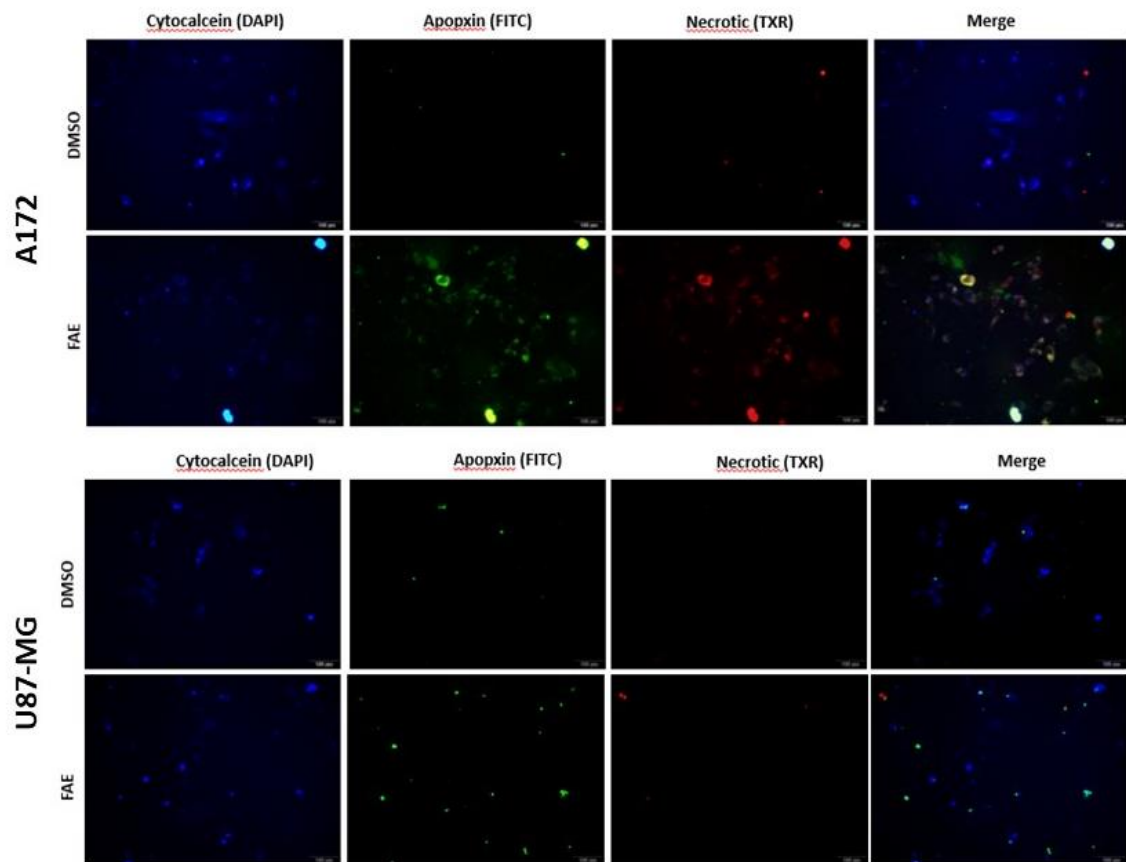


Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.4 A FAE induziu a morte celular nas linhagens tumorais

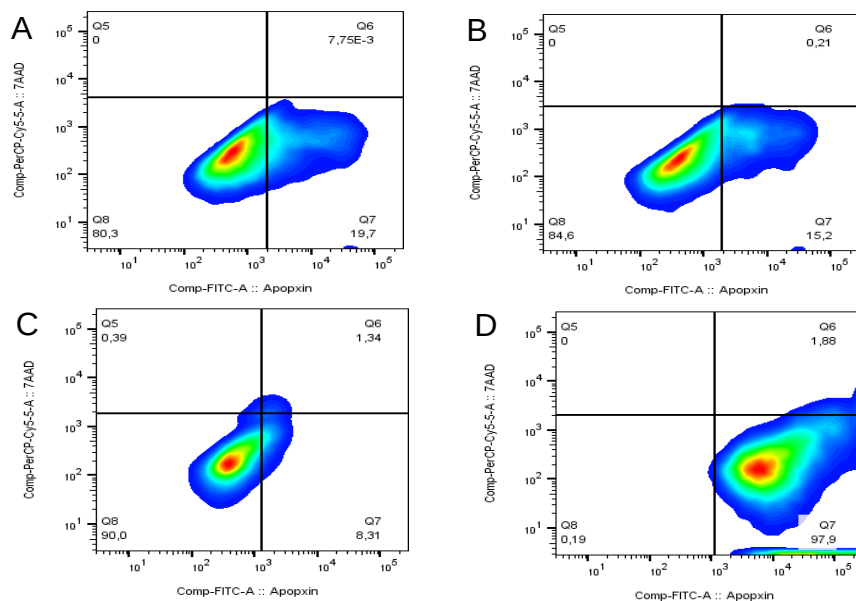
As fotomicrografias na figura 19; bem como os *dot plots* representativos na Figura 20; mostram os resultados obtidos após a incubação com *CytoCalcein Violet 450*, *Apopxin Green Indicator* e 7-AAD. As células viáveis foram marcadas em azul, as células apoptóticas em verde e células necróticas em vermelho. Na figura 20, a porção Q6 representa o número de células mortas onde houve o rompimento da membrana plasmática, permitindo a ligação do DNA com 7-AAD; permitindo a marcação e detecção.

Figura 19 - Fotomicrografia de fluorescência das linhagens A172 e U87-MG. Em azul, células viáveis; em verde células apoptóticas; em vermelho, células necróticas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 20 - Dotplots obtidos da citometria de fluxo. Em A), A172 controle. Em B), A172 tratada com FAE. Em C), U87-MG controle. Em D), U87-MG, tratada com FAE.



Fonte: Elaborado pela autora

5 DISCUSSÃO

Apesar do tratamento do GBM ser intensivo, a baixa eficácia requer novas estratégias terapêuticas que possam melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos (Kamson *et al.*, 2021). Diante das propriedades terapêuticas de compostos bioativos de *P. guajava* (Irshad *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020; Lok *et al.*, 2023), avaliamos a potencialidade antitumorigênica do extrato de folhas de goiaba em diferentes linhagens celulares de GBM.

Nossos achados corroboram com outros estudos que confirmam a presença de catequina, quercetina, luteolina, rutina, ácido gálico e miricetina nas folhas de *P. guajava* (Biswas *et al.*, 2019; Díaz-de-Cerio *et al.*, 2017^a; Jiang *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021). Fitoquímicos como o ácido gálico, catequina, quercetina e rutina são descritos como potenciais antioxidantes, antiproliferativos e agentes antitumorais (Biswas *et al.*, 2019; Cheng & Yang, 1983).

A quercetina é um dos principais compostos fenólicos presente no extrato das folhas de goiaba, com possibilidade de uso terapêutico (Iha *et al.*, 2008; Kumar, Saurabh, *et al.*, 2021). Vijayakumar e colaboradores (2019), identificaram e isolaram a quercetina de folhas de *P. guajava* por cromatografia em camada delgada e observaram efeito inibitório no crescimento de células HepG2; bem como proteção do estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono (CCL₄) (Jamieson *et al.*, 2023; Vijayakumar *et al.*, 2019).

Na literatura, foram testados outros extratos obtidos a partir de folhas de *P. guajava* preparados com metanol, etanol e até mesmo extrato aquoso de brotamento de *P. guajava* em diversas concentrações que variam de 5 a 1.000 µg/ml (Kemegne *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2011; Qamar *et al.*, 2019; Lok *et al.*, 2023). Todas as concentrações demonstraram algum efeito antitumoral nas linhagens KBM5 (leucemia), SCC4 (carcinoma escamoso de língua), U266 (mieloma), HepG2 (carcinoma hepatocelular), DU150 (câncer de próstata) e PC3 (câncer de próstata); suprimindo vias importantes no crescimento e invasão do tumor ou até mesmo induzindo a apoptose (Ashraf *et al.*, 2016; Kemegne *et al.*, 2020; Qamar *et al.*, 2019; Lok *et al.*, 2023).

Nossos achados, indicam efeitos positivos da FAE, no controle da proliferação celular nas linhagens estudadas. De acordo com outra investigação, o extrato de folhas de goiaba é rico em vitamina E, flavonoides e β-cariofileno e apresenta uma

alta atividade anti-proliferativa em linhagens como câncer de cólon humano Caco-2, HT-29, e SW480 (Kumar, *et al.*, 2021).

Além disso, a quercetina isolada de *P. guajava* nas concentrações de 5 a 3 µg/ml foi capaz de reduzir a citotoxicidade em HepG2 (Peng *et al.*, 2011). Ainda, a miricetina regulou as vias EGFR/PI3K/AKT e Ras-ERK em linhagens celulares de GBM humano (DBTRG-05MG, U251 e U87), através da redução de p53 fosforilado e BCL-2; além de induzir BAX e caspases 3 e 9 (Jiang *et al.*, 2019).

O extrato de acetato de etila de folhas de goiaba apresenta boa atividade anti-inflamatória impedindo a ativação de NFκB e STAT1, genes coestimulados por TNF-α e INF-γ (Irshad *et al.*, 2020). Sabe-se que a ativação exacerbada de NFκB afeta o câncer devido à mediação de genes reguladores da proliferação, sobrevivência e angiogênese; entretanto, alguns estudos descrevem repressão de NFκB pelo extrato de goiaba (Kaileh *et al.*, 2007; Lok *et al.*, 2023).

Inclusive o β-cariofileno encontrado na planta é capaz de inibir a inflamação (Joshi *et al.*, 2023). Em nossa investigação, após o tratamento com FAE, observamos redução da expressão de NFκB; bem como redução da liberação das citocinas INF γ e IL-6 no meio em A172; o que sugere possível controle do processo inflamatório.

Kemegne e colaboradores (2020) determinaram o IC50 do extrato etanólico de *P. guajava* na linhagem CCD45 (fibroblasto) menor que 100 µg/ml. Em nosso estudo, houve uma diminuição da viabilidade celular em 24 horas na linhagem endotelial EA-hy 926, com a FAE nas concentrações de 15% (480 µg/ml), e 25% (800 µg/ml), sendo tóxica apenas na concentração de 15%; pois reduziu a viabilidade abaixo de 50% (Kemegne *et al.*, 2020).

O extrato de licopeno na concentração de 5.964 µg/ml inibiu a viabilidade celular da linhagem tumoral MCF-7 (dos Santos *et al.*, 2018). Os compostos 3,5 dihidroxi-2,4-dimetil-1-O-(6'-O-galloyl-β-d-glucopiranosil)-benzofenona (1) e guavinoside B (2) identificados em folhas de *P. guajava* também inibiram o crescimento de células de câncer de cólon humano (HCT116) (Zhu *et al.*, 2019). O composto 1 induziu a apoptose através do aumento dos níveis de p53, p ERK1/2, p-JNK e caspases clivadas 8 e 9; enquanto o composto 2 aumentou os níveis de p53 e caspase clivada 8 (Zhu *et al.*, 2019).

Aterações moleculares entre as células, como alterações na expressão gênica, mutações, podem resultar em diferentes interações; bem como respostas

heterogêneas (Gomes *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2019). As linhagens tumorais testadas, em algumas análises, demonstraram respostas distintas; o que possivelmente poderia ser explicado pelo conjunto de alterações gênicas, já que a A172 apresenta mutações em *CDKN2A* e *PTEN*; enquanto que a U87-MG possui mutações em *CDKN2A*, *PTEN* e *CDKN2C* (Bamford *et al.*, 2004).

Nas duas linhagens celulares, foi possível observar que houve danos significativos após o tratamento com a FAE. A apoptose celular pode ser identificada de forma efetiva através da cauda do cometa; pois quando há dano, o DNA se move para a cauda do cometa (Walsh & Kato, 2023).

Nossas análises demonstraram aumento de INF- γ na A172 e redução na U87-MG quando comparado o lisado celular controle com o lisado das células expostas à FAE. Na linhagem U87-MG também foi observada redução de JAK1, JAK3 e STAT3 concomitantemente. No entanto, na A172 observou-se redução de JAK1 e JAK3; porém, STAT3 foi aumentada. Lok e colaboradores (2023), descrevem a ação de diferentes partes da *P. guajava* na resposta imune, inclusive atuando nos genes NFkB e INF γ (Lok *et al.*, 2023). Além disso, INF- γ pode ativar JAK/STAT3 (Lok *et al.*, 2023).

O tratamento não alterou a expressão de IL-6 no sobrenadante do lisado celular em ambas as linhagens. Entretanto, houve redução de IL-6 no meio de cultivo da A172 bem como indução de IL-6 no meio de cultivo da U87-MG. A secreção de IL-6 aumenta a expressão de MMPs pelas células tumorais (Chouleur *et al.*, 2020); no entanto, apesar da indução de IL-6 no meio de cultivo da U87-MG, não houve aumento de MMPs em nosso estudo. Inclusive, também foi observada a redução de STAT3 na U87-MG, o que sugere que neste caso não houve atividade constitutiva de STAT3 e IL-6, já que não observamos uma relação inversa entre eles.

A expressão de BAX foi reduzida em ambas as linhagens após o tratamento com FAE; porém, não foi significativa. Outra investigação demonstrou o efeito das sementes e fruta de *P. guajava* na regulação de BAX/BCL-2 e NFkB resultando na inibição da proliferação da linhagem U87-MG e aumento da apoptose (Hosseini *et al.*, 2023). Inclusive, compostos como a quercetina e licopeno são capazes de desregular BAX/BCL-2, e interromper o ciclo celular; além de regular negativamente MMP2 e MMP9 (Lok *et al.*, 2023); redução que também observamos em ambas as linhagens. Essa regulação negativa de MMP2 e MMP9 pela quercetina, pode prejudicar a migração e invasão celular (Huynh *et al.*, 2023). O guajadial e licopeno encontrado nas folhas de *P. guajava* apresenta atividade antiproliferativa e antimigratória; o que

possivelmente regulou negativamente as metaloproteinases na U87-MG reduzindo a proliferação (Lok *et al.*, 2023).

A expressão da AnxA1 foi induzida pela FAE na linhagem A172 e reduzida na U87-MG. A proteína Anexina A1 (AnxA1) pode atuar como supressora ou promotora de tumor (Araújo *et al.*, 2021; Gastardelo *et al.*, 2014). Apesar da expressão ser limitada no cérebro, estudos anteriores encontraram superexpressão em GBM e uma correlação positiva entre AnxA1 e MMP9, sugerindo que a AnxA1 pode induzir a expressão de MMP9 e resultar na progressão tumoral (Tadei *et al.*, 2018); enquanto que em outro estudo, observou-se que o aumento da expressão pode melhorar as células endoteliais vasculares e a necrose neuronal, além de manter a integridade da BHE e reduzir o edema cerebral causado por hemorragia (Han *et al.*, 2020). Inclusive, no proteoma de linhagens celulares de GBM, a AnxA1 apresentou significância prognóstica, sendo inversamente relacionada à sobrevida global, possivelmente por promover a invasão do GBM (Mallawaarachy *et al.*, 2015).

Finalmente, com relação às análises de expressão gênica, a FAE reduziu a expressão de *TP53* em ambas as linhagens. No entanto, em A172, essa redução possivelmente resultou do aumento de MDM2 que inibe *TP53*. A FAE também suprimiu a expressão de *NFkB* e *mTOR*, o que sugere controle do processo inflamatório e potencial efeito antitumoral (Lok *et al.*, 2023).

6 CONCLUSÕES

Nossos achados nos permitem concluir que o extrato bruto e fração acetato de etila de folhas de *Psidium guajava* possuem compostos secundários com propriedades terapêuticas; principalmente terpenos e flavonoides. Além de alta taxa de atividade antioxidante e baixa citotoxicidade.

A fração acetato de etila não altera a morfologia celular das linhagens EA-hy926, A172 e U87-MG, porém reduz a proliferação celular e induz danos ao DNA em ambas as linhagens tumorais, nas concentrações de 25% e de 15%, respectivamente, em A172 e U87-MG.

O tratamento com a FAE também modula a expressão de mediadores químicos envolvidos em processos importantes na tumorigênese.

Com relação às citocinas, aumenta IFN- γ no sobrenadante do lisado celular de A172, mas reduz no sobrenadante do meio de cultura. Em U87-MG, reduz em ambos sobrenadantes. A FAE não altera os níveis de IL-6 nos sobrenadantes do lisado de A172 e U87-MG. Contudo, a liberação dessa citocina é reduzida em A172 e induzida em U87-MG.

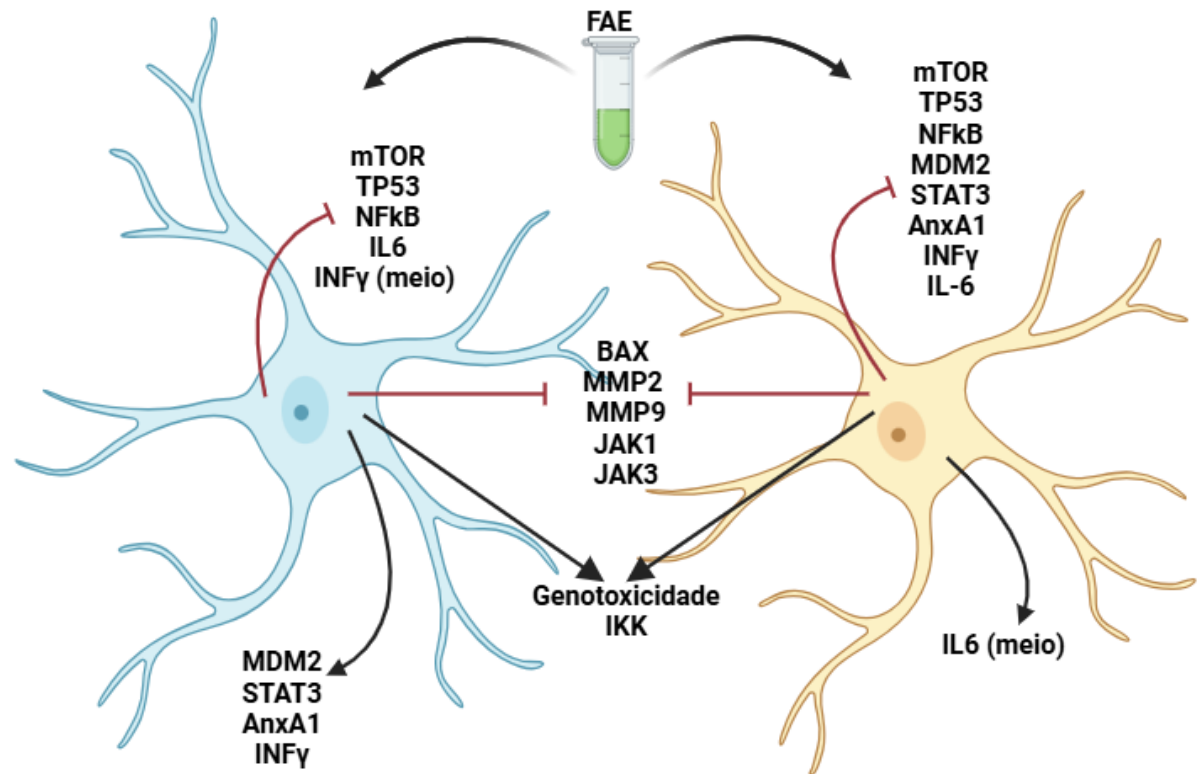
As expressões das proteínas JAK-1 e JAK-3 são reduzidas, enquanto IKK é aumentada nas células de ambas as linhagens. Quanto às outras proteínas, suas expressões foram diferentes para cada tipo celular, sendo AnxA1, MDM2 e STAT3 aumentadas em A172 e reduzidas em U87-MG.

Similarmente, no sobrenadante dos lisados celulares, AnxA1 aumenta em A172 e reduz em U87-MG, enquanto MMP2 e MMP9 são reduzidas em A172 e aumentadas em U87-MG.

A FAE reduz a expressão gênica de *mTOR*, *TP53* e *NFkB* em ambas as linhagens; bem como induziu a morte celular.

Portanto, a fração acetato de etila de folhas *P. guajava*, por meio da sinergia dos seus compostos bioativos, participa da regulação de importantes mecanismos relacionados à proliferação, inflamação e apoptose; o que possibilita o aprofundamento de estudos com o extrato na busca de futuras propostas terapêuticas para o GBM. A figura 18 sintetiza os resultados apresentados.

Figura 21 - Compilação dos achados chave que sustentam as conclusões deste trabalho. Criado com BioRender.com.



Fonte: Elaborado pela autora

REFERÊNCIAS

- Abbas, M. N., Kausar, S., & Cui, H. (2020). Therapeutic potential of natural products in glioblastoma treatment: targeting key glioblastoma signaling pathways and epigenetic alterations. In *Clinical and Translational Oncology* (Vol. 22, Issue 7, pp. 963–977). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02227-3>
- Aggarwal, B. B., Vijayalekshmi, R. V., & Sung, B. (2009). Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: Short-term friend, long-term foe. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 15, Issue 2, pp. 425–430). Clin Cancer Res. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0149>
- Aliyu, M., Zohora, F. T., Anka, A. U., Ali, K., Maleknia, S., Saffarioun, M., & Azizi, G. (2022). Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. *International Immunopharmacology*, 111. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2022.109130>
- Andrade, A. P. C. de;, Magalhães, N. P., Silva, A. S. A. da;, Oliveira, D. R. de;, Farias, A. S. de;, & Rios, D. A. da S. (2019). Ação antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos e aquosos da folha da goiabeira (*Psidium guajava* L.) no controle de *Staphylococcus aureus* ATCC 27922, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Listeria monocytogenes* SCOTT A. *Segurança Alimentar e Nutricional*. <https://doi.org/DOL: http://dx.doi.org/10.20396/san.v26i0.8655619>
- Araújo, T. G., Mota, S. T. S., Ferreira, H. S. V., Ribeiro, M. A., Goulart, L. R., & Vecchi, L. (2021). Annexin A1 as a Regulator of Immune Response in Cancer. *Cells*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/CELLS10092245>
- Arvanitis, C. D., Ferraro, G. B., & Jain, R. K. (2020). The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature Reviews. Cancer*, 20(1), 26. <https://doi.org/10.1038/S41568-019-0205-X>
- Ashino, T. E. B., Sanf Ana, M. L., Yoshikawa, A. H., Possebon, L., de Souza Costa, S., Iyomasa-Pilon, M. M., Souza, H. R., Gonçalves, G. A., Oliani, S. M., & Girol, A. P. (2021). Protective effects of piperlongumin in the prevention of inflammatory damage caused by pulmonary exposure to benzopyrene carcinogen. *International Immunopharmacology*, 101(Pt B). <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2021.108285>
- Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Flanagan, A., Teague, J., Futreal, P. A., Stratton, M. R., & Wooster, R. (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website.

British Journal of Cancer, 91(2), 355–358.
<https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6601894>

Bao, F., Hao, P., An, S., Yang, Y., Liu, Y., Hao, Q., Ejaz, M., Guo, X. X., & Xu, T. R. (2021). Akt scaffold proteins: the key to controlling specificity of Akt signaling. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 321(3), C429–C442.
<https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00146.2020>

Bello, C., Vazquez-Blomquist, D., Miranda, J., Garcia, Y., Novoa, L., Palenzuela, D., & Bello, I. (2014). Regulation by IFN- α /IFN- γ Co-Formulation (HerberPAG®) of Genes Involved in Interferon-STAT-Pathways and Apoptosis in U87MG. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(3), 351–358.
<https://doi.org/10.2174/1568026613666131204125725>

Belousov, A., Titov, S., Shved, N., Garbuz, M., Malykin, G., Gulaia, V., Kagansky, A., & Kumeiko, V. (2019). The Extracellular Matrix and Biocompatible Materials in Glioblastoma Treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00341>

Birkinshaw, R. W., & Czabotar, P. E. (2017). The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 72, pp. 152–162). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.04.001>

Biswas, S., Talukdar, P., Nath Talapatra, S., & Professor, A. (2019). Presence of phytochemicals in fruits and leaves of guava (*Psidium guajava* Linn.) for cancer prevention: A mini review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(4-s), 726–729. <https://doi.org/10.22270/JDDT.V9I4-S.3290>

Boccolini, P. de M. M., & Boccolini, C. S. (2020). Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use in Brazil. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2842-8>

Chang, C. L., Lin, C. S., & Lai, G. H. (2012). Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/984295>

Chen, L., Liu, S., & Tao, Y. (2020). Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-020-0196-9>

Chen, N., Peng, C., & Li, D. (2022). Epigenetic Underpinnings of Inflammation: A Key to Unlock the Tumor Microenvironment in Glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.869307>

Chen, R., Chen, C., Han, N., Guo, W., Deng, H., Wang, Y., Ding, Y., & Zhang, M. (2022). Annexin-1 is an oncogene in glioblastoma and causes tumour immune escape through the indirect upregulation of interleukin-8. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(15), 4343–4356. <https://doi.org/10.1111/JCMM.17458>

Cheng, J. T., & Yang, R. S. (1983). Hypoglycemic effect of guava juice in mice and human subjects. *The American Journal of Chinese Medicine*, 11(1–4), 74–76. <https://doi.org/10.1142/S0192415X83000124>

Cheng, S. X., Tu, Y., & Zhang, S. (2013). FoxM1 Promotes Glioma Cells Progression by Up-Regulating Anxa1 Expression. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072376>

Chukwueke, U. N., & Wen, P. Y. (2019). Use of the Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) criteria in clinical trials and clinical practice. *CNS Oncology*, 8(1), CNS28. <https://doi.org/10.2217/cns-2018-0007>

Dahanayake, J. M., Perera, P. K., Galappatty, P., Perera, H. D. S. M., & Arawwawala, L. D. A. M. (2019). Comparative Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of Tamalakyadi Decoction with Its Modified Dosage Forms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6037137>

De Boeck, A., Ahn, B. Y., D'Mello, C., Lun, X., Menon, S. V., Alshehri, M. M., Szulzewsky, F., Shen, Y., Khan, L., Dang, N. H., Reichardt, E., Goring, K. A., King, J., Grisdale, C. J., Grinshtein, N., Hambardzumyan, D., Reilly, K. M., Blough, M. D., Cairncross, J. G., ... Senger, D. L. (2020). Glioma-derived IL-33 orchestrates an inflammatory brain tumor microenvironment that accelerates glioma progression. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-18569-4>

Desoti, V. C., Maldaner, C. L., Carletto, M. S., Heinz, A. A., Coelho, M. S., Piat, D., & Tiuman, T. S. (2011). Triagem Fitoquímica E Avaliação Das Atividades Antimicrobiana E Citotóxica De Plantas Medicinais Nativas Da Região Oeste Do Estado Do Paraná. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, 15(1), 3–13.

Díaz-de-Cerio, E., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2017). Health effects of Psidium guajava L. Leaves: An

overview of the last decade. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18040897>

Doshi, G., & Une, H. (2016). Quantification of Quercetin and Rutin from Benincasa hispida Seeds and Carissa Congesta Roots by High-performance Thin Layer Chromatography and High-performance Liquid Chromatography. *Pharmacognosy Research*, 8(1), 37–42. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.171098>

Dourado, R. S., & Ladeira, Â. M. (2008). Identificação de flavonóides em Hypericum cordatum (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 31(4), 611–620. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042008000400007>

El Khayari, A., Bouchmaa, N., Taib, B., Wei, Z., Zeng, A., & El Fatimy, R. (2022). Metabolic Rewiring in Glioblastoma Cancer: EGFR, IDH and Beyond. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.901951>

Figueiredo, S. A., Vilela, F. M. P., Silva, C. A. da, Cunha, T. M., dos Santos, M. H., & Fonseca, M. J. V. (2014). In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of Garcinia brasiliensis epicarp extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 131, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.004>

Garima, G., Thanvi, S., Singh, A., & Verma, V. (2022). Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Mutation, an Emerging Molecular Marker in Glioblastoma Multiforme Patients: A Single Institution Study on the Indian Population. *Cureus*, 14(6). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.26412>

Gastardelo, T. S., Cunha, B. R., Raposo, L. S. R., Maniglia, J. V., Cury, P. M., Lisoni, F. V. C. R., Tajara, E. H., & Oliani, S. M. (2014). Inflammation and cancer: Role of annexin a1 and FPR2/ALX in proliferation and metastasis in human laryngeal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111317>

Glaviano, A., Foo, A. S. C., Lam, H. Y., Yap, K. C. H., Jacot, W., Jones, R. H., Eng, H., Nair, M. G., Makvandi, P., Georger, B., Kulke, M. H., Baird, R. D., Prabhu, J. S., Carbone, D., Pecoraro, C., Teh, D. B. L., Sethi, G., Cavalieri, V., Lin, K. H., ... Kumar, A. P. (2023). PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-023-01827-6>

Gomes, I., Moreno, D. A., dos Reis, M. B., da Silva, L. S., Leal, L. F., Gonçalves, G. M., Pereira, C. A., Oliveira, M. A., de Medeiros Matsushita, M., & Reis, R. M.

(2021). Low MGMT digital expression is associated with a better outcome of IDH1 wildtype glioblastomas treated with temozolomide. *Journal of Neuro-Oncology*, 151(2), 135–144. <https://doi.org/10.1007/S11060-020-03675-6>

Gray, G. K., McFarland, B. C., Nozell, S. E., & Benveniste, E. N. (2014). NF- κ B and STAT3 in glioblastoma: therapeutic targets coming of age. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 14(11), 1293–1306. <https://doi.org/10.1586/14737175.2014.964211>

Guo, C., Liu, S., & Sun, M. Z. (2013). Potential role of Anxa1 in cancer. In *Future Oncology* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1773–1793). Future Oncol. <https://doi.org/10.2217/fon.13.114>

Ham, S. W., Jeon, H. Y., Jin, X., Kim, E. J., Kim, J. K., Shin, Y. J., Lee, Y., Kim, S. H., Lee, S. Y., Seo, S., Park, M. G., Kim, H. M., Nam, D. H., & Kim, H. (2019a). TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma. *Cell Death and Differentiation*, 26(3), 409–425. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0126-3>

Han, P. F., Che, X. Da, Li, H. Z., Gao, Y. Y., Wei, X. C., & Li, P. C. (2020). Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. *Chinese Journal of Traumatology*, 23(2), 96. <https://doi.org/10.1016/J.CJTEE.2020.02.002>

Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 18(16), 1926–1945. <https://doi.org/10.1101/GAD.1212704>

Hernández Borrero, L. J., & El-Deiry, W. S. (2021). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1876(1), 188556. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2021.188556>

Hoffmann, A., & Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunological Reviews*, 210, 171–186. <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2006.00375.X>

Hori, T., Sasayama, T., Tanaka, K., Koma, Y. ichiro, Nishihara, M., Tanaka, H., Nakamizo, S., Nagashima, H., Maeyama, M., Fujita, Y., Yokozaki, H., Hirose, T., & Kohmura, E. (2019). Tumor-associated macrophage related interleukin-6 in cerebrospinal fluid as a prognostic marker for glioblastoma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 68, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2019.07.020>

Hosseini, A., Alavi, M. S., Shahraki, A. R., Rajabian, A., Afshari, A. R., Kesharwani, P., & Sahebkar, A. (2023a). Psidium guajava induces cytotoxicity in human malignant glioblastoma cell line: Role of reactive oxygen species.

Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA, 89. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2023.105567>

Hotfilder, M., Knupfer, H., Mohlenkamp G, Pennakamp P, Knupfers M, Van Gool S, & Wolff J E. (2000). *Interferon-gamma increases IL-6 production in human glioblastoma cell lines*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11205286/>

Huang, W., Li, J., Zhu, H., Qin, X., Chen, C., Wang, B., Wei, J., Song, Y., Lu, X., Li, Z., Xia, W., He, A., Cheng, L., Yu, X., Shu, K., & Wang, W. (2024). A novel EGFR variant EGFRx maintains glioblastoma stem cells through STAT5. *Neuro-Oncology*, 26(1), 85. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAD153>

Huynh, C. B., Nagaarudkumaran, N., Kalyaanamoorthy, S., & Ngo, W. (2023). In Silico and In Vitro Approach for Validating the Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 by Quercetin. *Eye & Contact Lens*, 49(5), 193–198. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000982>

INCA. (2023). *Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer*.

Irshad, Z., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Jilani, M. I., & Tavallali, V. (2020). Guava. *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery*, 341–354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00026-4>

Jamieson, S., Wallace, C. E., Das, N., Bhattacharyya, P., & Bishayee, A. (2023). Guava (*Psidium guajava* L.): a glorious plant with cancer preventive and therapeutic potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(2), 192–223. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1945531>

Javid, H., Soltani, A., Mohammadi, F., & Hashemy, S. I. (2019). Emerging roles of microRNAs in regulating the mTOR signaling pathway during tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(7), 10874–10883. <https://doi.org/10.1002/jcb.28401>

Jia, B. X., Huangfu, Q. Q., Ren, F. X., Jia, L., Zhang, Y. B., Liu, H. M., Yang, J., & Wang, Q. (2015). Identification and quantification of flavonoids and chromes in *Baeckea frutescens* by using HPLC coupled with diode-array detection and quadruple time-of-flight mass spectrometry. *Natural Product Research*, 29(9), 800–806. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.987144>

Jiang, L., Lu, J., Qin, Y., Jiang, W., & Wang, Y. (2020). Antitumor effect of guava leaves on lung cancer: A network pharmacology study. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(11), 7773–7797. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.09.010>

Johnson, D. G., & Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 3. <https://doi.org/10.2741/A291>

Joshi, D. M., Pathak, S. S., Banmare, S., & Bhaisare, S. S. (2023). Review of Phytochemicals Present in Psidium guajava Plant and Its Mechanism of Action on Medicinal Activities. *Cureus*, 15(10). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.46364>

Kaileh, M., Berghe, W. Vanden, Boone, E., Essawi, T., & Haegeman, G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 510–516. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2007.07.008>

Kamson, D. O., Khela, H. S., & Laterra, J. (2021). Investigational new drugs against glioblastoma. *Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Innovative Reversal Strategies*, 31–77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821567-8.00002-6>

Kemegne, G. A., Bettache, N., Nyegue, M. A., Etoa, F.-X., & Menut, C. (2020). Cytotoxic activities of Psidium guajava and Mangifera indica plant extracts on human healthy skin fibroblasts and human hepatocellular carcinoma. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 8(4), 58–64. <https://doi.org/10.15739/ibspr.20.007>

Kim, H., Moon, J. Y., Ahn, K. S., & Cho, S. K. (2013). Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/596496>

Knüpfer, M. M., Poppenborg, H., Van Gool, S., Domula, M., & Wolff, J. E. A. (1997). Interferon-gamma inhibits proliferation and adhesion of T98G human malignant glioma cells in vitro. *Klinische Padiatrie*, 209(4), 271–274. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1043961>

Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., & Sofuni, T. (1995). A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *Mammalian Mutagenicity Study Group Communications*, 3(2), 103–115. https://jglobal.jst.go.jp/en/detail?JGLOBAL_ID=200902158745722754

Kominsky, S. L., Subramaniam, P. S., Johnson, H. M., & Torres, B. A. (2000). Inhibitory effects of IFN- γ and acyclovir on the glioblastoma cell cycle. *Journal of*

Interferon and Cytokine Research, 20(5), 463–469.
<https://doi.org/10.1089/10799900050023870>

Kumar, M., Saurabh, V., Tomar, M., Hasan, M., Changan, S., Sasi, M., Maheshwari, C., Prajapati, U., Singh, S., Prajapat, R. K., Dhumal, S., Punia, S., Amarowicz, R., & Mekhemar, M. (2021). Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves: Nutritional Composition, Phytochemical Profile, and Health-Promoting Bioactivities. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 10(2), 1–23.
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX10020299>

Lahalle, A., Lacroix, M., de Blasio, C., Cissé, M. Y., Linares, L. K., & le Cam, L. (2021). The p53 Pathway and Metabolism: The Tree That Hides the Forest. *Cancers*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13010133>

Li, R., Li, G., Deng, L., Liu, Q., Dai, J., Shen, J., & Zhang, J. (2010). IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncology Reports*, 23(6), 1553–1559.
https://doi.org/10.3892/OR_00000795

Li, X., Lalic, J., Baeza-Centurion, P., Dhar, R., & Lehner, B. (2019). Changes in gene expression predictably shift and switch genetic interactions. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11735-3>

Lim, Y. C., Quek, H., Offenhäuser, C., Fazry, S., Boyd, A., Lavin, M., Roberts, T., & Day, B. (2018). ATM inhibition prevents interleukin-6 from contributing to the proliferation of glioblastoma cells after ionizing radiation. *Journal of Neuro-Oncology*, 138(3), 509–518. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2838-0>

Lin, B., Ziebro, J., Smithberger, E., Skinner, K. R., Zhao, E., Cloughesy, T. F., Binder, Z. A., O'Rourke, D. M., Nathanson, D. A., Furnari, F. B., & Miller, C. R. (2022). EGFR, the Lazarus target for precision oncology in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 24(12), 2035. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAC204>

Lin, Y., Bai, L., Chen, W., & Xu, S. (2010). The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(1), 45–55. <https://doi.org/10.1517/14728220903431069>

Liu, Q., Li, G., Li, R., Shen, J., He, Q., Deng, L., Zhang, C., & Zhang, J. (2010). IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines. *Journal of Neuro-Oncology*, 100(2), 165–176.
<https://doi.org/10.1007/S11060-010-0158-0/FIGURES/6>

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017 2:1, 2(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

Liu, Y., Tang, Z. G., Lin, Y., Qu, X. G., Lv, W., Wang, G. Bin, & Li, C. L. (2017). Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 92, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.044>

Loeffler, S., Fayard, B., Weis, J., & Weissenberger, J. (2005). Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *International Journal of Cancer*, 115(2), 202–213. <https://doi.org/10.1002/ijc.20871>

Lok, B., Babu, D., Tabana, Y., Dahham, S. S., Adam, M. A. A., Barakat, K., & Sandai, D. (2023a). The Anticancer Potential of Psidium guajava (Guava) Extracts. *Life*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/LIFE13020346>

Lopez, A., Reyna, D. E., Gitego, N., Kopp, F., Zhou, H., Miranda-Roman, M. A., Nordstrøm, L. U., Narayanagari, S. R., Chi, P., Vilar, E., Tsirigos, A., & Gavathiotis, E. (2022). Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-28741-7>

Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestier, O. D., Cavenee, W. K., Ellison, D. W., Figarella-branger, D., Perry, A., Reifenberger, G., & Deimling, A. Von. (2016). *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System World Health Organization Classification of Tumours WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*.

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAB106>

Mallawaaratchy, D. M., Buckland, M. E., McDonald, K. L., Li, C. C. Y., Ly, L., Sykes, E. K., Christopherson, R. I., & Kaufman, K. L. (2015). Membrane Proteome Analysis of Glioblastoma Cell Invasion. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 74(5), 425–441. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000187>

Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: Past, present and future. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 2, Issue 2, pp. 143–148). European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/nrc723>

McFarland, B. C., Hong, S. W., Rajbhandari, R., Twitty, G. B., Gray, G. K., Yu, H., Benveniste, E. N., & Nozell, S. E. (2013). NF- κ B-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078728>

McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., Mastrogianakis, G. M., Olson, J. J., Mikkelsen, T., Lehman, N., Aldape, K., Yung, W. K. A., Bogler, O., Weinstein, J. N., VandenBerg, S., Berger, M., Prados, M., Muzny, D., Morgan, M., Scherer, S., ... Thomson, E. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>

Memmott, R. M., & Dennis, P. A. (2009). Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular Signalling*, 21(5), 656–664. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2009.01.004>

Monteiro, A. R., Hill, R., Pilkington, G. J., & Madureira, P. A. (2017). The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/CELLS6040045>

Morana, O., Wood, W., & Gregory, C. D. (2022). The Apoptosis Paradox in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS23031328>

Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncology*, 23(Suppl 3), iii1. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAB200>

Owen, K. L., Brockwell, N. K., & Parker, B. S. (2019). JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11122002>

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), E45. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45>

Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 4. <https://doi.org/10.3389/FONC.2014.00064>

Possebon, L., de Souza Lima Lebron, I., Furlan da Silva, L., Tagliaferri Paletta, J., Glad, B. G., Sant'Ana, M., Iyomasa-Pilon, M. M., Ribeiro Souza, H., de Souza Costa, S., Pereira da Silva Rodrigues, G., Pereira, M. de L., de Haro Moreno, A., & Girol, A. P. (2018). Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 99, 591–597. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.01.106>

Qian, J., Wang, C., Wang, B., Yang, J., Wang, Y., Luo, F., Xu, J., Zhao, C., Liu, R., & Chu, Y. (2018). The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-018-1330-2>

Rufino, M. S. M. (2007). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *EMBRAPA: Comunicado Técnico*, 1–4.

Ruksiriwanich, W., Khantham, C., Muangsanguan, A., Phimolsiripol, Y., Barba, F. J., Sringarm, K., Rachtanapun, P., Jantanasakulwong, K., Jantrawut, P., Chittasupho, C., Chutoprapat, R., Boonpisuttinant, K., & Sommano, S. R. (2022). Guava (*Psidium guajava* L.) Leaf Extract as Bioactive Substances for Anti-Androgen and Antioxidant Activities. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(24). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11243514>

Sánchez-Martínez, J. D., Valdés, A., Gallego, R., Suárez-Montenegro, Z. J., Alarcón, M., Ibañez, E., Alvarez-Rivera, G., & Cifuentes, A. (2022). Blood–Brain Barrier Permeability Study of Potential Neuroprotective Compounds Recovered From Plants and Agri-Food by-Products. *Frontiers in Nutrition*, 9, 924596. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.924596>

Saroni Arwa, P., Zeraik, M. L., Farias Ximenes, V., da Fonseca, L. M., da Silva Bolzani, V., & Siqueira Silva, D. H. (2015). Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.041>

Shailajan, S., Patil, Y., Joshi, M., Menon, S., & Mhatre, M. (2019). Simultaneous Quantification of Pharmacological Markers Quercetin and Berberine Using High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) from a Polyherbal Formulation Pushyanuga Churna. *Journal of AOAC International*, 102(4), 1003–1013. <https://doi.org/10.5740/JAOACINT.18-0380>

Shalapour, S., & Karin, M. (2015). Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 125, Issue 9, pp. 3347–3355). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI80007>

Shamloo, B., & Usluer, S. (2019). p21 in Cancer Research. *Cancers*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11081178>

Shan, Y., He, X., Song, W., Han, D., Niu, J., & Wang, J. (2015). Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(6), 9114–9120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26309566>

Shi, Y., Norberg, E., & Vakifahmetoglu-Norberg, H. (2020). Mutant p53 as a Regulator and Target of Autophagy. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.607149>

Shukla R, Singh A, Singh KK. Vincristine-based nanoformulations: a preclinical and clinical studies overview. *Drug Deliv Transl Res*. 2024 Jan;14(1):1-16. doi: 10.1007/s13346-023-01389-6. Epub 2023 Aug 8. PMID: 37552393; PMCID: PMC10746576

Singh, N., Baby, D., Rajguru, J., Patil, P., Thakkannavar, S., & Pujari, V. (2019). Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, 18(3), 121–126. https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18

Song, A. J., Ding, K., Alnahhas, I., Laperriere, N. J., Perry, J., Mason, W. P., Winch, C., O'callaghan, C. J., Menten, J. J., Brandes, A. A., Phillips, C., Fay, M. F., Nishikawa, R., Osoba, D., Cairncross, J. G., Roa, W., Wick, W., & Shi, W. (2021). Impact of lymphopenia on survival for elderly patients with glioblastoma: A secondary analysis of the CCTG CE.6 (EORTC 26062-22061, TROG03.01) randomized clinical trial. *Neuro-Oncology Advances*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/NOAJNL/VDAB153>

Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A. A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C. J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., ... Mirimanoff, R. O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)

Tadei, M. B., Mayorquim, M. V., de Souza, C. B., de Souza Costa, S., Possebon, L., Souza, H. R., Iyomasa-Pilon, M. M., Geromel, M. R., & Girol, A. P. (2018). Expression of the Annexin A1 and its correlation with matrix metalloproteinases and the receptor for formylated peptide-2 in diffuse astrocytic tumors. *Annals of Diagnostic Pathology*, 37, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.08.002>

Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 9, pp. 621–632). Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/nrm2952>

Talarico, C., Dattilo, V., Lucia D'Antona, Barone, A., Amodio, N., Belviso, S., Musumeci, F., Abbruzzese, C., Bianco, C., Trapasso, F., Schenone, S., Alcaro, S., Ortuso, F., Florio, T., Paggi, M. G., Perrotti, N., & Amato, R. (2016). SI113, a SGK1 inhibitor, potentiates the effects of radiotherapy, modulates the response to oxidative stress and induces cytotoxic autophagy in human glioblastoma multiforme cells. *Oncotarget*, 7(13), 15868. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.7520>

Tanaka, K., Babic, I., Nathanson, D., Akhavan, D., Guo, D., Gini, B., Dang, J., Zhu, S., Yang, H., de Jesus, J., Amzajerdi, A. N., Zhang, Y., Dibble, C. C., Dan, H., Rinkenbaugh, A., Yong, W. H., Vinters, H. v., Gera, J. F., Cavenee, W. K., ... Mischel, P. S. (2011). Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF-κB pathway that promotes chemotherapy resistance. *Cancer Discovery*, 1(6), 524. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0124>

Tavana, E., Mollazadeh, H., Mohtashami, E., Modaresi, S. M. S., Hosseini, A., Sabri, H., Soltani, A., Javid, H., Afshari, A. R., & Sahebkar, A. (2020). Quercetin: A promising phytochemical for the treatment of glioblastoma multiforme. In *BioFactors* (Vol. 46, Issue 3, pp. 356–366). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/biof.1605>

Tirapelli, D. P. da C., Lustosa, I. L., Menezes, S. B., Franco, I. M., Rodrigues, A. R., Peria, F. M., Marinho, A. M. da N., Serafini, L. N., Carlotti, C. G., & Tirapelli, L. F. (2017). High expression of XIAP and Bcl-2 may inhibit programmed cell death in glioblastomas. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 75(12), 875–880. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20170156>

Tousif, M. I., Nazir, M., Saleem, M., Tauseef, S., Shafiq, N., Hassan, L., Hussian, H., Montesano, D., Naviglio, D., Zengin, G., & Ahmad, I. (2022). Psidium guajava L. An Incalculable but Underexplored Food Crop: Its Phytochemistry, Ethnopharmacology, and Industrial Applications. *Molecules*, 27(20). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27207016>

Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology*, 27, 693–733. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132641>

Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. In *Immunity* (Vol. 50, Issue 6, pp. 1352–1364). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>

Vijayakumar, K., Rengarajan, R. L., Radhakrishnan, R., Mathew, S., Qadri, I., & Vijaya Anand, A. (2019). Psidium guajava Leaf Extracts and Their Quercetin Protect HepG2 Cell Lines Against CCL 4 Induced Cytotoxicity. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 34(3), 324–329. <https://doi.org/10.1007/S12291-018-0752-Z>

Vovk, I., Simonovska, B., & Vuorela, H. (2005). Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. *Journal of Chromatography A*, 1077(2), 188–194. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2005.03.096>

Walsh, K. D., & Kato, T. A. (2023). Alkaline Comet Assay to Detect DNA Damage. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2519, 65–72. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2433-3_7

Wang, W., Yuan, X., Mu, J., Zou, Y., Xu, L., Chen, J., Zhu, X., Li, B., Zeng, Z., Wu, X., Yin, Z., & Wang, Q. (2023). Quercetin induces MGMT+ glioblastoma cells apoptosis via dual inhibition of Wnt3a/β-Catenin and Akt/NF-κB signaling pathways. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 118. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2023.154933>

Wei, L., Zhang, W., Yin, L., Yan, F., Xu, Y., & Chen, F. (2015). Extraction optimization of total triterpenoids from *Jatropha curcas* leaves using response surface methodology and evaluations of their antimicrobial and antioxidant capacities. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(2), 88–95. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2014.12.005>

Wong, S. C., Kamarudin, M. N. A., & Naidu, R. (2021). Anticancer Mechanism of Curcumin on Human Glioblastoma. *Nutrients*, 13(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/NU13030950>

Xu, H., Wu, X., Dou, Y., & Zheng, W. (2022). The prognostic significance of annexin A family in glioblastoma. *Irish Journal of Medical Science*, 191(4). <https://doi.org/10.1007/S11845-021-02737-6>

Yang, M., Lu, Y., Piao, W., & Jin, H. (2022). The Translational Regulation in mTOR Pathway. *Biomolecules*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/BIOM12060802>

Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2004). Flavonoids and the brain: Interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 37, Issue 11, pp. 1683–1693). Free Radic Biol Med. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.002>

Zhang, Q., Jiang, Q., Sa, K., Liang, J., Sun, D., Li, H., & Chen, L. (2023). Research progress of plant-derived natural alkaloids in central nervous system diseases. *Phytotherapy Research : PTR*, 37(11), 4885–4907. <https://doi.org/10.1002/PTR.7955>

Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., & Abounader, R. (2018). The p53 pathway in glioblastoma. In *Cancers* (Vol. 10, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers10090297>

Zhang, Z., Huang, L., Zhao, W., & Rigas, B. (2010). Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF- κ B inhibiting its activation: Anticancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 70(6), 2379. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4204>

Zhenjiang, L., Rao, M., Luo, X., Valentini, D., von Landenberg, A., Meng, Q., Sinclair, G., Hoffmann, N., Karbach, J., Altmannsberger, H. M., Jäger, E., Peredo, I. H., Dodoo, E., & Maeurer, M. (2018). Cytokine Networks and Survivin Peptide-Specific Cellular Immune Responses Predict Improved Survival in Patients With Glioblastoma Multiforme. *EBioMedicine*, 33, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.06.014>

Zhu, X., Ouyang, W., Pan, C., Gao, Z., Han, Y., Song, M., Feng, K., Xiao, H., & Cao, Y. (2019). Identification of a new benzophenone from *Psidium guajava* L. leaves and its antineoplastic effects on human colon cancer cells. *Food & Function*, 10(7), 4189–4198. <https://doi.org/10.1039/C9FO00569B>