



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA RENORBIO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE DERIVADOS DE
GUANILIDRAZONAS EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO GBM02**

Maceió

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA RENORBIO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE DERIVADOS DE
GUANILIDRAZONAS EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO GBM02**

ANDRESSA LETÍCIA LOPES DA SILVA

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Renorbio, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr^o. João Xavier de Araújo Júnior.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre
Moreira

Área de concentração: Biotecnologia em Saúde

Maceió

2022

ANDRESSA LETÍCIA LOPES DA SILVA

Avaliação do efeito citotóxico da série de derivados guanilidrazonas sobre a linhagem de glioblastoma humano (GBM02) in vitro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 22/06/2022.

Documento assinado digitalmente
 JOAO XAVIER DE ARAUJO JUNIOR
Data: 27/06/2022 12:52:45-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Orientador - Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente
 MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA
Data: 23/06/2022 11:08:25-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira
Coorientadora - Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente
 ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ
Data: 24/06/2022 15:36:25-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente
 ELITA SCIO FONTES
Data: 22/06/2022 11:42:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Elita Scio Fontes
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Documento assinado digitalmente
 LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO
Data: 26/06/2022 11:03:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente
 MARIANA DA SILVA SANTOS
Data: 26/06/2022 13:20:53-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Mariana da Silva Santos
Centro Universitário CESMAC

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

S586a Silva, Andressa Letícia Lopes da.
Avaliação da atividade citotóxica de derivados de guanilidrazonas em
linhagem de glioblastoma humano GBM02 / Andressa Letícia Lopes da
Silva. – 2022.
71 f. : il. color.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Coorientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 63-71.

1. Câncer. 2. Gliomas. 3. Cérebro – Tumores. 4. Guanilidrazonas. 5.
Atividade antitumoral. I. Título.

CDU: 54: 616-006.4

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, meu pai, minha mãe e minha irmã por todo o suporte diário e por todo o incentivo nessa longa caminhada que começou na época da graduação. Meus grandes modelos de profissionais e meu orgulho.

Gostaria de agradecer as minhas filhas que sempre presentes, deixaram essa caminhada mais leve, obrigada Nalu e Kali, mamãe ama vocês.

Meu agradecimento as minhas professoras da graduação e mestrado por me incentivarem no caminho da pesquisa básica e me influenciarem a buscar sempre evoluir, Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos e em especial, Prof^a. Dr^a Regina Célia Santos Sales, pois foi graças a ela que eu descobri meu amor pela ciência e que mesmo nas situações mais difíceis, não me deixou desistir.

Meu muito obrigado a Universidade Federal de Alagoas, minha segunda casa por todos esses 14 anos, onde consegui desenvolver minhas atividades e onde eu conheci a importância do ensino público e da pesquisa científica.

Também gostaria de agradecer ao programa Renorbio, por todo aprendizado e conhecimento e por ter me proporcionado fazer o doutorado e elaborar essa pesquisa.

Gostaria de agradecer a minha amiga e comadre Joice Fragoso, pois conseguimos caminhar desde a graduação, sempre juntas e dando suporte uma à outra, fazendo com que o percurso se tornasse menos árduo e mais divertido. Muito obrigada cabeça.

Também gostaria de agradecer a Érica Rodrigues, por estar presente nessa caminhada, por disponibilizar as substâncias estudadas e por todo o apoio e ajuda.

Meu agradecimento também ao Laboratório de Química Medicinal, por toda a ajuda e companheirismo nessa longa caminhada.

Meu profundo agradecimento a toda a equipe do Laboratório de Farmacologia e Imunologia por todo o apoio e suporte em todas as partes do processo dessa tese e pela amizade, em especial ao João Kaycke que junto comigo trabalhou para que os testes fossem possíveis. Também agradeço a Amanda Evellyn, Márcio Thomaz, Shakira, Hilda, Camila, Lilyanne, Éder, Diogo Brandão e Suellen Albuquerque por toda a ajuda e amizade. E ao José Clementino, por toda ajuda. Esse trabalho também é de vocês!

Gostaria de agradecer também ao Julianderson do Laboratório de Biologia Celular e ao Giclênio do Grupo de Acústica Física, pela grande ajuda no teste de migração.

Meu agradecimento imenso vai para a Prf^a. Dr^a. Magna Moreira, que mesmo em meio a adversidades me acolheu como coorientanda e possibilitou o desenvolvimento desse trabalho, e me deu o direcionamento para que ele fosse concluído. Sem ela, esse trabalho não seria possível. Muito obrigada pelo acolhimento, me sinto abençoada por poder ter a orientação e sinto ainda que ganhei uma mãe na pesquisa. Meu mais profundo obrigado.

E por fim, meu agradecimento vai para o meu orientador Prof^o Dr^o. João Xavier, que teve a paciência e a bondade de me orientar desde o mestrado até o doutorado. Que sempre esteve presente quando foi preciso, que me direcionou para o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada professor, o senhor é um dos excelentes exemplos de pesquisador.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

- Marie Curie.

RESUMO

O câncer é considerado um problema de saúde pública, podendo ser associado às quatro principais causas de morte no mundo. Entre os tipos de câncer que são mais agressivos, encontram-se os gliomas. Os gliomas são considerados um dos principais tipos de tumores do sistema nervoso central e possuem elevada heterogeneidade molecular e grande número de mutações genéticas. Dessa forma, o desenvolvimento de protótipos alvo específicos se faz necessário. As guanilidrazonas pertencem à classe das hidrazonas e apresentam diversas atividades já descritas na literatura, como a atividade antitumoral frente à leucemia, melanoma, pulmão, rim e câncer de cólon. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de derivados de guanilidrazonas em células de uma linhagem de glioblastoma humano. O efeito citotóxico das guanilidrazonas frente a monócitos e linfócitos foi avaliado através do ensaio de MTT nas concentrações de 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 μM . Para a avaliação do efeito citotóxico das guanilidrazonas, também foi realizado o ensaio de MTT com células da linhagem GBM02, nas mesmas concentrações, onde o controle positivo foi a Temozolamida (TMZ). O índice de seletividade foi calculado pela fórmula concentração citotóxica em 50% das células mononucleares sanguíneas/concentração citotóxica em 50% das células de GBM02. O ensaio de migração foi realizado através do Scratch, onde se utilizou microfotografias para se obter o percentual de migração. Para o estudo sobre alteração de morfologia, as células de GBM02 foram plaqueadas e aderidas em lamínulas, tendo como controle positivo o TMZ e como controle negativo DMSO 0,2%. Em relação ao ensaio de citotoxicidade frente a monócitos e linfócitos, nenhum dos compostos utilizados no teste apresentaram toxicidade e todos demonstraram ser seletivos para as células de tumorais. Como resultado da atividade citotóxica *in vitro* frente a GBM02, os derivados comparados ao protótipo se apresentaram equipotentes, exceto o LQM 242. Em relação ao efeito inibitório máximo em células de GBM02, os compostos da série apresentaram um efeito citotóxico maior que 70%, exceto o LQM 242 e LQM 244 em 48 horas de tratamento. Já no ensaio de Scratch, pode-se observar que os compostos influenciaram na diminuição da migração do GBM02, destacando-se o LQM 14 que diminuiu em 88,09% a migração e o LQM 240 que diminuiu em 86,54%. Em relação a morfologia, os derivados LQM 14 e LQM 240 afetaram morfologicamente as células de neoplásicas. Diante dos resultados, pode-se observar que essa série de compostos demonstrou capacidade de serem agentes antitumorais, seguindo para a perspectiva de novos estudos, principalmente de mecanismo de ação e *in vivo*, com o objetivo de se tornarem futuras opções terapêuticas no tratamento do glioblastoma, tumor que hoje se encontra sem cura.

Palavras-chave: Glioblastoma multiforme, Guanilidrazonas, Atividade antineoplásica.

ABSTRACT

Cancer is considered a public health problem and can be associated with the four main causes of death in the world. Among the most aggressive types of cancer are gliomas. Gliomas are considered one of the main types of central nervous system tumors and have high molecular heterogeneity and a large number of genetic mutations, so the development of specific target prototypes is necessary. Guanylhydrazones belong to the class of hydrazones and have several activities in the literature, such as antitumor activity against leukemia, melanoma, lung, kidney and colon cancer. The present work aims to evaluate the in vitro antitumor activity of guanylidrazone derivatives in cells of a human glioblastoma lineage. The cytotoxic effect of guanylidrazones against monocytes and lymphocytes was evaluated by the MTT assay at concentrations of 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 μM . To evaluate the antitumor effect of guanylhydrazones, the MTT assay was also performed with cells of the GBM02 lineage, at the same concentrations, where the positive control was Temozolamide (TMZ). The selectivity index was calculated by the formula cytotoxic concentration in 50% of the cells/inhibitory concentration in 50% of the cells. The migration test was performed using Scratch, where microphotographs are used to obtain the migration percentage. For the morphology study, GBM02 cells were plated and adhered to coverslips, with TMZ as a positive control and DMSO 0.2% as a negative control. Regarding the cytotoxicity assay, none of the compounds used in the test showed toxicity against monocytes and lymphocytes and all of them proved to be selective for GBM02 cells. As a result of the in vitro antitumor activity against GBM02, the derivatives compared to the prototype were equipotent, except for LQM 242. Regarding the inhibitory effect, the compounds of the series showed a cytotoxic effect greater than 70%, except for LQM 242 and LQM 244 in 48 hours of treatment. In the Scratch test, it can be seen that the compounds influenced the decrease in GBM02 migration, especially LQM 14, which decreased migration by 88,09% and LQM 240, which decreased by 86,54%. Regarding morphology, the derivatives LQM 14 and LQM 240 morphologically affected the neoplastic cells. In view of the results, it can be observed that this series of compounds demonstrated the ability to be antitumor agents, moving towards the perspective of new studies, mainly of mechanism of action and in vivo, with the objective of becoming future therapeutic options in the treatment of glioblastoma, a tumor that currently has no cure.

Keywords: Glioblastoma multiforme, Guanylhydrazones, Antineoplastic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de como ocorre o surgimento o câncer.	17
Figura 2: Incidência entre Homens e Mulheres dos Tumores do Sistema Nervoso Central no Brasil em 2020.	19
Figura 3: Classificação dos gliomas difusos baseado na histologia e nas suas características genéticas.	21
Figura 4: Características comuns e marcadores diagnósticos de glioma grau IV.	23
Figura 5: Cortes histológicos de tecido cerebral normal e GBM em aumento de 400x.	24
Figura 6: Microambiente do glioblastoma.	25
Figura 7: Imagens ponderadas em T1 por Ressonância Magnética.	27
Figura 8: Sítio de ação e alvos da temozolomida.	31
Figura 9: Vias metabólicas e de degradação da temozolomida.	32
Figura 10: Mecanismo de ação da temozolomida.	32
Figura 11: Modificações estruturais propostas e desenvolvidas.	36
Figura 12: Micrografias representativas sobre o efeito do DMSO 0,2% na migração de GBM02.	46
Figura 13: Micrografias representativas sobre o efeito do TMZ (100 μ M) na migração de GBM02.	46
Figura 14: Micrografias representativas sobre o efeito do LQM 14 (1 μ M) na migração de GBM02.	46
Figura 15: Micrografias representativas sobre o efeito do LQM 240 (1 μ M) na migração de GBM02.	47
Figura 16: Micrografias representativas sobre o efeito do LQM 241 (1 μ M) na migração de GBM02.	47
Figura 17: Micrografias representativas sobre o efeito do LQM 243 (1 μ M) na migração de GBM02.	47
Figura 18: Aspecto morfológico do DMSO 0,2% e TMZ (100 μ M) em células de GBM02.	49
Figura 19: Aspecto morfológico da GBM02 frente ao derivado LQM 14.	50
Figura 20: Aspecto morfológico da GBM02 frente ao derivado LQM 240.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos tipos de Tumores do Sistema Nervoso Central de acordo com a classificação da OMS em 2016.	20
Tabela 2: Tipos de gliomas difusos e seus graus de classificação.	22
Tabela 3: Efeito dos derivados sobre a viabilidade celular em monócitos e linfócitos.....	44
Tabela 4: Efeito dos derivados guanilidrazônicos e da TMZ sobre a viabilidade de GBM02 e índice de seletividade.....	44

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1: Efeito dos derivados de guanilidrazonas LQM 14, LQM 240, LQM 241 e LQM 243 sobre a migração de GBM02.....	48
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C	Graus Celsius
AIC	4-amino-5-imidazol-carboxamida
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
ATRX	ATP dependente de helicase
BER	Reparo por excisão de bases
Ca ²⁺	Cálcio
CC ₅₀	Concentração Citotóxica 50%
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> (Meio <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco's</i>)
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i> (Meio <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco's/F12</i>)
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Quebra da fita dupla
EGF	Fator de crescimento epidérmico
GBM	Glioblastoma Multiforme
GBM02	Linhagem de Glioblastoma Humano utilizada no estudo
Gy	<i>Gray</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IDH	Isocitrato-Desidrogenase
IS	Índice de Seletividade
L-Glu	L-Glutamina
MTT	Metil-Tiazolil-Tetrazólio
MTIC	5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida
MGMT	O ⁶ -metilguanina metil transferase
MNR	Reparo de DNA Mismatch
N ³ -meA	N-metiladenina
N ⁷ -meG	N ⁷ -metilguanina
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotído fosfato

O ⁶ -BG	O ⁶ -benzilguanina
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Proteína de reparo do ácido desoxirribonucleico
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salina)
PCP	<i>Pneumocystis jiroveci</i> (carinii) pneumonia
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Radioterapia
SDF-1	Fator derivado do estroma da medula óssea (também conhecido como CXCL12)
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TGFβ	Fator de crescimento transformante-β
TMZ	Temozolamida
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TP53	Gene supressor de tumor (<i>Tumour protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)</i>)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (fator de crescimento do endotélio vascular)
v/v	Volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

\pm SEM	Erro padrão da média
Emáx	Efeito máximo
Kg	Quilogramas
M	Molar
M	Metros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
m ²	Metro quadrado
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
μ M	Micromolar
nm	Nanômetro
P < 0,01	Probabilidade de erro menor do que 5%

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Câncer	17
2.2 Tumores do Sistema Nervoso Central	19
2.3 Glioblastoma Humano	22
2.4 Tratamento	28
2.5 Guanilidrazonas	34
2.6 Síntese dos derivados guanilidrazônicos	35
3. OBJETIVOS	37
4. METODOLOGIA	39
4.1 Síntese dos derivados sintéticos	39
4.2 Preparação da série de derivados sintéticos	39
4.3 Obtenção da linhagem de glioblastoma humano GBM02	39
4.4 Preparação da linhagem de glioblastoma humano	39
4.5 Isolamento e cultivo de células mononucleares sanguíneas	39
4.6 Avaliação do efeito citotóxico das guanilidrazonas em monócitos e linfócitos	40
4.7 Avaliação do efeito citotóxico das guanilidrazonas sobre GBM02	40
4.8 Avaliação da seletividade das guanilidrazonas	41
4.9 Avaliação do efeito antimigratório das guanilidrazonas sobre GBM02	41
4.10 Avaliação do efeito das guanilidrazonas sobre a morfologia de GBM02	42
4.11 Análise estatística	42
5. RESULTADOS	44
5.1 Avaliação do efeito citotóxico das guanilidrazonas em monócitos e linfócitos	44
5.2 Efeito citotóxico das guanilidrazonas sobre GBM02 e Índice de Seletividade (IS)	44
5.3 Avaliação do efeito antimigratório das guanilidrazonas sobre GBM02	45
5.4 Avaliação do efeito das guanilidrazonas sobre a morfologia de GBM02	48
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um problema de saúde pública, sobretudo os tumores do Sistema Nervoso Central (TSNC), que mesmo com uma baixa incidência, apresentam uma elevada letalidade (BRASIL, 2019).

As estimativas desse tipo de tumor giram em torno de 1,4 a 1,8%, de casos no mundo. No Brasil, esse número é ainda maior, estimam-se 5.870 casos novos de câncer do sistema nervoso central em homens e 5.230 em mulheres, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 5,61 casos novos a cada 100 mil homens e de 4,87 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).

O cérebro, entre os outros órgãos, como a medula, é o mais relacionado a esses tipos de tumores, sendo o mais comum, os gliomas. Eles são originados das células da glia, que conferem sustentação aos neurônios. Os mais prevalentes são os gliomas difusos e podem ser classificados de acordo com o seu grau, sendo o de grau II aqueles apresentam uma característica menos maligna; os de grau III apresentam uma atividade mitótica aumentada e os de grau IV são os mais malignos, pois apresentam uma elevada angiogênese e necrose (LOUIS et al., 2016).

O Glioblastoma Humano (GBM) é classificado como glioma difuso de grau IV, sendo considerado muito severo devido a sua neoangiogênese, heterogeneidade intratumoral, proliferação, migração e invasão. Ele é o tipo mais frequente dos tumores primários do SNC em adultos e possui um prognóstico ruim, não existindo nenhuma terapia curativa. Os diagnósticos complexos e pouco reproduzíveis e a incapacidade de prever com precisão a sensibilidade ou resistência aos regimes de quimioterapia, bem como a biodisponibilidade para o SNC abaixo do ideal, contribuem para a taxa de mortalidade (LOMBARDI; ASSEM, 2017).

Hoje, mesmo com uma gama de quimioterápicos no mercado, não existe tratamento curativo para esse tipo de tumor, sendo a terapia padrão utilizada, a remoção cirúrgica, além da radioterapia em concomitância a quimioterapia. No mercado, o quimioterápico padrão utilizado é a temozolomida (TMZ) (TOMAR et al., 2021).

A TMZ atua como agente de segunda geração alquilante do ácido desoxirribonucleico (DNA), interrompendo o crescimento maligno e o reparo do ciclo celular (NAGASAWA, et al., 2012). Mesmo sendo o padrão terapêutico, ele assim como muitos quimioterápicos, possui efeitos colaterais que dificultam o tratamento, como fadiga, supressão da medula óssea, leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, entre outros (YAO et al., 2013).

Além dos efeitos colaterais, é possível observar resistência ao tratamento com TMZ, principalmente devido às características dos glioblastomas, como a heterogeneidade molecular e o grande número de mutações genéticas, tornando assim o desenvolvimento de fármacos que sejam alvo específico, mais difícil. Por isso, pesquisas que busquem derivados bioativos eficientes, com baixo custo, com poucos efeitos colaterais e com seletividade para células neoplásicas, se fazem necessárias (SINGH et al. 2021).

As guanilidrazonas são hidrazonas com diversas atividades comprovadas na literatura, entre elas a anti-inflamatória (HEIMFARTH et al., 2020; HAN et al., 2021), antimicrobiana (KIM et al., 2021), antifúngica (SANTANA et al., 2019), entre outras. Diversos estudos comprovam também a atividade citotóxica dessa classe frente a diferentes linhagens de células tumorais como leucemias, melanoma, câncer de pulmão, rim e cólon (FRANÇA et al., 2016; SILVA et al., 2016; AL-JANABI et al., 2022).

Estudos compreendem a atividade dessa classe voltada a atividade citotóxica sobre o glioblastoma humano (FRANÇA et al. 2016). As pesquisas com as guanilidrazonas são importantes, visto seu potencial já conhecido na literatura, além de sua facilidade e baixo custo de síntese.

Com isso, novos estudos que visem o tratamento desse tipo de tumor, se fazem necessários, pois as terapias atuais não apresentam cura total da doença e nem um aumento expressivo na sobrevida do paciente, objetivando-se assim a busca por fármacos que preencham essas lacunas e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

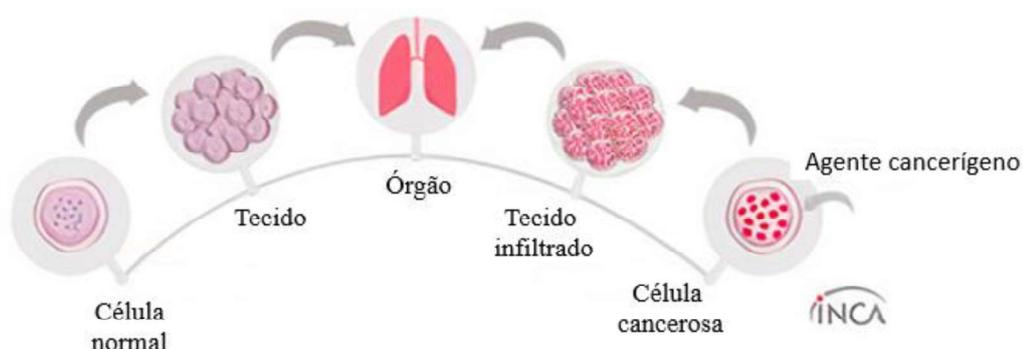
Sendo considerado um problema de saúde pública, o câncer está entre as 4 causas principais de morte prematura no mundo. Estima-se que no mundo, só no ano de 2018 cerca de 18 milhões de novos casos surgiram e 9,6 milhões de pessoas vieram a óbito, sendo estimado que esse número aumente para 13,1 milhões de óbitos até 2030 (INCA, 2020).

O número de novos casos de câncer vem aumentando em progressão, evidenciando a necessidade da estruturação dos sistemas de saúde pelo mundo, visto que o tratamento demanda altos custos com os procedimentos e agentes terapêuticos. Esse número é preocupante em países em desenvolvimento, como o Brasil, principalmente em relação a mortalidade que pode ser justificada pela disparidade no acesso ao diagnóstico e ao tratamento. Estima-se que no futuro, no mundo esse número de casos de neoplasias ultrapasse o de doenças cardiovasculares, que hoje representam a maior causa de morbimortalidade (GUERRA et al., 2018).

No Brasil, a estimativa aponta que entre 2020 e 2022 ocorrerão 685 mil novos casos de câncer. Entre os principais estão o câncer de pele, de mama, de próstata, de pulmão, de estômago e em menor número os tumores do sistema nervoso central (INCA, 2020).

O câncer hoje é considerado uma das doenças que mais acomete a população mundial. Esse termo é referenciado para mais de 100 tipos diferentes de doenças malignas. Essas doenças possuem alguns aspectos em comum, entre eles, o crescimento rápido e desordenado de células que tendem a ser agressivas e que podem ou não invadir tecidos e órgãos adjacentes ou a distância (Figura 1) (INCA, 2020).

Figura 1: Esquema de como ocorre o surgimento o câncer.



Fonte: INCA, 2020a.

Doenças genéticas e fatores ambientais e comportamentais também são associados a possíveis mutações genéticas que podem levar ao câncer, como o tabaco, alimentação não saudável, a exposição a agentes químicos, biológicos e físicos que sejam carcinogênicos. Essas mutações podem acontecer pelo efeito dos carcinógenos ambientais, mas para que ocorram é necessário que se rompam barreiras fisiológicas, sendo a primeira dessas, os pontos de controle do próprio ciclo celular (CARMINATE et al., 2021).

O câncer decorre da alteração do DNA celular, sendo associado a anomalias na regulação do ciclo e a perda de controle da mitose. Essas alterações geralmente ocorrem em genes chamados proto-oncogenes e genes supressores de tumor (INCA, 2020).

Os proto-oncogenes são responsáveis por codificarem proteínas que vão regular a diferenciação e o crescimento celular em humanos. Os produtos proteômicos são proteínas que se ligam ao DNA, proteínas quinases, que estão envolvidas na transdução do sinal, fatores de crescimento e seus receptores, e reguladores do ciclo celular. Uma mutação em uma sequência genômica, por exemplo, pode desencadear uma super expressão de proto-oncogenes, isso faz com que ocorra proliferação e torna a célula não responsiva a sinais regulatórios e inibidores do crescimento celular, causando a formação do tumor. Esses genes podem ser ativados por células transformadas por amplificação ou por mutações (MALEBARY et al., 2021).

Os proto-oncogenes, quando sofrem mutações se transformam em oncogenes. As proteínas que atuam no controle negativo são codificadas pelos genes supressores de tumor e suas mutações são manifestadas pela falta de ação no efeito final do ciclo, resultando na perda dos mecanismos controladores do ciclo celular (COSTA et al., 2021).

As células neoplásicas possuem diversas características que facilitam a sua rápida multiplicação e propagação como sua capacidade ilimitada de proliferação, a perda da resposta a fatores de inibição de crescimento, evasão da apoptose, capacidade de invadir tecidos e a angiogênese, sendo que esses fatores podem contribuir para o seu desenvolvimento e para a resistência de terapias antitumorais. (MENEZES et al., 2021).

Em relação as alterações epigenéticas, elas não produzem dano direto no DNA, mas participam da modulação da expressão gênica pelas modificações pós-traducionais, como a metilação do DNA e a modificação de histonas. Isso faz com que ocorra uma diferença na organização da cromatina e na inibição da expressão de alguns genes, que

encontram um ambiente favorável para sua proliferação e reorganização tecidual, surgindo assim, o tecido neoplásico (FREITAS, 2017).

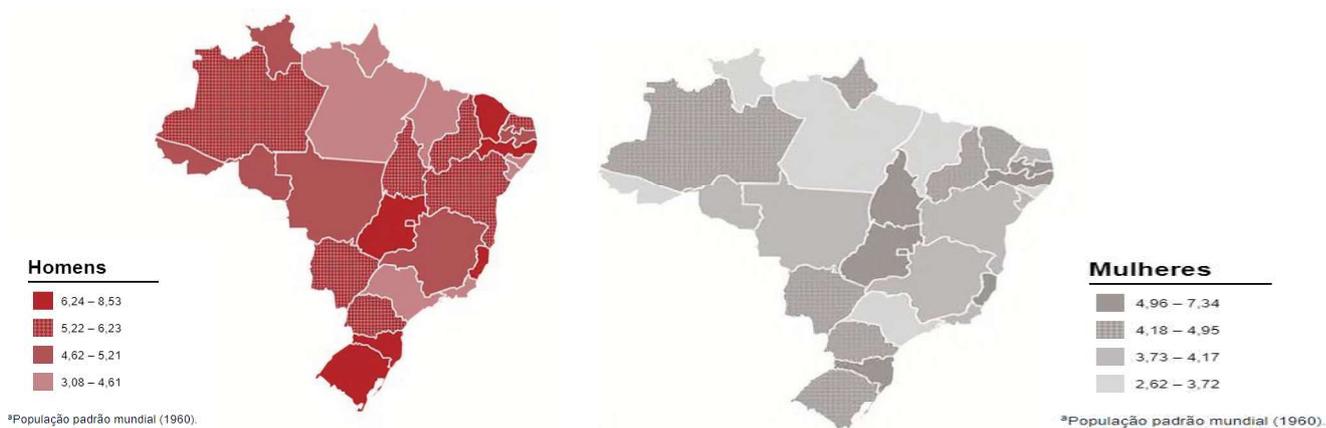
Sendo uma doença heterogênea, a instabilidade genética é classificada como um processo contínuo onde as vias de reparo do DNA e os pontos de checagem são alterados, fazendo com que se tenha uma desestabilização do genoma e acelerando a evolução do câncer através da sua proliferação e evasão das defesas do organismo (COLOTTA et al., 2009).

2.2 Tumores do Sistema Nervoso Central

Existem diversos tipos de câncer, os quais são relacionados aos tecidos e órgão acometidos, entre eles, existem os Tumores do Sistema Nervoso Central (TSNC). Esses tumores são caracterizados por serem anatomicamente parecidos, mas em termos de morfologia, local, biologia molecular, comportamento clínico e etiologia são diferentes (CROCETTI et al., 2012). Esses tipos de tumores apresentam elevado poder de letalidade, os quais podem se originar no cérebro, nervos cranianos e meninges, afetando as células cerebrais e a medula espinhal, comprometendo o equilíbrio neurológico do paciente (SANTOS, 2021).

Os TSNC, possuem uma incidência menor quando comparados aos outros tipos de câncer, porém possuem uma alta taxa de mortalidade. No mundo eles possuem uma incidência entre 1,4 e 1,8%, onde cerca de 88% desses tumores são no cérebro. No ano de 2020 no Brasil, a estimativa de TSNC foi de 2,6% para homens e 2,3% para mulheres, onde o índice de mortalidade para homens foi de 4,1% e para mulheres de 4,2% (Figura 2) (INCA, 2021).

Figura 2: Incidência entre Homens e Mulheres dos Tumores do Sistema Nervoso Central no Brasil em 2020.



Fonte: INCA, 2020.

Os TSNC foram divididos pela classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2016, baseando-se em suas características histológicas e em conjunto com parâmetros moleculares, fenotípicos e genotípicos integrados possibilitando uma maior precisão diagnóstica, além de um melhor manejo do paciente e uma melhor resposta ao tratamento (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação dos tipos de Tumores do Sistema Nervoso Central de acordo com a classificação da OMS em 2016.

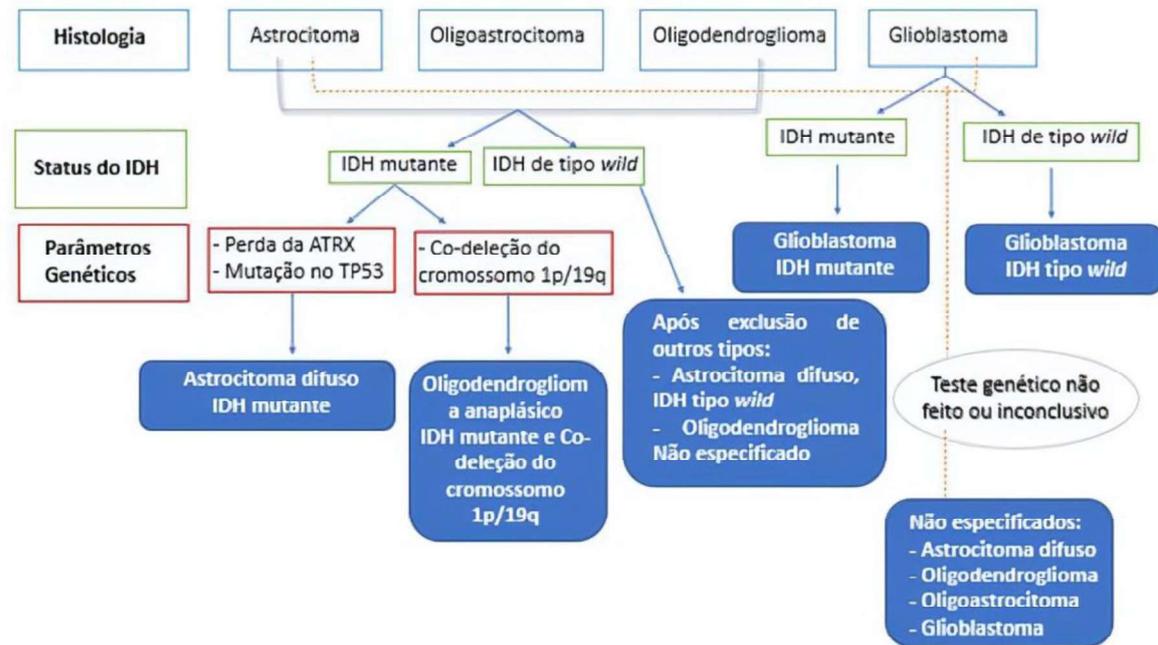
Tipos de Tumores do Sistema Nervoso Central
Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
Outros tumores astrocíticos
Tumores ependimários
Outros gliomas
Tumores do plexo coroide
Tumores neuronais e neuronal-gliais mistos
Tumores da região pineal
Tumores embrionários
Tumores dos nervos cranianos e paraespinhais
Meningiomas
Tumores mesenquimais, não meningoteliais
Tumores melanocíticos
Linfomas
Tumores histiocíticos
Tumores de células germinativas
Tumores da região selar
Tumores metastáticos

Fonte: Adaptado de Louis et al. (2016).

Entre os tipos de tumores do SNC, encontram-se os gliomas, que são os tumores primários mais prevalentes no cérebro e na medula espinhal. Eles compartilham histologicamente, características das células gliais e são nomeados devido a essas semelhanças. São originários de células da glia normais, de precursores gliais ou neurais e de células-tronco (LUCINO et al., 2021).

Os mais prevalentes são os gliomas difusos, que foram reclassificados mais recentemente devido ao descobrimento de marcadores moleculares presentes nesses tumores, principalmente com a identificação da perda do cromossomo 1p/19q e com a identificação mais recente da mutação na enzima isocitrato desidrogenase (IDH), mutação no gene adenosina trifosfato dependente de helicase (*ATRX*), entre outras alterações (Figura 3) (YAN et al., 2009).

Figura 3: Classificação dos gliomas difusos baseado na histologia e nas suas características genéticas.



Fonte: Adaptado de Chen et al. (2017).

A enzima IDH catalisa a conversão de isocitrato em α -cetoglutarato enquanto convertem a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), ambos como parte do Ciclo de Krebs. Mutações somáticas em genes que codificam 2 das isoformas de IDH (1 e 2) estão presentes em diversos cânceres, incluindo os gliomas, nos quais essas mutações são observadas como um dos primeiros eventos da sua formação (YANG et al., 2012).

A co-deleção do cromossomo 1p/19q tem sido conhecida como um marcador diagnóstico e prognóstico de oligodendrogliomas. A co-deleção desses 2 braços cromossômicos é um forte marcador prognóstico e preditivo em gliomas de grau II e III (CHEN et al., 2017).

A mutação do promotor da transcriptase reversa da telomerase (TERT) é um indicador de que o comportamento clínico de um tumor pode ser mais semelhante a um tumor de grau IV. As células cancerígenas usam telômeros para evitar senescência e para manter um elevado potencial proliferativo; para realizar a manutenção deles, elas aumentam a expressão da TERT. Mutações na sua região promotora, aumentam a expressão e servem como um importante biomarcador de subtipos de glioma (CHEN et al., 2017).

Na síndrome de alfa talassemia ligada ao cromossomo X, o gene *ATRX* codifica uma proteína de remodelação da cromatina, a qual ajuda a manter a estabilidade

genômica. Quando ocorre a perda do *ATRX*, ocorre também danos na replicação do DNA e mutações relacionadas a IDH. Ela é utilizada como marcador de tumores IDH mutantes não oligodendrogliais (astrocíticos) (HAASE et al., 2018).

Outro marcador importante é o gene *TP53*, que é classificado como um gene supressor de tumor, que faz a codificação da proteína p53 que atua como um regulador da transcrição, além de integrar sinais de estresse relacionados ao dano no DNA, promovendo a parada do ciclo celular e a apoptose, impedindo a propagação de células danificadas. A mutação nesse gene está relacionada a um mau prognóstico em pacientes com gliomas, em especial com glioblastoma e está associada a diminuição do efeito do tratamento com o fármaco padrão para esse tipo de tumor, que é a temozolomida (WANG et al., 2014).

A classificação dos gliomas difusos é estabelecida de acordo com a OMS a partir de três tipos de graus, sendo os de grau II, aqueles que apresentam baixa atividade mitótica, ausência de necrose e baixa angiogênese; grau III, os que apresentam anaplasia e atividade mitótica aumentada e os de grau IV, que são os que apresentam alta atividade mitótica, elevada angiogênese e necrose, sendo estes mais severos (Tabela 2) (LOUIS et al., 2016).

Tabela 2: Tipos de gliomas difusos e seus graus de classificação.

Tipos de Gliomas Difusos	Grau de Classificação
Astrocitoma difuso, IDH mutante	Grau II
Oligodendroglioma, IDH mutante e 1p/19q co-deleção	Grau II
Astrocitoma anaplásico, IDH mutante	Grau III
Oligodendroglioma anaplásico IDH mutante e 1p/19q co-deleção	Grau III
Gliomas difusos na linha média	Grau IV
Glioblastoma, IDH mutante	Grau IV
Glioblastoma, IDH do tipo wild	Grau IV

Fonte: Adaptada de Louis et al. (2016).

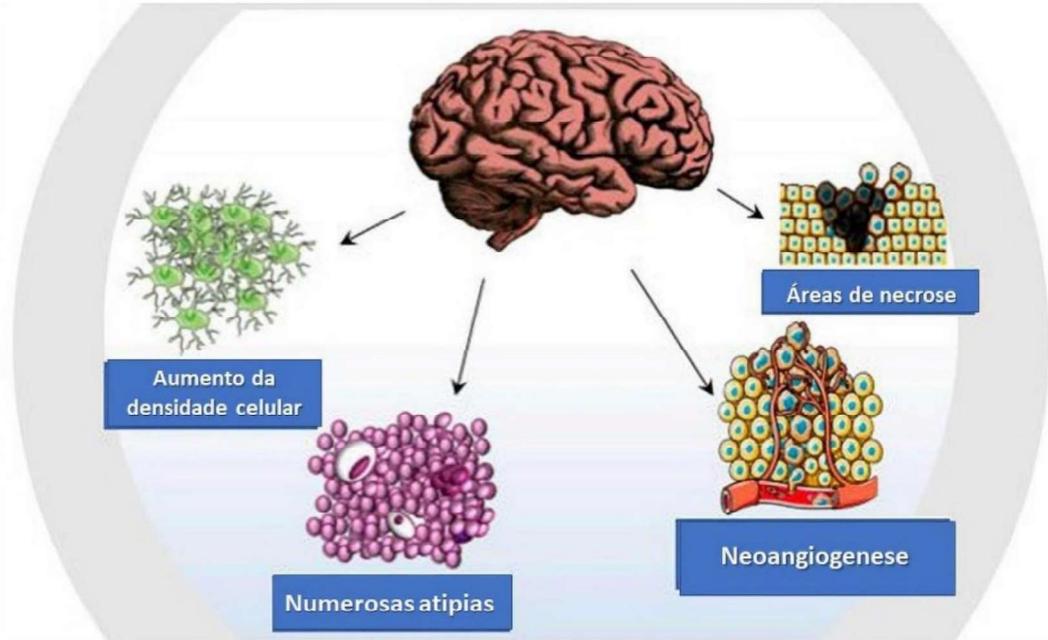
2.3 Glioblastoma Humano

Os gliomas podem incluir astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastocitomas e ependimomas. Eles fazem parte dos tumores neuroepiteliais, os quais são 80% derivados de tumores malignos no SNC (CBTRUS, 2012).

O glioblastoma multiforme (GBM), é um tipo de astrocitoma primário que pode ser caracterizado como o mais maligno, agressivo, invasivo, indiferenciado e o mais frequente deles, sendo classificado como grau IV (Figura 4). Em relação a tumores cerebrais, ele é responsável por cerca de 60% dos casos e, mesmo havendo um

tratamento padrão, esse não apresenta efeitos curativos, aumentando a sobrevida do paciente entre 14 e 15 meses, onde apenas 5,5% desses casos sobrevivem o tempo máximo (OSTROM et al., 2017; HANIF et al., 2017).

Figura 4: Características comuns e marcadores diagnósticos de glioma grau IV.



Fonte: Shergalis et al. (2018).

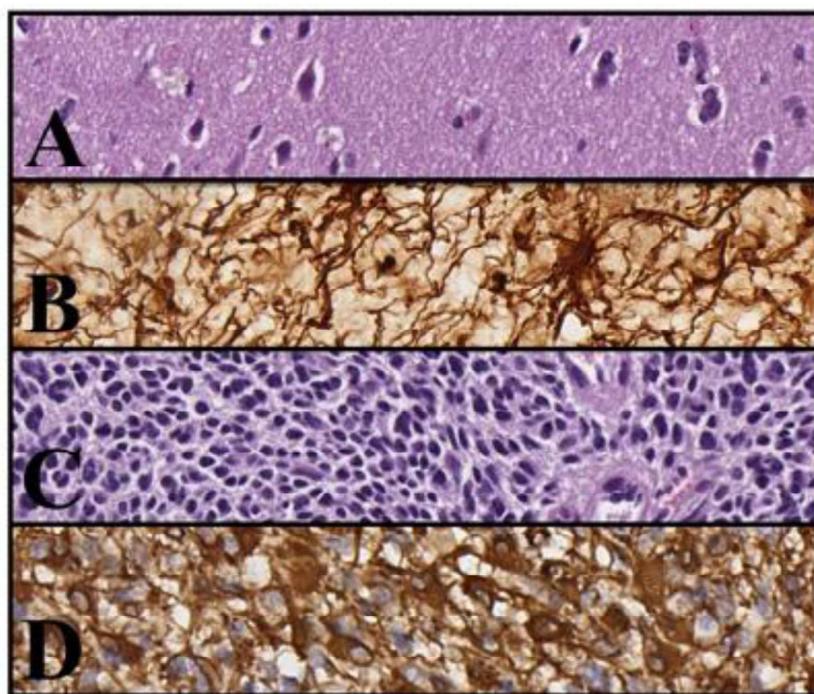
A localização mais frequente para o GBM são os hemisférios cerebrais e 95% desses tumores surgem na região supratentorial, enquanto apenas uma pequena porcentagem dos tumores ocorre no cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal (NAKADA et al., 2011).

A classificação mais recente dos glioblastomas é da OMS de 2016, a qual os classificam de acordo com a enzima IDH, sendo a de tipo *wild* constituinte de 90% dos casos e as mutantes do tipo 1 e 2, 10% dos casos (BATASH et al., 2017). Apesar dessa classificação, a maioria dos pacientes com GBM recebe tratamentos idênticos e existem atualmente poucas terapias direcionadas, contribuindo para os resultados ruins normalmente experimentados pelos pacientes (TAYLOR et al., 2019).

Em relação as características do GBM, macroscopicamente, ele se apresenta heterogêneo, com hemorragia multifocal, necrose e áreas císticas gelatinosas. Pode-se perceber uma variação entre as regiões acometidas por esse tumor. Ele geralmente surge de uma lesão única, grande, de formato irregular e presente na substância branca. Com relação as suas características histológicas (Figura 5), ele se assemelha a um astrocitoma anaplásico, apresentando uma população de células pleomórficas que varia de pequenas

células tumorais mal diferenciadas, a grandes células multinucleadas, com necrose multifocal e com núcleos pseudopalisantes e atividade mitótica prevalente. Outra característica importante é a proliferação de células endoteliais vasculares, frequentemente com uma estrutura glomeruloide (HANIF et al., 2017).

Figura 5: Cortes histológicos de tecido cerebral normal e GBM em aumento de 400x.



Fonte: Stoyanov et al. (2018).

Nota: A: Tecido cerebral saudável. B: Astrócitos saudáveis. C: Hiper celularidade e atipismo celular de GBM. D: Astrócitos neoplásicos de GBM. Coloração por Imuno-histoquímica (IHC).

A patogênese do GBM começa quando o tumor recruta células normais ao seu redor para que sejam promovidos o crescimento, a sustentação e a invasão das células neoplásicas no cérebro. Esse tumor denominado como controle, começa a estabelecer a comunicação entre as células tumorais e as vizinhas (DIAS, 2021).

Existem fatores que podem ser utilizados como moléculas de sinalização as quais se ligam aos receptores das células alvo, como fator de crescimento transformante- β (TGF β), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator derivado do estroma da medula óssea (SDF-1), também conhecido como CXCL12 (BROEKMAN et al., 2018).

Além disso, o GBM forma um núcleo virtual e um citoplasma contínuo com as células vizinhas, onde ele introduz elementos inorgânicos, genéticos e proteínas nas

células normais, alterando assim, seu fenótipo e essas células acabam auxiliando as células neoplásicas que apresentarem problema, como por exemplo, por causa da radioterapia e quimioterapia. Essas rotas podem transmitir moléculas não secretáveis, incluindo fatores de transcrição, ácidos ribonucleicos (RNA) e DNA diretivos e até mesmo mitocôndrias e núcleos (THURINGER et al., 2016).

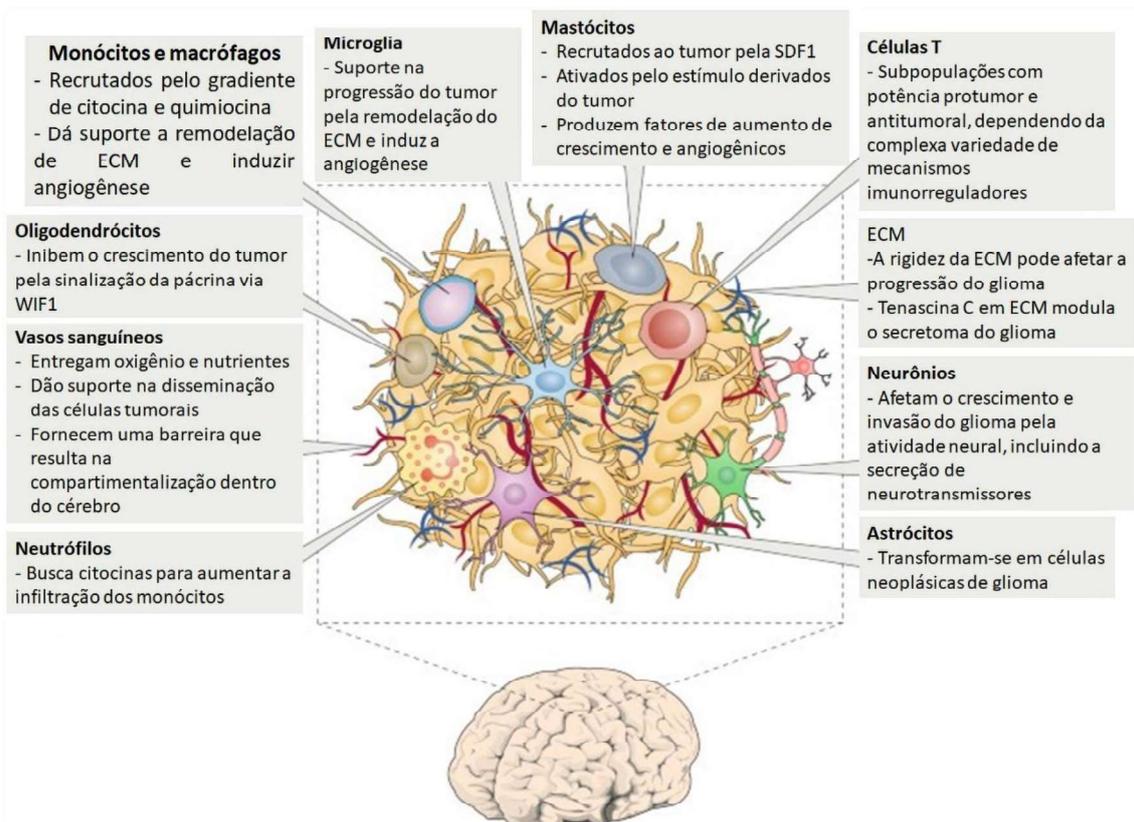
Moléculas pequenas como Ca^{2+} (cálcio), ATP, metabólitos e microRNAs (miRNAs) podem ser transferidas entre células adjacentes por meio de junções comunicantes. As conexinas, que formam um componente estrutural dessas junções, são reguladas positivamente nas células que iniciam o tumor e estão associadas ao aumento da capacidade de invasão dos gliomas (BALÇA-SILVA et al., 2017).

Proteínas não secretáveis (incluindo fatores de transcrição), RNA, DNA, lipídios e metabólitos podem ser transferidos por meio de vesículas extracelulares liberadas das células por meio da fusão de corpos multivesiculares com a membrana celular, que produz exossomos, brotando da membrana plasmática (dando origem a microvesículas e oncosomos grandes) (MAAS et al., 2017) ou brotando das pontas dos nanotubos que se estendem para fora das células (LAI et al., 2014).

Essas vesículas extracelulares que são derivadas do tumor, podem alterar o fenótipo das células normais a seu favor, a fim de promover a angiogênese, imunossupressão, invasão de células tumorais e a regulação metabólica. As células tumorais também podem ser ligadas por "tunelamento" de nanotubos e microtubos que formam junções comunicantes ou um citoplasma contínuo entre as células, para permitir o transporte de moléculas e organelas. Esse envolvimento de microtubos está relacionado ao recrescimento de tumores após a cirurgia, conferindo assim, resistência à quimioterapia (FONSECA et al., 2016; WEIL et al., 2017).

O tumor consegue criar um ambiente pluripotente que pode se adaptar às mudanças e, assim, ter muitas opções para sobreviver ao ataque terapêutico, graças aos diferentes modos de suporte físico entre as células tumorais e o *crosstalk* bidirecional entre as células tumorais e as células normais em sua vizinhança, juntamente com a flexibilidade epigenética (Figura 6) (BROEKMAN et al., 2018).

Figura 6: Microambiente do glioblastoma.



Fonte: Adaptado de Broekman et al. (2018).

Nota: O microambiente do glioblastoma consiste em células tumorais, matriz extracelular (ECM), vasos sanguíneos, células imunes inatas (monócitos, macrófagos, mastócitos, microglia e neutrófilos), células T e neurônios não tumorais, astrócitos e oligodendrócitos. SDF1: fator 1 derivado de células do estroma; WIF1, fator inibitório de WNT.

Os principais fatores de risco do glioblastoma são exposição prévia a radiação, fatores imunes e genéticos; perda da sensibilidade a alergias e choques mecânicos na cabeça (ZHEN et al., 2010). Além disso, fatores como consumo alimentar de derivados nitrosos, tabagismo, uso de bebidas alcoólicas e uso de drogas, também podem influenciar no aparecimento dos tumores (JIGSHA, 2014).

Mais da metade dos pacientes com GBM apresentam uma história clínica curta, que varia entre 3-6 meses, porém como esse tumor começa a se desenvolver de um astrocitoma de classificação mais baixa, a história clínica pode se estender por anos. Os sintomas podem se desenvolver rapidamente, sendo muitas vezes confundido com acidente vascular cerebral (MCKINNON et al., 2021).

Os sinais e sintomas são produzidos por 3 mecanismos segundo Hanif et al. (2017), sendo por efeito direto, onde o tecido cerebral destruído ocasiona a necrose e origina sintomas como o déficit neural focal e deficiências cognitivas. Eles terão malignidade de acordo com as regiões do cérebro que forem acometidas. Já relacionados aos efeitos secundários, se tem o aumento da pressão intracraniana, sendo

consequência direta do aumento gradual no tamanho do tumor e aumento do edema ao redor, o que leva a uma mudança no conteúdo intracraniano, resultando em dores de cabeça que são uma característica marcante em cerca de 30-50% dos pacientes com GBM (UDDIN et al., 2020).

Relacionado a posição do tumor, cerca de 20 a 40% dos pacientes podem apresentar convulsões, geralmente com início focal, que podem ser parciais simples, convulsões parciais complexas ou generalizadas (HANIF et al., 2017).

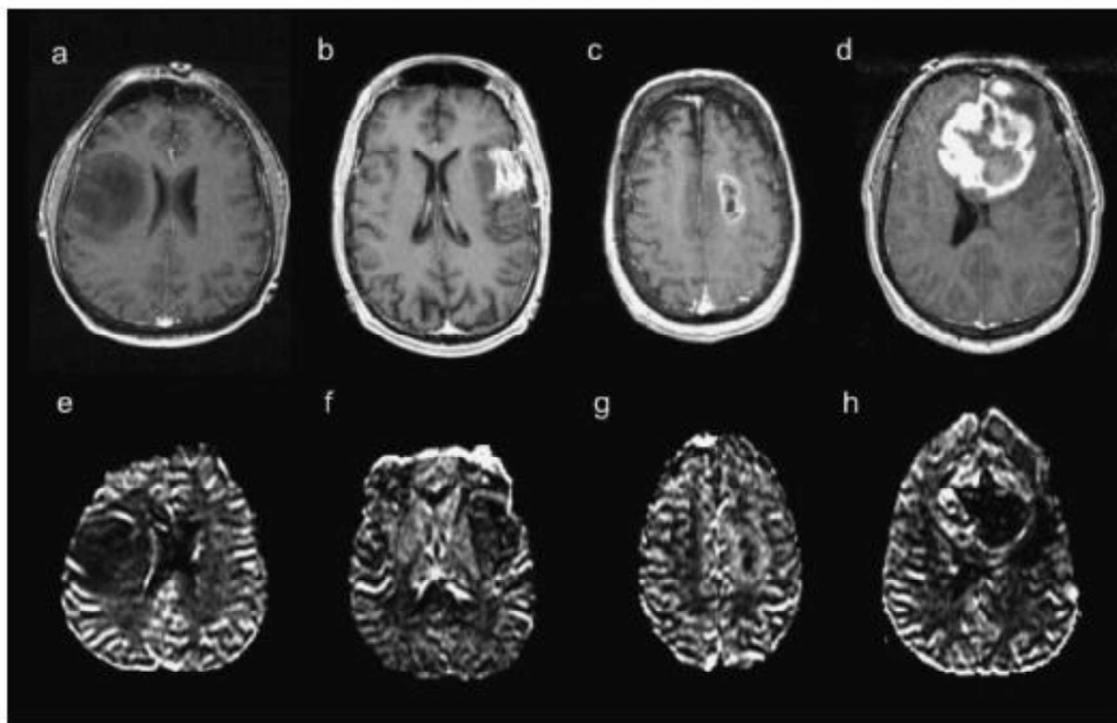
O diagnóstico do glioblastoma é feito através da tomografia computadorizada e ressonância magnética, além da angiografia por cateter. Já o subtipo é determinado pela análise do perfil genético e histológico do tecido tumoral obtido por meio de biópsia (FAKHOURY et al., 2019).

Na tomografia, geralmente pode-se ver as lesões como áreas hipointensas quando comparadas aos tecidos adjacentes, demonstrando desvio da linha média como resultado do edema (HANIF et al., 2017).

A ressonância magnética é considerada o padrão ouro para o diagnóstico desse tipo de tumor, visto que o contraste superior dos tecidos moles, permite que a complexidade e a heterogeneidade da lesão tumoral sejam melhores visualizadas. Os achados usuais em uma ressonância magnética, realçada com gadolínio, de pacientes com gliomas malignos mostram uma área central de necrose, circundada por edema na substância branca. Os tumores são geralmente unifocais, mas também podem ser multifocais (OMURO; DEANGELIS, 2013).

Com os avanços na área de técnicas por imagem, houve uma melhora na avaliação das mudanças na hemodinâmica, arquitetura do tecido e metabolismo celular dos gliomas (Figura 7). A tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) e a tomografia por emissão de pósitrons (PET), que são técnicas de medicina nuclear, também estão sendo empregadas como ferramentas de resolução de problemas para diferenciar entre o tumor ativo e alterações tumorais relacionadas à terapia (DA SILVA, 2021).

Figura 7: Imagens ponderadas em T1 por Ressonância Magnética.



Fonte: Nelson e Cha (2003).

Nota: a: Paciente com glioma grau II; b: Paciente com glioma grau III; c e d: Paciente com GBM; E-H: Imagens de volume de sangue cerebral correspondente as localizações anatômicas semelhantes, sendo seu aumento relacionado ao grau do tumor.

Através do diagnóstico realizado, é que se dará prosseguimento ao tratamento do paciente, por isso saber o tipo de tumor e seu estágio é muito importante, pois irá determinar como será realizada a assistência ao paciente.

2.4 Tratamento

O tratamento para o câncer de modo geral pode ser elencado em três frentes, que são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Atualmente também existe a terapia com fotorradiação, imunoterapia e transplante de medula óssea, tendo todos eles o objetivo de erradicar as células neoplásicas, sendo comumente associados mais de um tipo de tratamento (INCA, 2019).

Atualmente existem no mercado diversos quimioterápicos, que são classificados como ciclo celular específicos, os quais atuam contra as células que se encontram no ciclo celular; e os fármacos ciclo celular não específicos, que matam as células neoplásicas de modo independente de estarem no ciclo celular ou em repouso. Eles podem atuar em diversos mecanismos, como na inibição da síntese de DNA, por ação metabólica, interação do DNA formando ligações cruzadas, como agentes alquilantes, antibióticos antitumorais, que interagem com o DNA por intercalação, entre outros (MILLS et al., 2018).

O tratamento utilizado para o glioblastoma, atualmente é voltado por uma grande problemática, pois esse tipo de tumor tem como características a heterogeneidade molecular e o grande número de mutações genéticas, além de serem invasivos e se encontrarem em áreas que controlam a fala, a função motora e os sentidos. Devido as suas características, o tratamento hoje utilizado não é curativo (DAVIS, 2016).

O GBM ainda é considerado um tumor incurável, com uma média de sobrevida de aproximadamente 15 meses. As etapas estabelecidas para o tratamento são a ressecção cirúrgica seguida de radioterapia (RT) e concomitantemente a quimioterapia (QT) com temozolomida (TOMAR et al., 2021).

A cirurgia é a abordagem terapêutica inicial, sendo considerada uma marca registrada no tratamento de tumores cerebrais malignos. Algumas questões pré-operatórias, como condições médicas do paciente, exames funcionais e de imagem adequados, avaliação neuropsicológica e o uso de corticosteroides e antiepiléticos, devem ser levados em consideração. Os principais objetivos do tratamento são a ressecção segura máxima; amostra de tecido para diagnóstico patológico; melhoria das condições para tratamentos complementares; retardar a piora clínica; e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (FERNANDES et al., 2017).

Associa-se uma ressecção cirúrgica mais extensa a uma expectativa de vida maior. O paciente que é submetido a uma ressecção total seguida da RT e TMZ, possui uma sobrevida maior. Essa ressecção cirúrgica deve levar em conta o equilíbrio entre a remoção do tumor e a preservação das funções do paciente, levando assim a uma remoção segura (SANTOS, 2021).

O padrão atual de tratamento para pacientes com GBM é a ressecção cirúrgica máxima segura, seguida por TMZ concomitante ($75 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ por 6 semanas) e RT (60 Gy em 30 frações) e, em seguida, seis ciclos de manutenção de TMZ ($150\text{-}200 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ durante os primeiros 5 dias de um ciclo de 28 dias) (TAN et al., 2020).

A radioterapia, junto com a cirurgia, tem sido o tratamento básico de pacientes com glioblastoma desde a década de 1970 e a combinação de ambas duplica a sobrevida global em pacientes com gliomas malignos. O delineamento de volumes alvo por imagem metabólica e técnicas de ressonância magnética mais sofisticadas, com foco em áreas tumorais com necessidade de doses mais altas, ou melhor preservação de

estruturas sensíveis, está no centro da maioria das pesquisas para otimizar a radioterapia (WICK et al., 2018).

A radioterapia no tratamento do tumor é utilizada principalmente por promover alterações no DNA através da radiação, induzindo assim a morte das células por apoptose, necrose e autofagia (GOLDEN; APETOH, 2015).

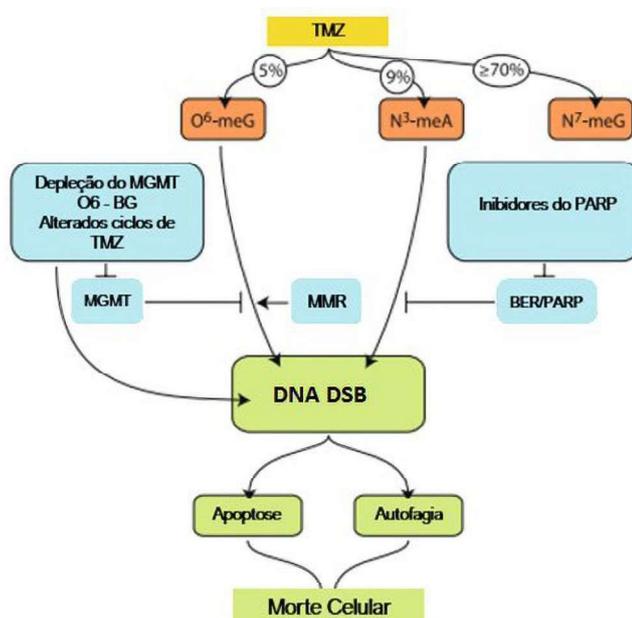
Em relação a quimioterapia, o fármaco utilizado para o tratamento de glioblastoma, desde a década de 70 é a temozolomida (TMZ), que é um agente alquilante de DNA de segunda geração que interrompe o crescimento maligno e o atua no ciclo celular por meio da metilação da guanina nas posições N⁷ e O⁶; e N³ na adenina (NAGASAWA, et al., 2012).

Apesar da posição O⁶ da guanina o alvo menos frequente do TMZ, ela é de extrema importância, pois a sua metilação resulta em seu emparelhamento com a timina em vez da citosina durante a replicação do DNA. Com isso, a lesão induzida pelo fármaco resulta na reticulação da dupla fita do DNA, danificado o glioblastoma, eo levando a apoptose dependente de cálcio e autofagia (KANZAWA et al., 2003).

O local de ação e alvos para regulação do TMZ com agentes correspondentes está representado na Figura 8. Os danos ao O⁶-meG respondem por apenas 5% das lesões de DNA induzidas por TMZ, mas são responsáveis pelo efeito citotóxico. O O⁶-metilguanina-DNA metil transferase (MGMT) repara as lesões, resultando em resistência ao TMZ. Quando o MGMT está esgotado ou suprimido pela metilação do promotor do gene, a citotoxicidade do TMZ é aumentada (KANZAWA et al., 2003).

O Reparo de DNA *Mismatch* (MMR) reconhece os pares de bases anormais contendo O⁶-meG, eventualmente levando a quebra da dupla fita do DNA e a morte celular. Os danos ao N³-meA também são citotóxicos, mas geralmente são reparados pelo sistema de reparo por excisão de bases (BER). A inibição farmacológica de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), inibe o funcionamento do BER, potencializando a citotoxicidade do TMZ (VILLANO et al.,2009).

Figura 8: Sítio de ação e alvos da temozolomida.



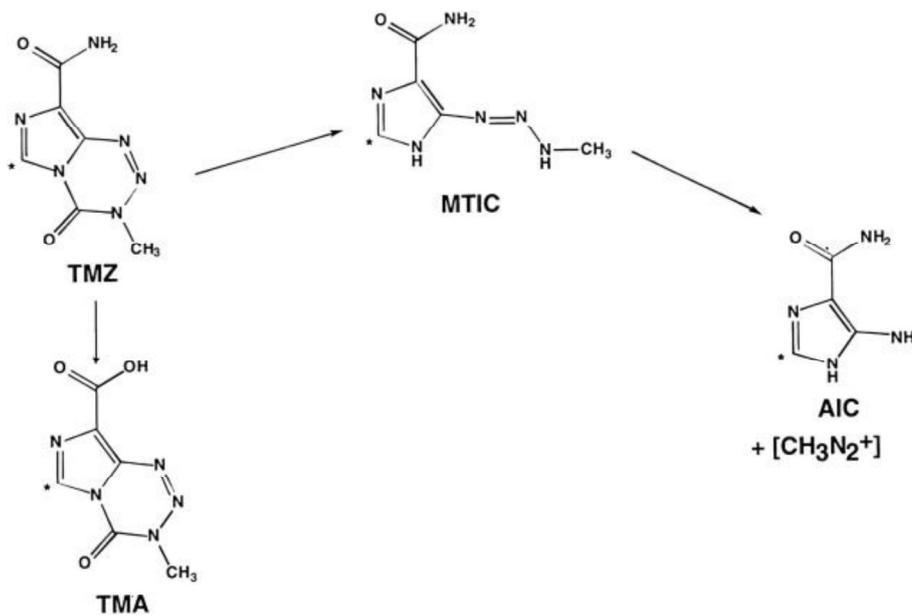
Fonte: Adaptado de Villano et al. (2009).

Legenda: TMZ: temozolomida; O⁶-meG: O⁶-metilguanina; N³-meA: N-metiladenina; N⁷-meG: N⁷-metilguanina; BER: Reparo por excisão de bases; PARP: Poli (ADP-ribose) polimerase; O⁶-BG: O⁶-benzilguanina; MNR: Reparo de DNA Mismatch; MGMT: O⁶-metilguanina-DNA metil transferase; DSB: Quebra da fita dupla.

O TMZ é um pró-fármaco derivado de imidazotetrazina que se decompõe espontaneamente em 5- (3-metiltriazen-1-il) imidazol-4carboxamida (MTIC) ao entrar em um ambiente ácido. Como a ativação do pró-fármaco não requer metabolismo de primeira passagem, as funções hepática e renal não são necessárias para seu desempenho. Por ser estável em ambientes ácidos, ela permanece em estado pró-droga enquanto passa pelo sistema digestivo e isso faz com que ela seja tolerada em uso oral (PANETTA et al., 20014).

O TMZ ingerido oralmente se decompõe em MTIC, e após em 4-amino-5-imidazol-carboxamida (AIC) em ambientes ácidos. Como o MTIC pode ser hidrolisado em AIC em qualquer tecido com eliminação subsequente, o TMZ não se acumula no plasma após o ciclo de terapia padrão de 5 dias. No entanto, alguns AIC podem permanecer no corpo para serem usados como intermediários na síntese de purinas (Figuras 9 e 10) (NAGASAWA, et al., 2012).

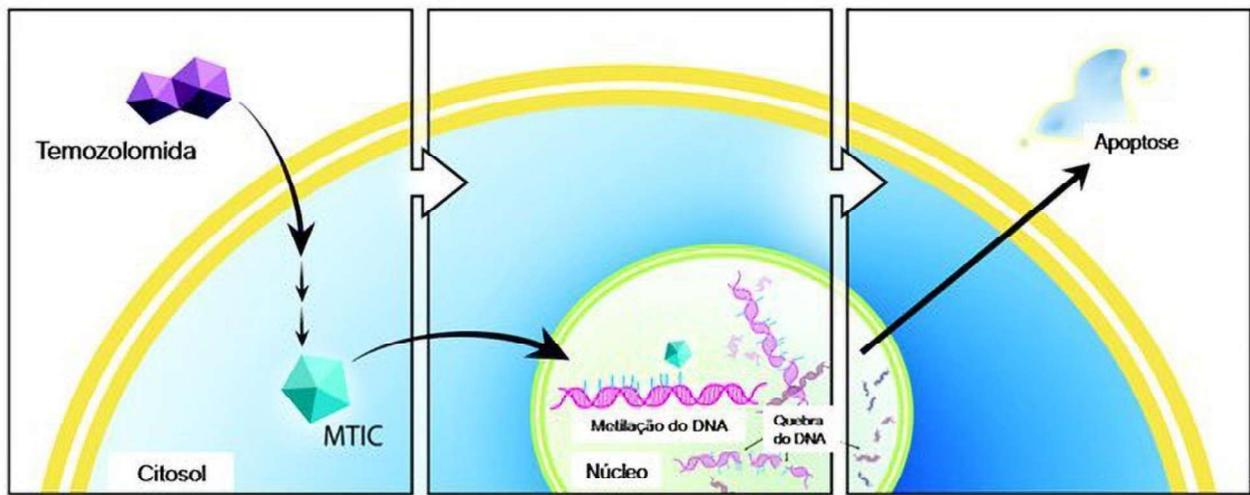
Figura 9: Vias metabólicas e de degradação da temozolomida.



Fonte: Nagasawa et al. (2012)

Sendo uma molécula lipofílica, o TMZ penetra efetivamente nas células de glioma. A barreira hematoencefálica em torno desses tumores é frequentemente comprometida, e as características altamente angiogênicas do glioblastoma permitem que as concentrações de TMZ em áreas malignas atinjam níveis mais elevados do que nos tecidos circundantes normais (BELTER et al., 2020).

Figura 10: Mecanismo de ação da temozolomida.



Fonte: Adaptado de Wesolowski; Rajdev; Mukherji (2010).

Esquemas da dose de TMZ (ddTMZ) foram projetados para esgotar os níveis de *MGMT* do tumor e, assim, melhorar sua atividade, principalmente em glioblastomas. No esquema há um intervalo de 4 semanas e a quimioterapia é completada por seis ciclos

de manutenção de temozolomida em 5 de 28 dias a 150 mg (ciclo 1) e a 200 mg (ciclos 2–6/m²) de superfície corporal adaptada de acordo com a tolerância hematológica (TAMIMI; JUWEID, 2017; WICK et al., 2018).

O TMZ assim como outros quimioterápicos, possui efeitos colaterais, entre eles náusea, fadiga, sintomas gastrointestinais, supressão da medula óssea, neutropenia, trombocitopenia, leucopenia, linfopenia, alopecia, e quando utilizado por longos períodos pode levar a carcinogênese e a hepatite B. Ele possui também toxicidade hematológica e é neurotóxico (GOLDBECKER et al., 2011; YAO et al., 2013).

Além disso, ele eleva o risco de infecções oportunistas, particularmente pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* (carinii) (PCP). O risco de PCP é aumentado em pacientes recebendo RT concomitante e com dosagem prolongada. O TMZ causa linfopenia, baixas contagens de células CD4⁺. Seu uso concomitante com corticosteroides, contribui para a imunossupressão (VILLANO et al., 2009).

Hoje em dia, a resistência ao tratamento com o TMZ se faz presente quando os promotores de excisão da base, como *MGMT*, estão altamente expressos. O gene *MGMT* está presente no cromossomo 10q26 e ele codifica uma proteína que repara o DNA removendo grupos alquila. Quando essa região é metilada, o gene é silenciado. Sem a ação do gene, as células neoplásicas ficam expostas aos efeitos dos agentes alquilantes usados na quimioterapia, como o TMZ. Portanto, os tumores que possuem o promotor *MGMT* metilado apresentam melhor resposta à quimioterapia e melhor prognóstico (ALMEIDA et al., 2019).

Embora temozolomida faça parte do regime padrão quimioterápico para pacientes com GBM, ela apresenta uma toxicidade indesejada e não possui efeito curativo. Como uma abordagem alternativa, terapias direcionadas podem limitar a toxicidade indesejada e bloquear de forma mais eficaz a proliferação do tumor (SHERGALIS, et al., 2018).

Um desses tratamentos alternativos é com a utilização de anticorpos monoclonais recombinantes anti-VEGF (bevacizumab). A angiogênese é uma característica chave para sobrevivência dos tumores, pois eles dependem dos nutrientes da rede vascular para a sua proliferação. A VEGF é um amplo mediador de neovascularização tumoral e sua expressão está ligada à tumorigenicidade do GBM. O tratamento com bevacizumab é uma opção reservada para pacientes com GBM recorrente (SHERGALIS, et al., 2018).

Mesmo com um considerável número de quimioterápicos no mercado, os seus efeitos colaterais atuam de maneira intensa nos pacientes, visto que muitos não diferenciam células normais de neoplásicas, atuando por exemplo, em células de elevada proliferação como as gastrointestinais, capilares e sistema imunológico (WANG et al., 2019), comprometendo o organismo como um todo. Por isso, a busca de derivados bioativos que sejam eficientes, de baixo custo, com poucos efeitos colaterais e que atuem especificamente em células neoplásicas é necessária (JESUS et al., 2016).

Por esses motivos, as pesquisas com guanilidrazonas são importantes, visto seu potencial citotóxico já conhecido na literatura, além de sua facilidade e baixo custo de síntese. Poucos estudos compreendem a atividade desses derivados voltados a linhagem de glioblastoma humano.

2.5 Guanilidrazonas

As guanilidrazonas são da classe da hidrazona ($-C=N-NHR$) tendo no R uma função amidina. As hidrazonas são caracterizadas pela presença do grupamento imina ligado a uma amina e são consideradas mais estáveis que a imina, pois carregam um átomo eletronegativo (RAMAKRISHNAN et al., 2015). Na química, são utilizadas como intermediários no desenvolvimento de derivados heterocíclicos polifuncionais os quais contêm átomos de nitrogênio (KUMAR et al., 2017).

Para a obtenção das guanilidrazonas, os métodos convencionais de reações são semelhantes das reações para a formação da imina, sendo uma condensação quimiosseletiva entre o derivado carbonilado e os sais de aminoguanidina em meio alcoólico (SANTOS-JÚNIOR, 2017).

Na literatura, o estudo das guanilidrazonas voltado para as atividades farmacológicas vem de muito tempo, entre as quais encontradas a atividade anti-inflamatória (HEIMFARTH et al., 2020; HAN et al., 2021), antimicrobiana (KIM et al., 2021), antifúngica (SANTANA et al., 2019), entre outras.

Em relação a sua atividade antitumoral, pode-se destacar alguns derivados, como a mitoguazona, na qual é composta por dois grupamentos de guanilidrazonas que estão envolvidas na biossíntese de poliaminas biogênicas e podem ser utilizadas no tratamento de linfoma, linfoma não Hodgkin e HIV (EKELUND et al., 2001).

Outro estudo realizado por Andreani et al. (2000) estabeleceu a utilização de um derivado de guanilidrazona no tratamento da leucemia, melanoma, câncer de pulmão, cólon, rim e outros.

Andreani et al. (2005) também realizou outro estudo no qual foi avaliada a atividade antitumoral de imidazotiazóis guanilidrazônicos com diferentes grupos dimetoxi e nitrofenil na posição 6, onde o derivado de número 41 apresentou concentração inibitória em 50% das células de 5,81 μM para câncer de cólon (COLO 205); 6,23 μM para câncer de ovário (OVCAR-3), 5,84 μM para câncer de rim (RXF 393), e 5,72 μM para leucemia (K-562). Com esses resultados, os autores concluíram que o composto 41 foi capaz de inibir o Complexo III e, conseqüentemente, produzir uma diminuição no potencial mitocondrial. Além disso, foi capaz de induzir na concentração de 10^5 M, um aumento dependente do tempo de células, apresentando fluorescência DiOC6 opaca, sugerindo assim que o derivado 41 é capaz de induzir apoptose.

Yavuz et al. (2019) realizaram um estudo com uma série de derivados de guanilidrazonas, os quais apresentaram atividade *in vitro* frente a linhagens de câncer de mama humano (MCF-7) e de câncer de fígado humano (HepG2) usando o ensaio MTT. A maioria dos derivados recentemente sintetizados, exibiram atividade citotóxica contra essas células cancerosas. Segundo o mesmo estudo, os derivados exibiram mais atividades citotóxicas do que os controles positivos, 5-fluorouracil e irinocam, contra a linha celular MCF-7 e quase todos os derivados apresentaram resultados mais citotóxicos do que a cisplatina.

No estudo realizado por França et al. (2016), uma série de guanilidrazonas sintéticas foi testada frente às linhagens de células tumorais HCT-8 (carcinoma do cólon), MDA MB-435 (melanoma) e SF-295 (glioblastoma). Os derivados 7, 11, 16 e 17 mostraram forte atividade citotóxica com valores de CI_{50} inferiores a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ contra as linhas de células tumorais. Quando destacada a atividade frente ao glioblastoma, os derivados que apresentaram melhores atividades foram o 10, 14, 17, 19.

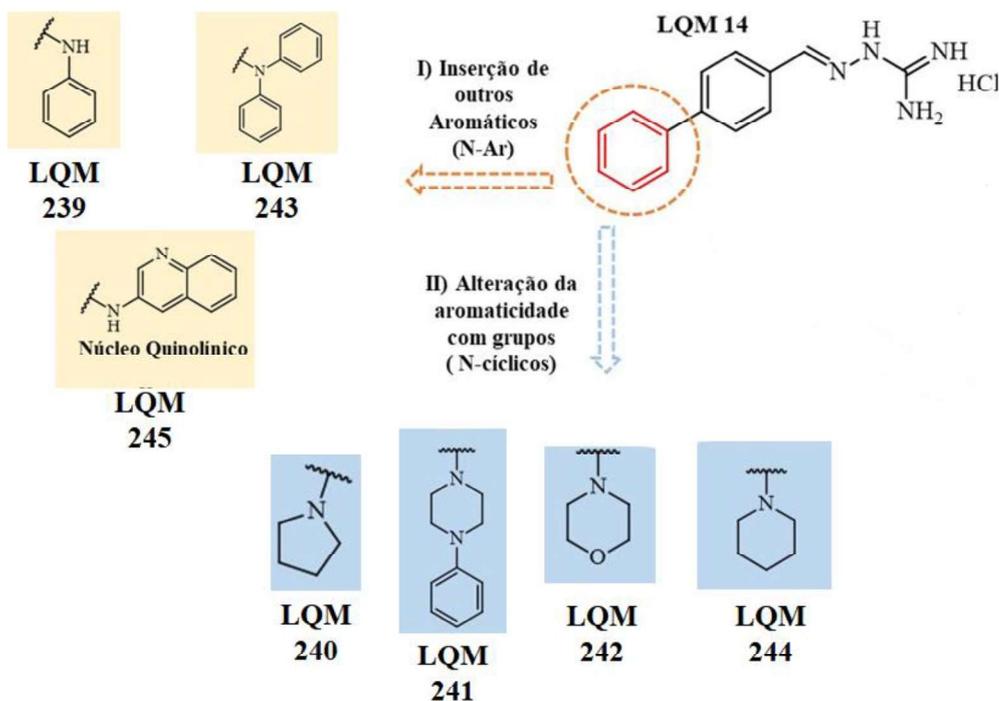
O planejamento de derivados com alvos específicos se faz mais eficaz quando comparado aos métodos comuns. As guanilidrazonas possuem diversas atividades relatadas, em especial a antitumoral *in vitro*, além disso possuem uma grande facilidade de síntese e um baixo custo de produção, e com isso a pesquisa na sua utilização frente ao glioblastoma humano é tão importante, visto que na literatura pouco se sabe sobre esses derivados atuando nessa linhagem celular tumoral específica.

2.6 Síntese dos derivados guanilidrazônicos

O derivado protótipo LQM 14 foi planejado por França et al. (2016), e testado na concentração de 5µg/mL frente a linhagens de carcinoma de cólon (HCT-8), melanoma (MDA-MB-435) e glioblastoma (SF-295). Os resultados obtidos da CI₅₀ para as linhagens foram 1,8µM para carcinoma de cólon, 4,2 µM para melanoma e 2,0 µM para glioblastoma (FRANÇA et al., 2016).

Mesmo obtendo uma atividade citotóxica de 100% de inibição frente as 3 linhagens tumorais testadas nas concentrações de 10, 100 e 1000 micromolar, o LQM 14 reduziu a viabilidade celular de células não-tumorais da linhagem macrófagos J774A.1 (FRANÇA et al., 2016) e com isso, foram realizadas novas modificações no derivado (Figura 11), para que esse resultado frente a células tumorais fosse mantido e o efeito não citotóxico frente a células não-tumorais fosse alcançado.

Figura 11: Modificações estruturais propostas e desenvolvidas.



Fonte: Rodrigues (2019).

Foram obtidos 7 derivados, sendo eles **LQM 239** (Cloridrato de (E) -2- (4- (fenilamino) benzilideno) hidrazinacarboximidamida); **LQM 240** (Cloridrato de (E) -2- (4- (pirrolidin-1-il) benzilideno) hidrazinacarboximidamida); **LQM 241** (Cloridrato de (E) -2- (4- (4-fenilpiperazin-1- il) benzilideno) hidrazinacarboximidamida); **LQM 242** (Cloridrato de (E) -2- (4-morfolinobenzilideno) hidrazinacarboximidamida); **LQM 243** (Cloridrato de (E) -2- (4- (difenilamino) benzilideno) hidrazinacarboximidamida); **LQM 244** (Cloridrato de (E) -2- (4- (piperidin-1-il)

benzilideno) hidrazinacarboximidamida) e **LQM 245** (Cloridrato de (E) -2- (4-(quinolin-3- ilamino) benzilideno) hidrazinacarboximidamida) (RODRIGUES, 2019).

A partir das sínteses dos derivados da série, foram realizados os testes *in vitro*, a fim de se avaliar tanto seu efeito citotóxico para a linhagem celular de GBM02 e em células normais.

3. OBJETIVOS

Geral

Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* de uma série de derivados de Guanilidrazonas em linhagem de Glioblastoma humano (GMB02).

Específicos

- Avaliar a toxicidade de derivados de guanilidrazonas em células mononucleares sanguíneas;
- Determinar o potencial tóxico dos derivados de guanilidrazonas em células de linhagem GBM02;
- Estabelecer a seletividade dos derivados de guanilidrazonas;
- Identificar o efeito sobre a migração do GBM02 dos derivados de guanilidrazonas;
- Identificar a ação dos derivados de guanilidrazonas nos aspectos morfológicos de GBM02;

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese dos derivados sintéticos

Os derivados sintéticos foram planejados a partir do protótipo LQM 14 obtido por França et al. (2016).

As amostras utilizadas no estudo foram planejadas e sintetizadas por Érica Rodrigues (2019), no Laboratório de Química Medicinal do Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas e entregues à pesquisadora.

4.2 Preparação da série de derivados sintéticos

Os derivados sintéticos foram preparados e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) para a formação da solução estoque (50 mM). Para os experimentos, foi realizada uma diluição seriada nas concentrações de 0,1, 1, 3, 10, 30 e 100 μ M. As amostras foram plaqueadas em triplicatas em placas de 96 e 24 poços.

4.3 Obtenção da linhagem de glioblastoma humano GBM02

Para a realização dos testes, foi utilizada linhagem de glioblastoma humano GBM02 obtida pelo Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer no Rio de Janeiro, cedidas pelo Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto e cultivadas em laboratório. O número do parecer no comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-RJ) é CEPHUCFF. N° 002/01.

4.4 Preparação da linhagem de glioblastoma humano

As células GBM02 foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle/F12 (DMEM/F12) e foram suplementadas com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) de piruvato e 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (P/S), e foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.5 Isolamento e cultivo de células mononucleares sanguíneas

As células mononucleares sanguíneas (monócitos e linfócitos) foram isoladas de amostras de sangue de bolsas de sangue descartadas do Banco de Sangue do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes. Após, essas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de

L-glutamina, 1% (v/v) de piruvato e 1% (v/v) de P/S e mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂.

4.6 Avaliação do efeito citotóxico das guanilidrazonas em monócitos e linfócitos

As amostras de sangue periférico coletadas de bolsas de sangue doadas pelo Hospital Universitário Professor Alberto Antunes foram diluídas em volumes iguais de tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M. Essa solução foi adicionada a um tubo Falcon contendo Histopaque[®] na proporção de 2:1 e foi posteriormente centrifugada a 2.837 rpm por 30 minutos a 26°C.

Após a centrifugação, a solução foi separada em três diferentes camadas visíveis sendo a superior (soro), a intermediária (células mononucleares sanguíneas e Histopaque[®]) e a inferior (hemácias). Após, a região intermediária foi removida e submetida a duas centrifugações de 10 minutos cada a 2.136 e 1.638 rpm a 26°C, respectivamente, a fim de se eliminar qualquer vestígio de Histopaque[®] e se obter somente os monócitos e linfócitos (ULMER et al., 1984).

Uma vez isolados, os monócitos e linfócitos foram cultivados em placas de 96 poços na concentração de 4×10^5 células a cada 50 µL de DMEM/F12. Por serem células não aderentes, e não necessitarem de um tempo para se fixarem ao poço, logo em seguida receberam os tratamentos com os derivados de guanilidrazonas, nas concentrações de 0,1, 1, 3, 10, 30 e 100 µM, e com TMZ em 100 µM, e na sequência foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 48 horas.

Após, foram adicionados 50 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço das placas, sendo incubadas por 4 horas. Foram adicionados 50 µL de DMSO/poço para solubilizar os cristais de formazan. Após 20 minutos foi realizada a medição das absorbâncias utilizando um leitor de microplacas a 530 nm.

A comparação dos resultados dos grupos tratados com os derivados e o tratado com o controle DMSO 0,2% permitiu a obtenção das concentrações dos derivados que apresentaram 50% de citotoxicidade em monócitos e linfócitos (CC₅₀).

4.7 Avaliação do efeito citotóxico das guanilidrazonas sobre GBM02

A avaliação do efeito citotóxico frente a células de GBM02 foi realizada de acordo com o ensaio de Mosmann (1983), onde o teste é realizado através da conversão do sal de MTT, de coloração amarela, em cristais de formazan, roxos, por ação de uma

enzima mitocondrial específica, a succinato desidrogenase. Logo, quanto maior a ocorrência dessa conversão, maiores são as atividades mitocondriais e a quantidade de células viáveis. As células de GBM02 foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de 6×10^3 células a cada 100 μL de DMEM/F12.

Após aderidas, as células foram tratadas com os derivados nas concentrações de 0,1, 1, 3, 10, 30 e 100 μM , e com TMZ na concentração de 100 μM , e incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi retirado e adicionado a cada poço 50 μL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) em meio DMEM/F12. Após 2 horas da adição do MTT à placa, os sobrenadantes foram retirados e em seguida adicionados 50 μL de DMSO em cada poço.

Após 30 minutos foi realizada a leitura da placa através de um leitor de microplacas na absorvância de 530 nm. A concentração de cada derivado responsável por inibir 50% da viabilidade de GBM02 (CC_{50}), em 48 horas, foi calculada baseada na comparação com o controle DMSO 0,2% (controle do veículo na maior concentração, cujas células foram consideradas 100% viáveis).

4.8 Avaliação da seletividade das guanilidrazonas

Para a avaliação da seletividade dos compostos para as células de GBM02, foi realizado o cálculo de índice de seletividade para cada derivado, sendo quanto maior o valor numérico do índice, mais seletivo para a célula tumoral é o derivado, seguindo a fórmula (KANER et al., 2016):

$$\begin{aligned} & \text{Índice de seletividade (IS)} \\ & = \text{Concentração citotóxica em Monócitos e Linfócito 50\% (CC50)} \\ & \div \text{Concentração citotóxica em GBM02 50\% (CI50)} \end{aligned}$$

4.9 Avaliação do efeito antimigratório das guanilidrazonas sobre GBM02

Para a avaliação do efeito antimigratório foi realizado o ensaio de *Scratch* (LYANG; PARK; GUAN, 2007). Inicialmente, as células GBM02 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de 10^5 células em 400 μL de DMEM/F12. Após encontrarem-se aderidas e apresentando uma confluência de cerca de 90 a 95%, foi realizado um risco vertical, com uma ponteira de 200 μL , no centro de cada poço, a fim de estabelecer uma região sem células.

Na sequência, o sobrenadante foi retirado para eliminar células em suspensão e em seguida o meio de cultura foi reconstituído nos poços com 400 μL de DMEM/F12, sendo este o T_0 . Foram realizadas microfotografias dos poços individualmente, em um microscópio óptico invertido. Após, as células foram tratadas com os derivados na concentração de 1 μM , DMSO 0,2% e com TMZ a 100 μM .

Após a realização dos tratamentos, as placas foram armazenadas em estufa de CO_2 por 24 horas. Transcorrido esse período foi realizada a segunda captura de imagens, nas mesmas áreas fotografadas em T_0 , utilizando o mesmo microscópio para se verificar qualitativamente a resposta dos tratamentos sobre a migração de células para a região anteriormente vazia.

Na análise quantitativa, a área vazia dos poços em T_0 e T_{24} foi determinada com o auxílio do programa ImageJ[®] e a porcentagem de inibição da migração celular nos diferentes grupos de tratamentos foi obtida de maneira indireta, levando-se em consideração as áreas vazias de T_0 e T_{24} .

4.10 Avaliação do efeito das guanilidrazonas sobre a morfologia de GBM02

As células GBM02 foram plaqueadas na concentração de 6×10^3 células a cada 500 μL de DMEM/F12, em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm. Uma vez aderidas às lamínulas, foram realizados os tratamentos com derivados nas concentrações que foram estabelecidas de acordo com os testes anteriores, além da TMZ na concentração de 100 μM e DMSO 0,2%. Após, as placas foram incubadas em estufa de CO_2 por 48 horas.

Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS 0,1 M e fixadas com metanol durante 2 minutos. Na sequência as células fixadas foram coradas com panótico rápido[®] (triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e solução de tiazinas 0,1%). Ao final da coloração, as lamínulas foram lavadas com água destilada, secas durante overnight, e coladas nas lâminas com Entelan[®]. As microfotografias representativas do aspecto morfológico de GBM02 após os diferentes tratamentos foram obtidas através de microscópio óptico no aumento de 40X.

4.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a porcentagem da média \pm o erro padrão da média (e.p.m.), e as diferenças foram analisadas estatisticamente empregando-se a

análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Dunnett, e teste t, onde os valores de $p < 0,01$ foram considerados significantes.

Os experimentos de viabilidade celular, migração e morfologia foram realizados em triplicata, e todos de forma independente.

Os dados quantitativos foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). As imagens de microscopia óptica do ensaio de morfologia foram obtidas de dez campos microscópicos aleatórios, e do protocolo do *scratch* foram analisadas utilizando o software Fiji ImageJ®, versão 2.0.0/2015.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito citotóxico das guanilidrazonas em monócitos e linfócitos

O ensaio envolvendo as células sanguíneas (monócitos e linfócitos), mostrou que nenhum dos derivados testados apresentou citotoxicidade frente a essas células nas 48 horas de tratamento. Quando comparado ao DMSO 0,2%, não foi observado efeito máximo até a concentração máxima testada (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito dos derivados sobre a viabilidade celular em monócitos e linfócitos.

Tratamento	CC ₅₀ (µM ± e.p.m.) ^a	Emáx (% ± e.p.m.) ^b
TMZ	ND	>100
LQM 14	>100	ND
LQM 239	>100	ND
LQM 240	>100	ND
LQM 241	>100	ND
LQM 242	>100	ND
LQM 243	>100	ND
LQM 244	>100	ND
LQM 245	>100	ND

Notas: ^aConcentração citotóxica de 50% de monócitos e linfócitos, calculada por meio de curvas concentração-resposta. ^bMédia ± erro padrão da média do efeito máximo sobre a viabilidade, em triplicatas de um experimento representativo. Os valores do efeito máximo não foram significativos em relação ao grupo controle DMSO 0,2%. ND: efeito máximo não determinado até a concentração máxima testada, quando comparado ao grupo DMSO.

5.2 Efeito citotóxico das guanilidrazonas sobre GBM02 e Índice de Seletividade (IS)

O teste de MTT foi realizado para avaliar o efeito dos derivados guanilidrazônicos sobre a viabilidade de GBM02. Após 48 horas, foi observado que os derivados apresentaram efeito inibitório maior que 70%, sendo estatisticamente iguais, exceto o LQM 242 que apresentou efeito de 42,92% (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito dos derivados guanilidrazônicos e da TMZ sobre a viabilidade de GBM02 e índice de seletividade.

Derivados	CI ₅₀ (µM ± I.C.) ^b	Efeito Inibitório Máximo (% ± E.P.M) ^a	Índice de seletividade (IS)
Temozolamida	>100	47,2 ± 2,7	ND
LQM 14	1,94 (0,28- 11,67)	77,91 ± 2,26 ^{a****}	>51,54
LQM 239	5,07 (1,61 - 14,36)	71,49 ± 1,43 ^{a****}	>19,72
LQM 240	3,54 (2,38 - 5,28)	75,26 ± 1,01 ^{a****}	>28,24
LQM 241	6,30 (2,62 - 15,67)	74,78 ± 0,50 ^{a****}	>15,87
LQM 242	>100	42,92 ± 3,45 ^{a****}	ND

LQM 243	4,15 (2,23 – 7,93)	73,80 ± 4,72 ^{a****}	>24,09
LQM 244	22,74 (10,20 – 57,67)	74,86 ± 0,40 ^{a****}	>4,39
LQM 245	8,85 (5,58 – 14,23)	78,14 ± 1,55 ^{a****}	>11,29

Notas: Não houve diferença significativa entre o Meio e DMSO 0,2%.

^aMédia ± índice de confiança de 95% do efeito máximo sobre a viabilidade de GBM02, em triplicatas de um experimento representativo ^bConcentração inibitória de 50% de GBM02, calculada por meio de curvas concentração-resposta. Os valores do efeito máximo foram significativos quando ^{***}p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,2%.

Em relação à concentração citotóxica em 50% (CC₅₀) frente a linhagem de GBM02, os derivados da série se apresentaram equipotentes quando comparada a atividade do protótipo LQM 14, exceto os compostos LQM 242 e o LQM 244.

Em relação a análise do efeito da seletividade relacionada aos efeitos citotóxico frente a linhagem de GBM02 e citotóxico frente a células sanguíneas (monócitos e linfócitos), foi possível observar que a TMZ não apresentou índice de seletividade determinado, pois não inibiu 50% de GBM02, nem os monócitos e linfócitos, sendo assim impossibilitado o cálculo do índice de seletividade. Os derivados demonstraram ser mais seletivos para as células de glioblastoma GBM02, do que para as células mononucleares sanguíneas, podendo-se destacar o protótipo LQM 14 e o seu derivado LQM 240.

5.3 Avaliação do efeito antimigratório das guanilidrazonas sobre GBM02

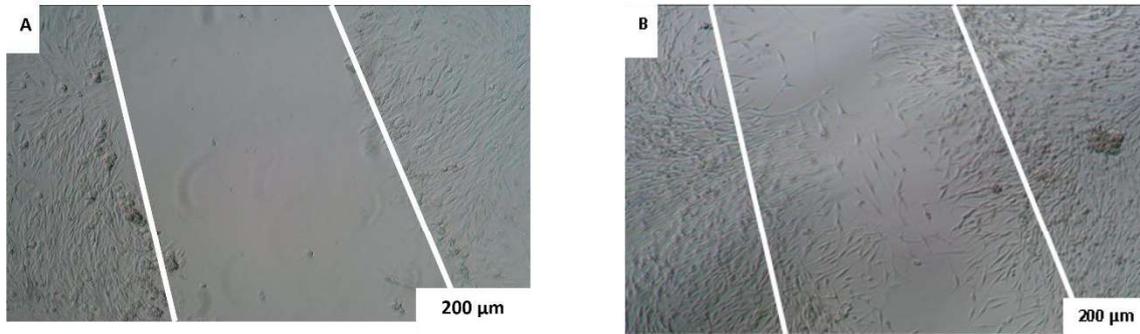
Para a avaliação do efeito antimigratório sobre GBM02 foram selecionados os derivados LQM 14, LQM 240, LQM 241 e LQM 243 por terem apresentado os melhores efeitos de inibição da viabilidade celular de GBM02, não apresentarem citotoxicidade em células mononucleares sanguíneas, e demonstraram mais seletivos para as células tumorais do que para monócitos e linfócitos.

Após a avaliação do efeito antimigratório destes derivados sobre GBM02 em 24 horas de tratamento, foi possível constatar visualmente que eles foram capazes de apresentar uma diminuição na migração celular de T0 para T24, quando comparados ao grupo controle DMSO 0,2% e a TMZ (100 µM) que por sua vez, alterou o perfil de deslocamento do GBM02.

Os compostos que apresentaram melhores percentuais de diminuição da migração foi o composto protótipo LQM 14, o qual diminuiu a migração de células de GBM02 em 88,09%, seguido do LQM 240 com diminuição de 86,54%. O composto LQM 241,

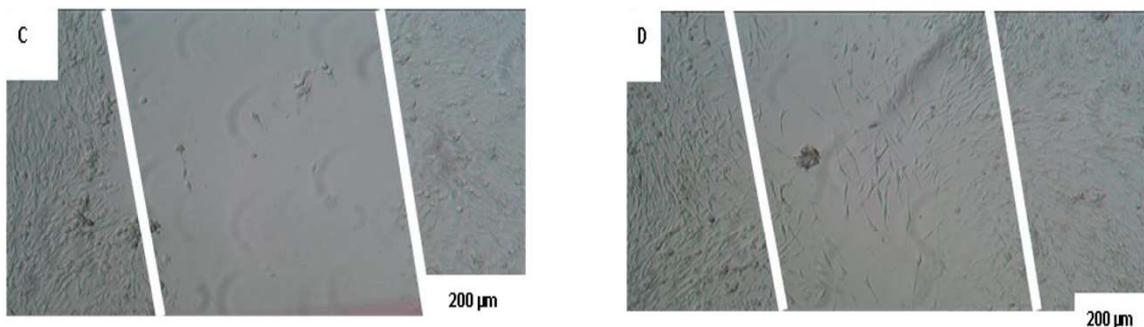
obteve um percentual de diminuição de migração de 79,30% e o LQM 243 obteve 74,08%.

Figura 12: Micrografias representativas sobre o efeito do DMSO 0,2% na migração de GBM02.



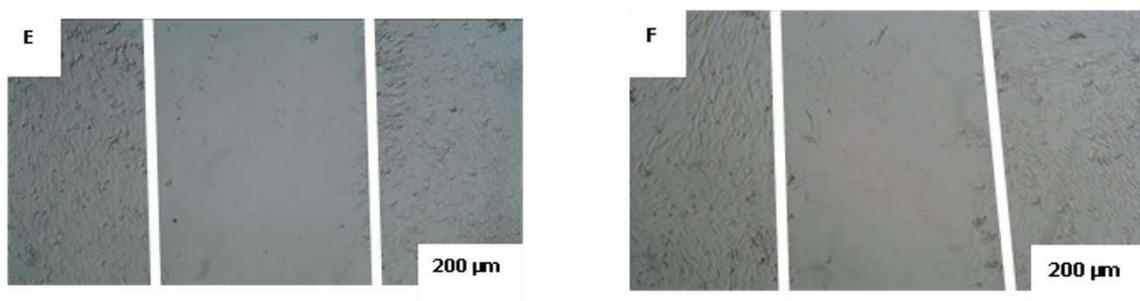
Nota: Análise qualitativa da migração de GBM02. **A** – Microfotografia no momento T0, logo após a realização do risco e obtenção da área vazia. **B** – Microfotografia no momento T24, 24 horas após a realização do risco e dos tratamentos. Imagens obtidas em microscópio óptico invertido, no aumento de 4x.

Figura 13: Micrografias representativas sobre o efeito do TMZ (100 µM) na migração de GBM02.



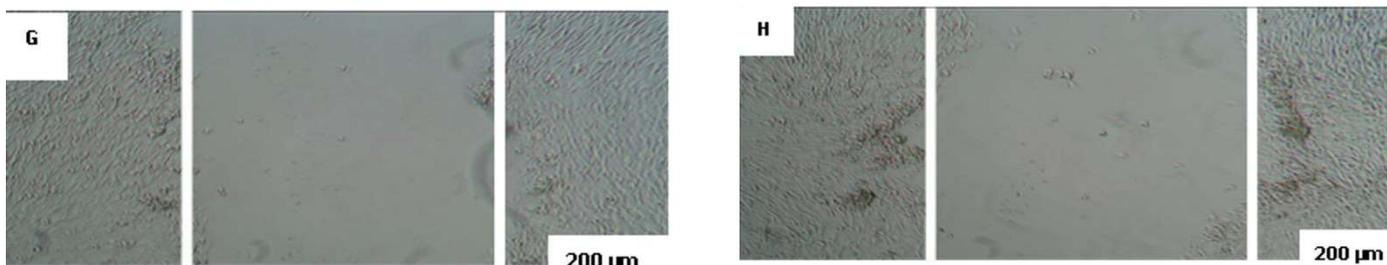
Nota: Análise qualitativa da migração de GBM02. **C** – Microfotografia no momento T0, logo após a realização do risco e obtenção da área vazia. **D** – Microfotografia no momento T24, 24 horas após a realização do risco e dos tratamentos. Imagens obtidas em microscópio óptico invertido, no aumento de 4x.

Figura 14: Micrografias representativas sobre o efeito do LQM 14 (1 µM) na migração de GBM02.



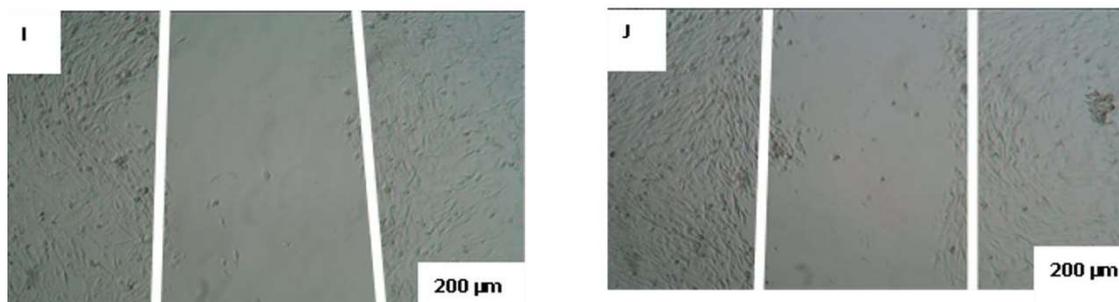
Nota: Análise qualitativa da migração de GBM02. **E** – Microfotografia no momento T0, logo após a realização do risco e obtenção da área vazia. **F** – Microfotografia no momento T24, 24 horas após a realização do risco e dos tratamentos. Imagens obtidas em microscópio óptico invertido, no aumento de 4x.

Figura 15: Micrografias representativas sobre o efeito do LQM 240 (1 μ M) na migração de GBM02.



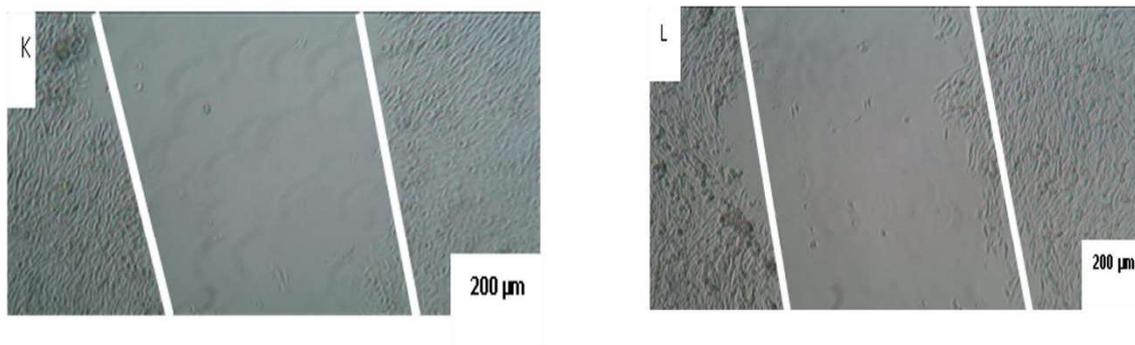
Nota: Análise qualitativa da migração de GBM02. **G** – Microfotografia no momento T0, logo após a realização do risco e obtenção da área vazia. **H** – Microfotografia no momento T24, 24 horas após a realização do risco e dos tratamentos. Imagens obtidas em microscópio óptico invertido, no aumento de 4x.

Figura 16: Micrografias representativas sobre o efeito do LQM 241 (1 μ M) na migração de GBM02.



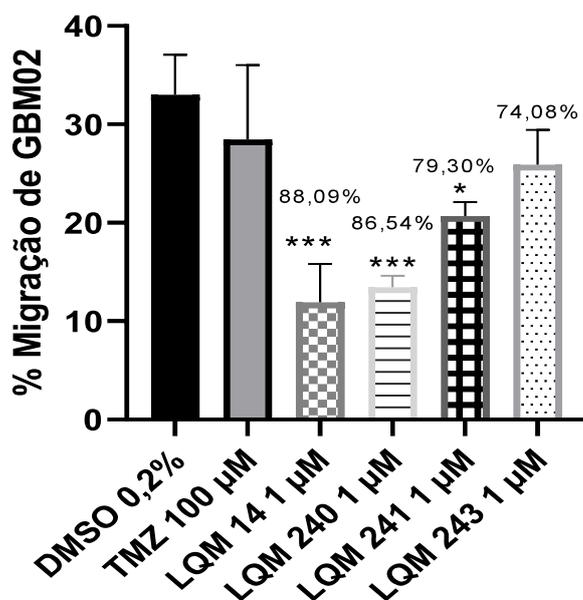
Nota: Análise qualitativa da migração de GBM02. **I** – Microfotografia no momento T0, logo após a realização do risco e obtenção da área vazia. **J** – Microfotografia no momento T24, 24 horas após a realização do risco e dos tratamentos. Imagens obtidas em microscópio óptico invertido, no aumento de 4x.

Figura 17: Micrografias representativas sobre o efeito do LQM 243 (1 μ M) na migração de GBM02.



Nota: Análise qualitativa da migração de GBM02. K – Microfotografia no momento T0, logo após a realização do risco e obtenção da área vazia. L – Microfotografia no momento T24, 24 horas após a realização do risco e dos tratamentos. Imagens obtidas em microscópio óptico invertido, no aumento de 4x.

Gráfico 1: Efeito dos derivados de guanilidrazonas LQM 14, LQM 240, LQM 241 e LQM 243 sobre a migração de GBM02.



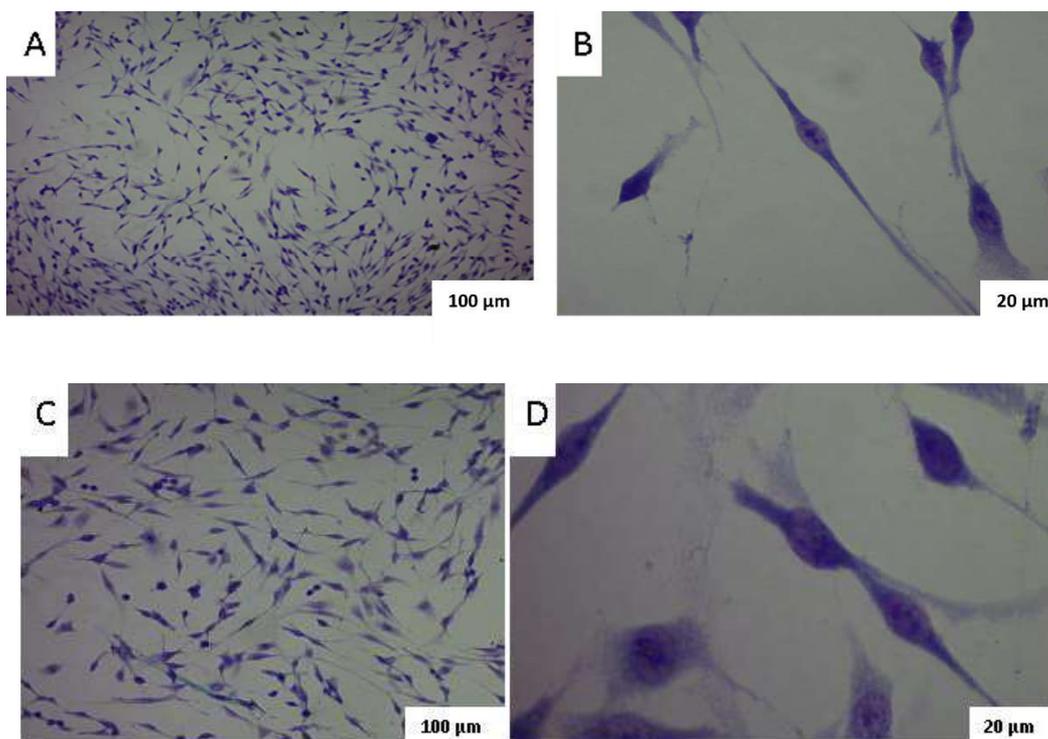
Notas: Análise quantitativa da migração de GBM02. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média da porcentagem de migração de GBM02, em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de porcentagem de migração de GBM02 foram significativos quando $*p < 0,1$ e $***p < 0,001$ em relação ao grupo DMSO 0,2%.

5.4 Avaliação do efeito das guanilidrazonas sobre a morfologia de GBM02

As alterações dos aspectos morfológicos das células GBM02, foram avaliadas frente os derivados de guanilidrazonas, com incubação de 48 horas.

Na figura 18, observa-se que as células tratadas com DMSO a 0,2% (A e B), apresentam aspecto morfológico proplasmático, com prolongamentos alongados, sendo a morfologia esperada para o glioblastoma. Já o TMZ (100 µM) não alterou a morfologia do GBM02 (C e D).

Figura 18: Aspecto morfológico do DMSO 0,2% e TMZ (100 μ M) em células de GBM02.

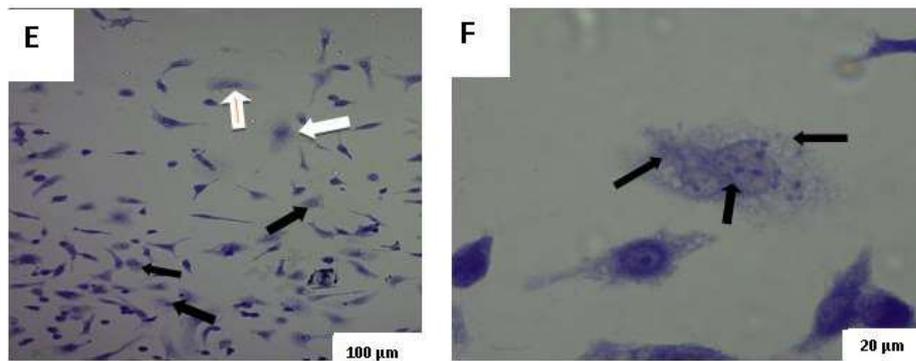


Nota: Análise dos aspectos morfológicos de GBM02. Microfotografias da morfologia de GBM02 dos controles DMSO 0,2% e TMZ no aumento de 10x (A e C) e no aumento de 40x (B e D).

Em seguida, foram selecionados dois derivados para investigação sobre alterações morfológicas em GBM02. Assim, foram selecionados o protótipo LQM 14 e o derivado LQM 240, aquele que melhor apresentou atividade nos ensaios anteriores.

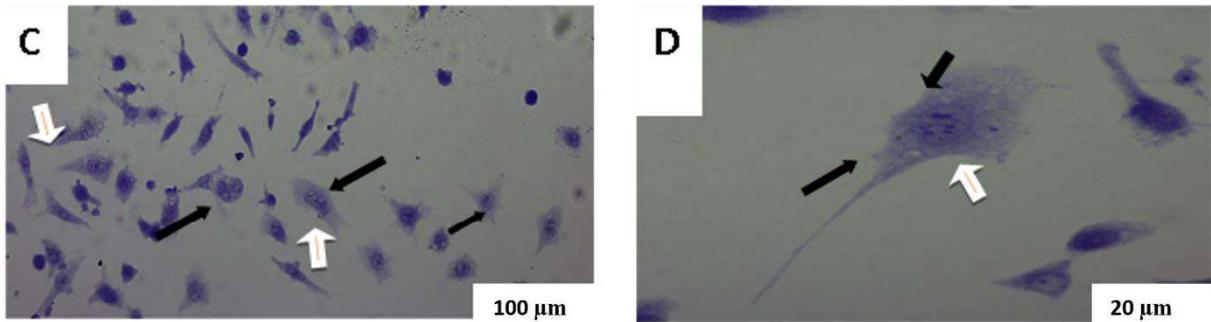
É possível a observar a presença de vacúolos citoplasmáticos (setas pretas) nas células de GBM02, além disso, houve uma diminuição na quantidade de células, bem como alteração na morfologia, quando comparado ao seu aspecto morfológico proplasmático alongado (observado em células sem tratamentos), e pode-se perceber a perda do conteúdo citoplasmático através do rompimento da membrana nuclear e do extravasamento de seu conteúdo (setas brancas) (Figura 19 e 20).

Figura 19: Aspecto morfológico da GBM02 frente ao derivado LQM 14.



Nota: Análise dos aspectos morfológicos de GBM02. Microfotografias da morfologia de GBM02, obtidas em microscópio óptico, do derivado LQM 14 no aumento de 10x (esquerda) e no aumento de 40x (direita).

Figura 20: Aspecto morfológico da GBM02 frente ao derivado LQM 240.



Nota: Análise dos aspectos morfológicos de GBM02. Microfotografias da morfologia de GBM02, obtidas em microscópio óptico, do derivado LQM 240 no aumento de 10x (esquerda) e no aumento de 40x (direita).

6. DISCUSSÃO

As guanilidrazonas são da classe das hidrazonas, as quais tem como o R uma amidina, sendo utilizadas como intermediários no desenvolvimento de derivados heterocíclicos polifuncionais (KUMAR et al., 2017). Elas derivam do mesmo quimiotipo de aminoguanidina com aceitadores de ligações de hidrogênio e propriedades doadoras, além de serem capazes de estabelecer interações eletrostáticas (LANGE et al., 2003). Na literatura, é possível associar as guanilidrazonas a diversas atividades farmacológicas, como atividade antibacteriana (BORGES, 2001; MARTINS, 2004); antifúngica (MARTINS, 2004), entre outras.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo a pesquisa da atividade citotóxica de guanilidrazonas frente à linhagem de glioblastoma humano. Essa classe de derivados foi primeiramente escolhida devido a sua atividade antitumoral comprovada na literatura (FRANÇA et al., 2016; SILVA et al., 2016; AL-JANABI et al., 2022), seu baixo custo e facilidade de síntese.

A série foi obtida através de modificações realizadas no protótipo LQM14, que foram feitas por meio de alterações da fenila na posição *para*. A partir dessas mudanças, seguiram-se duas frentes: alterações por novos sistemas aromáticos formando substituições do tipo N-aromáticos que originou o LQM 239, 243 e 245 e alteração da aromaticidade através da inserção de grupamentos com N-alifáticos cíclicos que originou o LQM 240, 241, 242 e 244 (RODRIGUES, 2019).

Como primeiro ensaio, buscou-se analisar a citotoxicidade em células mononucleares sanguíneas (monócitos e linfócitos), as quais foram escolhidas por participarem na resposta imune e no processo inflamatório relacionado às neoplasias; e no combate à progressão do tumor (NISHIJIMA et al., 2015).

Os monócitos são importantes, pois são um tipo de célula sanguínea circulante derivada da medula óssea, que é precursora dos macrófagos teciduais. Os monócitos são ativamente recrutados para os sítios inflamatórios, onde eles se diferenciam em macrófagos, que quando ativados fagocitam e matam microrganismos, secretam citocinas pró-inflamatórias e apresentam antígenos às células T auxiliares, ajudando na diminuição da progressão do tumor (ABBAS et al., 2019).

Já os linfócitos, desempenham um papel de destaque quando relacionadas às defesas no processo de carcinogênese. Eles são responsáveis por atacar as células do corpo infectadas por vírus oncogênicos (capazes de causar câncer) ou as células em

transformação maligna, além de produzir e secretar as linfocinas, que são substâncias que regulam o crescimento e o amadurecimento de outras células e do próprio sistema imune, onde distúrbios em sua produção podem influenciar no surgimento do câncer (INCA, 2021).

Estudos histopatológicos mostram que muitos tumores são circundados por infiltrados de células mononucleares compostos por linfócitos T e macrófagos (monócitos), e que linfócitos e macrófagos ativados estão presentes nos linfonodos que drenam os sítios de crescimento tumoral (ABBAS et al., 2019).

Uma baixa proporção de linfócitos/monócitos periféricos (LMR) pode ser estabelecida como um indicador de mau prognóstico em vários tipos de câncer, podendo ser um índice de prognóstico objetivo, simples e barato que pode ser usado para guiar com precisão o diagnóstico clínico (GU et al., 2016).

Em relação à droga padrão utilizada no tratamento do glioblastoma, a TMZ tem como características prolongar a linfopenia, que é dose dependente (principalmente quando utilizada concomitantemente com a radioterapia), apresentando depressão nas contagens de linfócitos, por pelo menos 2 meses após a interrupção da quimioterapia. A temozolomida é seletivamente tóxica para os linfócitos CD4+, e a toxicidade seletiva para as células CD4 é provavelmente responsável pelas infecções oportunistas observadas entre os pacientes que recebem o quimioterápico. A TMZ exerce preferencialmente seu efeito linfotóxico nos linfócitos em divisão, e seus efeitos parecem ser mediados em baixas doses pela O-metilguanina e em doses mais altas por outros mecanismos de outros danos ao DNA (YOVINO; GROSSMAN; 2012).

Em relação aos monócitos, o glioma maligno secreta uma proteína quimioatraente de monócitos 1 ou ligante 2 de quimiocina C-C (CCL2) para aumentar a migração de monócitos para o local do tumor. No microambiente do GBM, os monócitos se convertem em células supressoras derivadas de mieloides e macrófagos imunossupressores associados, que induzem a progressão do tumor. Essas células estão associadas a um pior resultado em pacientes com GBM devido a uma redução associada nas células T infiltrantes de tumor e função das células T suprimida, sendo a presença de MDSCs em pacientes com GBM responsáveis pela disfunção das células de memória efetoras T CD4 (KARACHI et al., 2018).

O objetivo do ensaio foi avaliar se os compostos atuavam nessas células normais de defesa. No ensaio de citotoxicidade frente a monócitos e linfócitos, os derivados não

apresentaram citotoxicidade nas 48 horas de tratamento e quando comparado ao controle DMSO 0,2%, o efeito máximo não foi determinado até a concentração máxima testada, significando assim que os derivados não são tóxicos e nem influenciam nessas células de defesa. Esse resultado é significativo, já que geralmente derivados sintéticos se apresentam tóxicos para células normais do organismo.

O estudo realizado por Jinx et al. (2018), demonstra que a Metil-glioxal-bis-guanilidrazona não apresenta toxicidade *in vivo* significativa, porém interfere na diferenciação de monócitos em macrófagos. Esse derivado apresenta captação seletiva de monócitos, sendo um inibidor geral da diferenciação de monócitos e interfere na iniciação da polarização de macrófagos.

Em outro estudo também conduzido por Jinx et al., (2015), foi possível observar que a Metil-glioxal-bis-guanilidrazona apresentava vários níveis de efeito citotóxico para monócitos e macrófagos, enquanto as células T em repouso eram completamente insensíveis à droga, porém nos monócitos, não demonstrou morte celular na concentração de 1,4 M durante 24 horas.

Relacionando os achados aos estudos na literatura, pode-se perceber que as guanilidrazonas apresentam efeitos citotóxicos para células normais, podendo interferir no desenvolvimento das células de defesa do corpo, que são primeiramente as responsáveis para conter a progressão tumoral. Compostos que não se apresentem tóxicos para as células normais, são necessários, principalmente com o objetivo de diminuição dos efeitos colaterais. Os resultados do presente estudo são importantes, pois o tratamento padrão para o GBM atualmente, interfere diretamente no desenvolvimento desse tipo celular, causando linfopenia e dificultando o sistema imune no desenvolvimento do seu papel. Compostos que não alterem a homeostase imunológica são desejáveis, visto que eles possam ajudar no combate a progressão tumoral.

Após o resultado de não toxicidade dos compostos, seguiu-se para o ensaio de citotoxicidade frente a células da linhagem GBM02, onde se foi realizado ensaios de MTT, o qual se utiliza para obtenção da porcentagem do efeito máximo dos compostos nas células de glioblastoma, além de se obter a concentração inibitória em 50%, baseando-se na atividade mitocondrial das células através da clivagem do sal de tetrazólio em cristais de formazan (MOSMANN, 1983).

Na literatura, é possível encontrar estudos que relacionam a atividade de guanilidrazonas frente em específico a linhagens de glioblastoma. Como por exemplo, no estudo de França et al. (2016), o qual foi realizado ensaios com modelos pré-clínicos de tumores. Os compostos guanilidrazônicos foram preparados através de uma reação de aril aldeído apropriado com cloridrato de aminoguanidina. As linhagens utilizadas foram HCT-8 (carcinoma do cólon), MDA-MB-435 (melanoma) e SF-295 (glioblastoma), onde os derivados de guanilidrazonas foram expostos por 72 horas e a inibição do crescimento das células tumorais foi aferida através do ensaio colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT).

No estudo de França et al. (2016) foi utilizado como controle positivo a Doxorubicina e as células foram tratadas com os derivados por 72 horas. Os derivados que apresentaram melhores atividades no estudo, foram o LQM 17, sendo o análogo de 3,4-dicloro dissustituído, com 100% de inibição das 3 linhagens de células tumorais nas concentrações testadas, a $5 \mu\text{mol L}^{-1}$; o LQM 14, no qual ocorreu a introdução de um segundo anel fenil na posição *para*, o que deixou o derivado mais potente, possuindo um caráter mais lipofílico. Além disso, o LQM 10 foi um dos mais promissores, pois a presença dos volumosos grupos *terc-butila* aumentaram o caráter lipofílico da molécula, resultando no composto mais ativo da série.

No mesmo estudo, em relação aos derivados frente as linhagens celulares, pode-se perceber que o derivado LQM 10 apresenta toxicidade para células não tumorais, porque só é capaz de diminuir a viabilidade celular em alta concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, em relação a CI_{50} , frente a melanoma foi de $3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (inibição de crescimento celular de 92,6%), frente a carcinoma de cólon foi de $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ (inibição de crescimento celular de 97,2%) e frente a glioblastoma foi de $3,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ (inibição de crescimento celular de 97,8%). Os derivados LQM 14 e 17 mostraram maior citotoxicidade para células não tumorais (macrófagos J774.A), uma vez que reduziram a viabilidade celular em todas as concentrações testadas ($10, 100$ e $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo os dois capazes de inibir o crescimento em 100% nas três linhagens celulares nas 3 concentrações anteriores (FRANÇA et al., 2016).

As modificações realizadas nos sete derivados, possibilitaram um incremento na atividade citotóxica, quando comparado aos controles utilizados (DMSO 0,2% e TMZ) e ao protótipo LQM 14, sendo capazes de reduzir a atividade metabólica mitocondrial e a quantidade de células tumorais viáveis após 48 horas dos tratamentos. Em relação a

concentração citotóxica frente a GBM (CC₅₀), o melhor derivado foi o LQM 240, com CC₅₀ de 4,15 µM, ficando atrás apenas do protótipo LQM 14, que confirmou a CC₅₀ já observada no estudo de França et al. (2016). Todos os derivados da série apresentaram CC₅₀ entre 4,15 e 22,74 µM, sendo que o derivado LQM 244 apresentou uma CC₅₀ de 22,74 µM; e o LQM 242 com CC₅₀ > 100.

Em relação ao efeito máximo, o qual determina o efeito até a máxima concentração testada relacionado a atividade dos derivados, os que apresentaram os maiores efeitos foram LQM 245 (78,14%), seguido do LQM 240 (75,26%) e do LQM 244 (74,86%), observando-se assim um efeito melhor do que o protótipo LQM 14 (71,98%). O composto que apresentou um menor efeito máximo foi o LQM 242, com 42,92%. Com isso, pode-se perceber que os derivados mantem o efeito máximo estatisticamente iguais.

O derivado que apresentou melhor atividade nesse ensaio foi o LQM 240, o qual possui uma imina (-C=N-) na posição R. Na literatura, as iminas são relacionadas a diversas atividades, sendo a antitumoral também relatada (ANSARI et al., 2009). Nesse estudo, observou-se que essa classe conseguiu induzir a apoptose em células da linhagem de câncer de mama (MCF-7), com valores de CI₅₀ entre 11 e 40 µM.

No estudo conduzido por Arantes (2014), os derivados de iminas que obtiveram melhores resultados, apresentaram uma CI₅₀ entre 0,25 e 58,61 µg/mL, comprovando mais uma vez a atividade antitumoral desse grupo.

No tratamento do câncer, é comum que os fármacos quimioterápicos apresentem efeitos colaterais, por vezes incômodos e que podem atrapalhar a terapia oferecida, por isso, fármacos que apresentem poucos efeitos e que no caso do glioblastoma humano, também ofereça um tratamento curativo, se fazem necessários (VARDY et al., 2022). A busca por fármacos que atuem apenas em células tumorais e que interajam com as células normais sem danificá-las é necessária, pois além de diminuir os riscos da utilização desses medicamentos, garantem uma melhor continuidade da quimioterapia.

O índice de seletividade serve para avaliar o quanto o derivado é seletivo para células de glioblastoma humano (GBM02) em comparação com as células normais, utilizando a concentração citotóxica em 50% das células e a concentração inibitória em 50% das células. Este índice é importante pois determina os fármacos que possuem ação especificamente nas células tumorais, e com essa característica, esses fármacos apresentam efeitos colaterais reduzidos. Para se obter um derivado seletivo, é necessário

que seu índice de seletividade seja maior que 10, sendo quanto maior, mais seletivo para células tumorais é o derivado (KANER et al., 2016).

Em relação ao presente estudo, não foi possível calcular precisamente o valor do índice de seletividade das amostras, pois na concentração máxima testada, que foi de 100 μM , não houve inibição em 50% das células sanguíneas, indicando que a concentração citotóxica em 50% das células é maior que a concentração testada. Pode-se notar que em relação aos derivados LQM 14 (>51,54), LQM 240 (>28,24) e LQM 243 (>24,09) demonstraram alta seletividade para as células de glioblastoma GBM02 do que para as células mononucleares sanguíneas.

No estudo realizado por Al-Janabi et al. (2022), pode-se observar que uma série de 4-oxotiazolidin-5-ilideno acetato contendo fração de guanilidrazona apresentou seletividade contra a linhagem de células humanas saudáveis. Isso é completamente desejado e mostra que esses compostos podem ser desenvolvidos como candidatos a drogas anticancerígenas. Os resultados CI_{50} para compostos contra linhagem celular saudável humana variaram de 90,68 a 58,69 μM .

No desenvolvimento e progressão do câncer, a invasão e a metástase ocorrem quando as células tumorais se disseminam do tumor primário, espalhando-se pelos sistemas circulatório e linfático, invadem as membranas basais e as paredes endoteliais e finalmente colonizam órgãos distantes (PIJUAN et al., 2019). A migração, invasão e adesão celular são etapas fundamentais neste processo, e o seu estudo e compreensão são cruciais para combater a doença. Além disso, o movimento das células cancerígenas para os órgãos periféricos e sua destruição resultante, constituem a principal causa de morbidade e mortalidade associadas ao câncer (XU et al., 2018).

As células cancerosas utilizam diferentes estratégias de movimento de migração, podendo migrar individualmente ou coletivamente. A migração celular individual é mediada pela atividade do citoesqueleto sem interações célula-célula com células vizinhas, e tem sido relatada como importante em muitos processos fisiológicos *in vivo*, como nos estágios iniciais de invasão em processo metastático (PIJUAN et al., 2019).

A migração mesenquimal envolve integrinas e proteases que degradam a matriz, enquanto as caderinas e a comunicação célula-célula são menos relevantes neste processo. Na migração ameboide, típica de linfócitos e algumas células tumorais as interações com o substrato são fracas (PIJUAN et al., 2019).

Em contraste, a migração celular coletiva ocorre com um grupo de células coesas que retêm as junções célula-célula e coordenam a atividade do citoesqueleto entre as células vizinhas, bem como com o tecido circundante. Ele pode manter a estrutura tecidual intacta e contínua enquanto a remodela, gerando forças de tração e protrusão necessárias para a migração. O movimento coletivo permite que as células móveis carreguem outros tipos de células imóveis, fazendo com que as células migratórias influenciem umas às outras, garantindo assim a distribuição celular adequada e a modelagem tecidual (BOEKHORST et al., 2016).

Em relação ao câncer, a migração descontrolada é considerada uma das principais causas de metástase, onde células neoplásicas realizam a transição epitelial – mesenquimal (que confere características de células mesenquimais, possuindo uma maior capacidade de movimento e invasão) e saem de seu local de origem, colonizando tecidos e órgãos à distância (PARREIRA, 2018).

A migração de células mesenquimais é resultado de reações que ocorrem no interior da célula, sendo que ela não é capaz de se dividir quando ocorre esse processo. Para que a célula entre no processo de migração, é preciso que se tenha gradientes de proteínas especializadas, as pequenas Rho-GTPases, das quais a proteína RAC e a proteína Rho são membros importantes. Nesse fenótipo migratório ocorre concentração de RAC e de Rho, sendo ativados e com gasto energético (ATP) para movimentar as proteínas, utilizando-se de transporte por meio dos microtúbulos. Quanto mais fácil for para a célula o transporte destas proteínas, mais fácil será para a célula migrar, sendo interessante então que microtúbulos e as fibras de acto-miosina disponham-se no interior da célula preferencialmente nesse eixo (ROGNONI et al., 2018).

O ambiente criado na célula pela concentração e acúmulo de proteínas adequadas, torna possível essa migração. Os monômeros de actina polimerizam, formam fibras, e as pontas dos monômeros são aumentadas, mas na ponta oposta a actina é liberada, voltando a ser monômero. As fibras são orientadas devido ao acúmulo das proteínas adequadas há uma direção preferencial (ALMEIDA, 2021).

No entanto, estas fibras se ramificam, formando um ângulo de 74 graus, devido à forma das proteínas que possibilitam a ramificação e de como elas se conectam com a fibra original. Essa ramificação contínua gera uma rede de fibras de actina que, empurram a membrana celular para frente. O resultado disto é uma protrusão da membrana, onde é denominada de lamelipódio. Concomitantemente com a protrusão,

complexos proteicos transmembrânicos se criam e maturam, conectando-se à matriz extracelular e às fibras de actina, ancorando a rede de actina ao substrato. Esses pontos de adesão não se movem em relação às fibras ou ao substrato, mas a constante polimerização das fibras na frente da célula e a desmontagem das fibras nas pontas opostas faz com que, em relação ao centro de massa da célula, os pontos de adesão se movam, fazendo com que a célula migre (ALMEIDA, 2021).

O ensaio realizado para se avaliar essa atividade migratória foi o *Scratch*, onde após a realização dos cálculos de seletividade, os compostos que apresentaram melhores resultados nos testes realizados anteriormente, foram selecionados para essa avaliação.

O ensaio de migração se baseia na criação de um *gap* artificial, denominado “scratch”, em uma monocamada de células confluentes. As células na borda do *gap* recém-criado tendem a ser mover em direção à abertura para fechar o “scratch” até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos novamente. Os resultados são estabelecidos através da comparação das imagens para determinar a taxa de migração celular (COMIER et al., 2015).

Através do ensaio, pode-se observar que todos os derivados da série apresentaram atividade antimigratória, sendo a diminuição no percentual de migração, na concentração de 1 μ M, que foi utilizada por ser a concentração na qual é metade da CI_{50} , pois nesse ensaio o objetivo não era a morte celular, mas o efeito migratório das células; de 88,09% para o derivado LQM 14, para o LQM 240 de 86,54%, LQM 241 de 79,30% e LQM 243 de 74,08%. Já o TMZ não inibiu significativamente migração de GBM02 após transcorrido o mesmo período.

Em relação ao efeito antimigratório, na literatura não é possível encontrar ensaios voltados a essa atividade a guanilidrazonas em específico, porém quando remetido as hidrazonas, pode-se encontrar diversos trabalhos, entre eles o realizado por Aneja et al. (2019), no qual sintetizou uma série de isatina-triazol hidrazonas e através dos resultados de migração celular, foi possível observar uma clara inibição na taxa de migração após tratamento com o composto 9g em células de câncer de mama (MCF-7) e câncer de fígado (HepG2). Foi possível observar que as células de controle migraram para preencher a área de risco mais rapidamente em comparação com as células tratadas.

No estudo realizado por Li et al. (2020), uma série de novos derivados de pteridinona possuindo uma hidrazona foi sintetizada. O ensaio de migração foi realizado

frente a células de câncer de cólon (HCT116), onde foram utilizadas as concentrações do composto L19 de 0,3 μM e 3 μM respectivamente. Comparado com o grupo controle, a taxa de migração diminuiu com o aumento do tempo de ação e L19 inibiram significativamente a migração em uma maneira dependente da concentração.

No artigo de Han et al. (2020), é abordado que as hidrazonas possuem diversas evidências de atividade anticâncer, sendo importantes farmacóforos na área de design de novas moléculas, pois esses grupos se ligam prontamente a várias enzimas e receptores por meio de interações de ligações de hidrogênio. A partir desses dados, os autores realizaram uma síntese de novos derivados de 2,4-dimorfolinotieno[3,2-d]pirimidina e frações hidrazona e aril hidrazida. Pode-se observar que o composto que melhor apresentou efeito na migração frente a células de câncer de cólon (HCT116), foi o 18b que nas concentrações indicadas (0; 0,333 e 3 μM) suprimiu marcadamente a migração em concentração dependente.

Todos os estudos condizem e corroboram com os resultados encontrados, provando-se assim pela literatura que as guanilidrazonas, que são estruturas derivadas das hidrazonas, possuem atividade antimigratória frente a células tumorais. Esse efeito é desejado principalmente, pois uma das características de malignidade dos glioblastomas, é a sua elevada taxa de migração. Com a diminuição no efeito migratório, pode-se ter uma diminuição no potencial metastático do câncer, melhorando assim o seu tratamento, visto que o ataque terapêutico será direcionado apenas ao tumor primário.

A avaliação do efeito dos derivados sobre a morfologia de GBM02, foi realizado após os ensaios de proliferação e migração, onde se teve como objetivo conhecer as principais alterações morfológicas causadas pelos derivados, traçando assim uma linha de início para possível mecanismo de ação das moléculas sobre as células de glioblastoma. Escolheu-se para o teste, o derivado que melhor apresentou CI_{50} na avaliação do efeito antitumoral das guanilidrazonas sobre GBM02 (LQM 240), além do derivado protótipo da série (LQM 14). Como controle positivo foi utilizado o TMZ na concentração de 100 μM e como controle negativo DMSO 0,2%.

Pode-se perceber que os derivados apresentaram redução no número de GBM02, confirmando assim sua capacidade de induzir a morte das células tumorais. A morfologia característica do glioblastoma é a aparência de células alongadas com aspecto fibroblástico de forma poligonal, mostrando características astrocitárias de

aspectos fibrosos, podendo também se apresentarem arredondadas ou amorfas, sendo essa característica importante no seu processo de proliferação e migração celular (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008; HOLANDA-AFONSO, 2011). O TMZ, não induziu mudanças morfológicas perceptíveis em microscopia ótica. Já em relação aos derivados LQM 14 e LQM 240, foi observável a perda do conteúdo citoplasmático, com rompimento e extravasamento de membrana celular, sendo sugestivo de indução de necrose.

As principais características das células que passam pelo processo de necrose, que é a morte celular seguida de autólise (autodestruição celular), são núcleo menor que o normal, picnose celular, fragmentação do núcleo (cariorrexe), alterações no citoplasma com ruptura da membrana interna e externa (FILHO, 2022). Pode-se perceber pelos resultados, que são sugestivos para necrose, porém são necessários novos testes para confirmação do tipo de morte celular.

Em relação aos dois derivados LQM 240 e 243, que apresentaram melhores resultados nos testes realizados, pode-se compará-los com o protótipo LQM 14, que tem como substituinte um b-fenil, que é um anel aromático ligado a outro aromático. No LQM 240 é conservado um anel aromático e o outro é substituído por uma pirrolidina, que é um composto cíclico não derivado, sendo o ciclo menor mais ativo, e essa estrutura pode ser relacionada a descoberta de novos protótipos antitumorais (LI et al., 2016; QIN et al., 2017; TAHA et al., 2017). No derivado LQM 243, o benzeno que também aparece no LQM 14 é conservado, só que este substituinte ligado ao primeiro aromático, é um substituinte mais volumoso, a difenilamina, que tem uma característica mais lipofílica, podendo ser relacionada ao efeito de seletividade e a potência, a qual também possui efeitos antitumorais comprovados na literatura (JAIN et al., 2016; DADASHPOUR; EMANI, 2018).

No LQM 242 o substituinte ligado ao aromático é o morfolina, que é uma amina acíclica, no qual pode ser que a presença do heteroátomo, que influencia fatores como a eletronegatividade, além disso, ele tem tendência em fazer ligações de hidrogênio e possivelmente este detalhe seja responsável pela alteração na atividade do derivado.

No presente trabalho, pode-se observar que os derivados guanilidrazônicos, inibiram de forma eficazmente a viabilidade de GBM02, além disso, esses derivados se apresentaram mais seletivos a essas células quando realizado o ensaio de citotoxicidade em monócitos e linfócitos. Os derivados LQM 14, 240, 241 e 243 apresentaram

atividade antimigratória sobre GBM02. Diante dos resultados obtidos, é possível afirmar que essa série de derivados guanilidrazônicos, são importantes protótipos candidatos a fármacos antineoplásicos, principalmente frente a células da linhagem de GBM02.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que todos os derivados da série de guanilidrazonas apresentaram atividade antitumoral frente a linhagem de GBM02 nos ensaios realizados *in vitro*.

Os principais derivados que apresentaram atividade citotóxica seletiva para células de GBM02, além de não se apresentarem citotóxicos para células normais e influenciarem na diminuição da migração das células neoplásicas, foram além do protótipo LQM 14, o LQM 240 e LQM 243. O LQM 14 e LQM 240 também geraram alterações morfológicas em GBM02.

Com isso, para novas perspectivas dessa série, sugere-se que esses derivados sejam avaliados quanto a sua atividade para especificação da morte celular, entre outros, a fim de se tornarem futuras opções para o tratamento curativo desse tipo de tumor.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9ª Edição. Elsevier, 2019.
- AL-JANABI, I. et al. Antiproliferative activity and molecular docking studies of new 4-oxothiazolidin-5-ylidene acetate derivatives containing guanylhydrazone moiety. **Journal of Molecular Structure**. V. 1258, p. 1 – 13, 2022. DOI: doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132627
- ALMEIDA, R.M.C. Fenômenos estocásticos em migração celular: teoria, experimentos e simulações. **Rev. Bras. Ensino Física**, v.43, n.1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9126-RBEF-2020-0400>
- ANDREANI, A. et al. Potential antitumor agents. Part 29: synthesis and potential coanthracyclinic activity of imidazole [2,1-b]thiazole guanylhydrazones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 2359-2366, 2000.
- ANDREANI, A., et al. Potential Antitumor Agents. 37.1 Synthesis and Antitumor Activity of Guanylhydrazones from Imidazo[2,1-b]thiazoles and from the New Heterocyclic System Thiazolo[2',3':2,3]imidazo[4,5-c]quinoline. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 48, p. 3085-3089, 2005.
- ANEJA, B., et al. Design and development of Isatin-triazole hydrazones as potential inhibitors of microtubule affinity-regulating kinase 4 for the therapeutic management of cell proliferation and metastasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 163, n. 1, 2019. DOI: doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.026
- ANSARI, K. I.; KASIRI, S.; GRANT, J. D.; MANDAL, S. S. Apoptosis and anti-tumour activities of manganese(III)-salen and -salphen complexes. **Dalton Trans**. V. 40, p. 8525, 2009.
- ALMEIDA, M.L.M., et al. The importance of MGMT Promoter Methylation Status for Glioblastomas Prognosis: meta-analysis. **Jornal brasileiro de neurocirurgia**, v.29, n.4, p. 595-611, 2019.
- ARANTES, L.M. **Síntese de bis-iminas e bis-aminas funcionalizadas e avaliação de suas atividades contra células de câncer, fungos e como antioxidantes**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química, 2014.
- BALÇA-SILVA, J. et al. The expression of connexins and SOX2 reflects the plasticity of glioma stem-like cells. **Translational Oncology**, p. 555–569, 2017.
- BATASH, R., et al. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and treatment; recente literature review. **Current Medicinal Chemistry**, n. 24, p. 3002-3009, 2017.
- BELTER, A. et al. Revealing the epigenetic effect of temozolomide on glioblastoma cell lines in therapeutic conditions. **PLOS ONE**, v.15, n. 2, 2020. DOI: [10.1371/journal.pone.0229534](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229534)

BOEKHORST, V., PREZIOSI, L., AND FRIEDL, P. Plasticity of cell migration *in vivo* and *in silico*. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 32, p. 491–526, 2016. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125201

BORGES, M.N.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. NMR interaction studies of aromatic guanylhydrazones with micelles: model for mechanism of action of cationic antibiotics. **Biopolymers**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**, 3^a. ed. – Brasília, Ministério da Saúde, 2019.

BROEKMAN, M.L., et al. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. **Nature reviews neurology**, n. 14, p. 482-495, 2018.

CARMINATE, B.C. et al. Detecção precoce do câncer de pele na atenção básica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n.9, 2021.

CBTRUS. Central brain tumor registry of the United States. **North American Association of Central Cancer Registries**. Disponível em: <http://www.cbtrus.org>. Acessado em: 03 de Junho de 2021.

CHEN, R., SMITH-COHN, M., COHEN, A.L., COLMAN, H. Glioma subclassifications and their clinical significance. **Neurotherapeutics**, n. 14, p. 284-297, 2017.

COLLOTA, F. et al., Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p.1073-1081, 2009.

COMIER, et al. Optimization of the wound scratch assay to detect changes in murine mesenchymal stromal cell migration after damage by soluble cigarette smoke extract. **J Vis Exp**, n. 106, 2015. DOI: 10.3791/53414.

COSTA, L.S., et al. Fatores de risco relacionados ao câncer de mama e a importância da detecção precoce para a saúde da mulher. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 31, p.1-8, 2021.

CROCETTI, E. et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. **European Journal of Cancer**, v. 48, p. 1532 – 1542, 2012.

DA SILVA, R.F.M. A eficácia da técnica pet/ct na determinação precoce do câncer: uma revisão integrativa da literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n.7, 2021.

DADASHPOUR, S.; EMAMI, S. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 9–29, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.065>>.

DAVIS, M.E. Glioblastoma: overview of disease and treatment. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v.5, n. 20, p. s2-s8, 2016.

DIAS, A.F. **Avaliação do potencial antitumoral do bozepinib livre ou em nanocápsulas em ensaios pré-clínicos de glioblastoma**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em ciências biológicas: bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.

EKELUND, S.; NYGREN, P.; LARSSON, R. Guanidino-containing drugs in cancer chemotherapy: Biochemical and clinical pharmacology. **Biochemical Pharmacology**, v.61, n. 10, p. 1183-1193, 2001.

FAKHOURY, M. Drug delivery approaches for the treatment of glioblastoma multiforme. *Artificial Cells*, **Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, p. 1365 – 1373, 2016.

FERNANDES, C., et al. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy, In: VLEESCHOUWER, S.D. **Glioblastoma**. Codon Publications, 1ª ed., p. 197-241, 2017.

FILHO, G.B. **Bogliolo Patologia**. 10ª ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1592p, 2022.

FONSECA, P., VARDAKI, I., OCCHIONERO, A., PANARETAKIS, T. Metabolic and signaling functions of cancer cell-derived extracellular vesicles. **International Review of Cell and Molecular Biology**., n. 326, p. 175–199, 2016.

FRANÇA, P.H.B. et al. Preliminary in vitro evaluation of the anti-proliferative activity of guanylhydrazone derivates. **Acta Pharmaceutica**, v. 66, n. 1, p. 129-137, 2016.

FREITAS, T. A. **Análise de processos celulares em linhagens de GBM tratadas com complexos de rutênio associados a AINEs e seu impacto na via de eicosanoides**. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2017.

GUERRA, M.R. et al. Magnitude e variação da carga da mortalidade por câncer no Brasil e Unidades da Federação, 1990 e 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. 1, p. 102-119, 2017.

GOLDBECKER, A. et al. Hepatic encephalopathy after treatment with temozolomide. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 103, p. 163 – 166, 2011.

GOLDEN, E. B.; APETOH, L. Radiotherapy and immunogenic cell death. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 25, p. 11 – 17, 2015.

GU L, LI H, CHEN L, MA X, LI X, GAO Y, ZHANG Y, XIE Y, ZHANG X. Prognostic role of lymphocyte to monocyte ratio for patients with cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**. v.7, n.22, p. 31926-42, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.7876. PMID: 26942464; PMCID: PMC5077986.

HAASE, S., GARCIA-FABIANI, M.B., CARNEY, S., et al. Mutant ATRX: uncovering a new therapeutic target for glioma. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. v. 22, p. 599-613, 2018.

HAN, Y., et al. Design, synthesis and biological evaluation of thieno[3,2-d]pyrimidine derivatives containing aroyl hydrazone or aryl hydrazide moieties for PI3K and mTOR dual inhibition, **Bioorganic Chemistry**, v.104, 2020, DOI: doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104197.

HANIF, F. et al. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3-9, 2017.

HAN H., et al. Polysaccharide fraction isolated from the leaves of *Hordeum vulgare* L. protects against colonic inflammation of systemic immune responses. **Journal of Functional Foods**, v. 87, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104765>.

HEIMFARTH L., et al. Indole-3-guanylhydrazone hydrochloride mitigates long-term cognitive impairment in a neonatal sepsis model with involvement of MAPK and NFκB pathways. **Neurochemistry International**, v. 134, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104647>.

HOLANDA-AFONSO, R.C. **Caracterização de células-tronco tumorais em glioblastoma humano**. Dissertação (Mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina - Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, 2011.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **O que é câncer?**. Ministério da Saúde, 2020a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acessado em: 02 de Junho de 2021.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estatísticas de câncer**. Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acessado em: 02 de Junho de 2021.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Tratamento**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tratamento>. Acessado em: 02 de Junho de 2021.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Câncer do sistema nervoso central**, Brasil. Informações da Coordenação de prevenção e vigilância, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central>

JAIN, S. et al. Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.10.009>.

JESUS, L.G. et al. Repercussões orais de drogas antineoplásicas: uma revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia – UPF**, v. 21, n. 130-135, 2016.

JIGISHA, P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 23, p. 1985 – 1986, 2014.

JINX., XU H., MCGRATH, M.S. Inhibition of HIV Expression and Integration in Macrophages by Methylglyoxal-Bis-Guanylhydrazone. *Journal of Virology*, v. 89, n. 22, p. 11176-89, 2015.

JINX., XU H., MCGRATH, M.S. Methylglyoxal-bis-guanylhydrazone inhibits osteopontin expression and differentiation in cultured human monocytes. *PLoS One*. V.13, N.3, 2018.

KANER, R. A. et al. Anticancer metallohelicenes: nanomolar potency and high selectivity. *Chemical Science*, v. 7, p. 951 – 958, 2016.

KANZAWA, T., BEDWELL, J., KONDO, Y., et al. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *Journal of Neurosurgery*, v. 99, n. 6, p. 1047-52, 2003.

Karachi, A., et al Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma, *Neuro-Oncology*, v. 20, n 12, p.1566-72, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy072>

KIM, S. S. et al. Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood-brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: The promise of nanomedicine. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. v. 468, p. 485 – 489, 2015.

KIM S.H., et al. Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 216, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113293>.

KUMAR, N.; DRABU, S.; KUMARI, S. Synthesis and pharmacological screening of 4, 6-substituted di-(phenyl) pyrimidin-2-amines. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 10, n. 1, Pages S877-S880, 2017.

LAI, C. P. et al. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS Nano*, n. 8, p. 483–494, 2014.

LANGE, U.E.W., BAUCKE, D., HORNBERGER, W., MACK H., SEITZ, W., HÖFFKEN H. W. D-Phe-Pro-Arg type thrombin inhibitors: unexpected selectivity by modification of the P1 moiety, *Bioorg. Med. Chem. Lett* . v. 13, p. 2029–2033, 2003. DOI: 10.1016/S0960-894X(03)00347-0.

LI, Z., et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel pteridinone derivatives possessing a hydrazone moiety as potent PLK1 inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 30, n. 16, 2020. DOI: doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127329.

LI, S. W. et al. Design and optimization of (3-aryl-1H-indazol-yl)spiro[cyclopropane 1,3'- indolin]-2'-ones as potent PLK4 inhibitors with oral antitumor efficacy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 26, n. 19, p. 4625–4630, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.063>>.

LOMBARDI, M.Y., ASSEM, M. Glioblastoma Genomics: A Very Complicated Story. In: VLEESCHOUWER, S.D. **Glioblastoma**. Codon Publications, 1^a ed., p. 3-25, 2017.

LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVANEE, W.K.; editors. WHO **classification of tumors of the central nervous system**. 4th ed. Vol. 1. Lyon: IARC Press; 2007.

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

LYANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329 – 333, 2007.

LUCINO, M.B.S. Glioblastoma recidivante em medula espinal: um relato de caso. **Brazilian Journal of Development**. v.7, n.10, 2021.

MAAS, S. L., BREAKEFIELD, X. O., WEAVER, A. M. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles. **Trends Cell Biology**., n. 27, p. 172–188, 2017.

MALEBARY, S.J. et al. ProtoPred: Advancing Oncological Research Through Identification of ProtoOncogene Proteins, *IEEE Access*, vol. 9, p. 68788-68797, 2021.

MARTINS, T.L.C. **Síntese de guanilidrazonas, atividade antibiótica e estudos de interação com DNA por RMN**. Tese de doutorado, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2004.

MCKINNON, C., et al. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. **BMJ**, v. 374, n. 1560, 2021.

MENEZES, L.M., et al. Prospecção de candidatos a fármacos para tratamento de tumores malignos. **Revista Multidisciplinar De Educação E Meio Ambiente**, v. 2, n.1, 2021.

MILLS, C.C., et al., Development of chemotherapy with cell cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy. **Cancer Research**, v. 78, n.2, p.320-325, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAGASAWA, D.T., et al., Temozolomide and Other Potential Agents for the Treatment of Glioblastoma Multiforme. **Neurosurgery Clinics of North America**, n. 23, p. 307–322, 2012.

NAKADA, M., KITA, D., WATANABE, T., et al. Aberrant signaling pathways in glioma. **Cancers**, n. 3, p. 3242-3278, 2011.

NELSON, S.J., CHA S. Imaging glioblastoma multiforme. **The Cancer Journal.**, v. 9, n. 2, p. 134-145, 2003.

NISHIJIMA, T. F. et al. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, p. 971 – 978, 2015.

OMURO, A., DEANGELIS, L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **Journal of the American Medical Association**, v. 17, n. 310, p. 1842-50, 2013.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010 – 2014. **NeuroOncology**, v. 19, n. 5, p. 1 – 88, 2017.

PANETTA, J.C., KIRSTEIN, M.N., GAJJAR, A., et al. Population pharmacokinetics of temozolomide and metabolites in infants and children with primary central nervous system tumors. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 52, n. 6, p. 435-441, 2003.

PARREIRA, R.C. Identificando o mecanismo que leva a migração celular e metástase. **Bio&Tecnologia**, v. 5, n. 6, 2018. DOI: [dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2018.02.01.002](https://doi.org/10.15729/nanocellnews.2018.02.01.002)

PIJUAN, J. et al. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. **Front. Cell Dev. Biol.**, v.14, 2019. DOI: doi.org/10.3389/fcell.2019.00107

QIN, M. Z. et al. Identification of hydrazone moiety-bearing aminopyrimidines as potent antitumor agents with selective inhibition of gefitinib-resistant H1975 cancer cells. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 5, p. 991–994, 2017.

RAMAKRISHNAN, A.; CHOURASIYA, S.S.; BHARATAM, P.V. Azine or hydrazone? The dilemma in amidinohydrazones. **RSC Advances**, v. 5, n. 69, p.55938-55947, 2015.

RODRIGUES, E.E.S. **Planejamento e síntese de Aril-guanilidrazonas p-substituídas como potenciais protótipos antitumorais**. Dissertação de Mestrado (Instituto de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Alagoas), 2019.

SANTANA C.C., et al. Evaluation of guanylhydrazone derivatives as inhibitors of *Candida rugosa* digestive lipase: Biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 169-180, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.030>.

SANTOS, A.L. Gliomas, tumores malignos que surgem no sistema nervoso. **Revista Ibero-Americana de Humanidades**, Ciências e Educação, v.7, n.2, 2021.

SANTOS-JÚNIOR, P.F.S. **Síntese e avaliação de arilidrazoimidazóis, arilidrazopirimidínicos e quinolin-4-hidrazotiazolidinas sobre amastigotas de**

leishmania chagasi e potencial antitumoral. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade Federal de Alagoas, 2017.

SHERGALIS, A., et al. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. **Pharmacological Reviews**, n. 70, p. 412–445, 2018.

SILVA, F.P.L. et al. Synthesis and anticancer activities of novel guanylhydrazone and aminoguanidine tetrahydropyran derivaticves. **Molecules**, v.21, n. 6, p. 1-11, 2016.

SINGH N., et al. Mechanisms of temozolamide resistance in glioblastoma – a comprehensive review. **Cancer Drug Resist.**, v. 4, p. 17-43, 2021. DOI: 10.20517/cdr.2020.79.

STOYANOV, G.S., et al. Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic Science to diagnosis and treatment. **Medical Oncology.**, v. 35, n. 27, p. 1-10, 2018.

TAHA, M. et al. Morpholine hydrazone scaffold: Synthesis, anticancer activity and docking studies. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 3, p. 607–611, 2017.

TAMIMI, A.F., JUWEID, M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma, In: VLEESCHOUWER, S.D. **Glioblastoma**. Codon Publications, 1^a ed., p. 143-153, 2017.

TAN, A.C., et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. **CA Cancer J Clin.** v. 71, p.299-312, 2020.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 231 – 241, 2008.

TAYLOR, O.G., et al. Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets. **Frontiers in Oncology**, v. 96, p. 1-11, 2019.

THURINGER, D. et al. Transfer of functional microRNAs between glioblastoma and microvascular endothelial cells through gap junctions. **Oncotarget**, p. 73925–73934, 2016.

TOMAR MS, et al. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1876, n. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188616>.

UDDIN, S., et al. Neurologic Manifestations of Glioblastoma Multiforme. **Medspace**, p. 1-14, 2020.

ULMER, A. J. et al. Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on percoll. **Immunobiology**, v. 166, p. 238 – 250, 1984.

- VARDY, J.L., LIEW, A., WARBY, A. et al. On the receiving end: have patient perceptions of the side-effects of cancer chemotherapy changed since the twentieth century?. **Support Care Cancer**, v. 30, p. 3503-3512, 2022.
- VILLANO, J.L., SEERY, T.E., BRESSLER, LR. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, n. 64, p. 647-655, 2009.
- YANG, H., YE, D., GUAN, K.L., XIONG, Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. **Clinical Cancer Research**, n. 18, p. 5562-5571, 2012.
- YAN, H., FRIEDMAN, A., REARDON, D., HERNDON, J. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **New England Journal of Medicine**, n. 360, p. 765-773, 2009.
- YAO, C. X. et al. Clinical effect of intensity modulated radiation therapy combined with concomitant and adjuvant temozolomide in the treatment for malignant glioma. **China Cancer Journal**, v. 22, p. 238 – 240, 2013.
- YAVUS, S.Ç., AKKOÇ, S., SARIPINAR, EM. The cytotoxic activities of imidazole derivatives prepared from various guanylhydrazone and phenylglyoxal monohydrate. **Synthetic Communications**, v.49, n. 22, p. 3198-3209, 2019.
- YOVINO, S., & GROSSMAN, S. A. Severity, etiology and possible consequences of treatment-related lymphopenia in patients with newly diagnosed high-grade gliomas. **CNS oncology**, v.1, n. 2, p. 149–154, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2217/cns.12.14>
- WANG, X., CHEN, J.X., LIU, J.P., et al. Gain of function of mutant TP53 in glioblastoma: prognosis and response to temozolomide. **Annals of Surgical Oncology**. n. 21, p. 1337-1344, 2014.
- WANG, X. et al. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resist**, n.2, p. 141-60, 2019. DOI: 10.20517/cdr.2019.10
- WICK, W., et al. Treatment of glioblastoma in adults. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**. V. 11, n. 1, p. 1-13, 2018.
- WEIL, S. et al. Tumor microtubes convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. **Neuro Oncology**. n. 19, p. 1316–1326, 2017.
- WESOLOWSKI, J. R.; RAJDEV, P.; MUKHERJI, S. K. Temozolamide (temodar). **American Journal of Neuroradiology**, v. 31, p. 1383 – 1384, 2010.
- XU, L., GORDON, R., FARMER, R., PATTANAYAK, A., BINKOWSKI, A., HUANG, X., et al. (2018). Precision therapeutic targeting of human cancer cell motility. **Nat Commun**. V. 9, n.24, p. 2454, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-04465-5
- ZHEN, L. et al. Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature. **Journal of Neuro-oncology**, v. 99, p. 165 – 176, 2010.

