

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA –
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

Mariany Lopes da Costa Folly

**Avaliação do Efeito Antitumoral de Derivados de Quinazolininas em Células de
Glioblastoma.**

Governador Valadares

2024

Mariany Lopes da Costa Folly

Avaliação do Efeito Antitumoral de Derivados de Quinazolininas em Células de Glioblastoma.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora – *Campus* Governador Valadares para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof.(a) Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

Coorientador: Prof. Dr. João Eustáquio Antunes

Governador Valadares

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lopes da Costa Folly, Mariany.
Avaliação do Efeito Antitumoral de Derivados de Quinazolininas em Células de Glioblastoma. / Mariany Lopes da Costa Folly. -- 2024. 109 f.

Orientadora: Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes
Coorientador: João Eustáquio Antunes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

1. Câncer. 2. Glioblastoma multiforme. 3. Quinazolininas. I. Bueno de Moura Pereira Antunes, Michelle, orient. II. Eustáquio Antunes, João, coorient. III. Título.

Mariany Lopes da Costa Folly

Avaliação do Efeito Antitumoral de Derivados de Quinazolininas em Células de Glioblastoma

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 16 de agosto de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. David Henrique Rodrigues

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima

Universidade do Vale do Rio Doce

Prof. Dr. Caio Cesar de Souza Alves

Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri

Juiz de Fora, 14/08/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes, Professor(a)**, em 16/08/2024, às 18:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucia Alves de Oliveira Fraga, Professor(a)**, em 16/08/2024, às 19:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Calo César de Souza Alves, Usuário Externo**, em 16/08/2024, às 23:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **David Henrique Rodrigues, Professor(a)**, em 19/08/2024, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Estela de Oliveira Lima, Usuário Externo**, em 20/08/2024, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-U f (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1922596** e o código CRC **51881451**.

*A aqueles que eu dedicarei toda e qualquer conquista,
meus filhos: Helena e Pedro*

AGRADECIMENTOS

Foi um longo caminho até aqui, um caminho repleto de surpresas e muito aprendizado! E dentre o tanto que aprendi uma lição importante é que sozinho não chegamos a lugar nenhum e que dentre os muitos sentimentos que sinto nesse momento, a gratidão sem dúvida é o maior deles.

Inicio agradecendo a Deus sempre, a Ele toda honra e toda glória! E também aquela que foi uma das maiores responsáveis pelo sucesso desse trabalho, minha orientadora professora Michelle. Você é luz para as pessoas a sua volta! É uma inspiração de profissional, de mulher e de ser humano! Meu mais sincero agradecimento por todo seu carinho e dedicação a esse trabalho, pelo zelo e paciência ao ensinar cada passo! Poderia escrever parágrafos e ainda assim não seria suficiente para expressar tamanha minha gratidão por tudo. Me senti acolhida em todos os momentos e vou levar essa lição pra vida! Obrigada.

Obrigada ao professor João Antunes pela idealização do projeto, por toda a colaboração e pelos ensinamentos dedicados a mim ao longo do curso. Ao professor Jeferson Gomes por toda disponibilidade, carinho e colaboração de sempre, você mais uma vez foi essencial.

Obrigada a professora Sandra Bertelli da UFVJM pela colaboração nos experimentos de viabilidade celular. A professora Aline Santos da Unicamp por gentilmente nos ceder a linhagem celular U87-MG. A dra Ana Helena pela colaboração nos ensaios de real time.

Meus agradecimentos a UFJF pela oportunidade e à cada um dos professores do PMBQBM que compartilharam comigo seu saber durante esse tempo! Aos professores do setor de microbiologia do DCBV pelo incentivo e compreensão. Ao meu amigo e colega de trabalho Duilio por ser essa pessoa maravilhosa, sempre disposto a ajudar todos a sua volta. Aos alunos de iniciação científica e aos colegas mestrands e doutorands do laboratório 808.

Meu agradecimento pessoal ao meu marido Bruno, obrigada por compartilhar mais que uma vida ao meu lado, por tomar meus sonhos como seus, por todo incentivo, compreensão e ajuda. Aos meus queridos pai e mãe por tudo que fizeram e ainda fazem por mim todos os dias, eu certamente não teria conseguido sem vocês. Obrigada por tanto, pela dedicação carinho e amor de uma vida inteira. Ao meu irmão Marcel pelo carinho e apoio de sempre.

Aos meus sogros Paulinho e Elaine por toda generosidade, incentivo e cuidado com a nossa família, a minha sincera gratidão! A minha querida amiga Juliane por nunca medir esforços pra ajudar, por ser tão necessária e presente nas nossas vidas, pelas diversas vezes que já me salvou e continua salvando, minha eterna gratidão.

E por fim, meu agradecimento aqueles que deram sentido a tudo isso, a fonte e aos donos da minha força e garra: Helena e Pedro! A vinda de vocês foi uma surpresa necessária, nem mesma eu sabia que precisava tanto de vocês. Vocês são a minha maior conquista!

RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor cerebral altamente invasivo e agressivo. Classificado como grau de malignidade 4, é um dos tumores mais letais, com uma média de sobrevida de 10 a 20 meses após o diagnóstico. GBM não responde bem aos tratamentos convencionais, tornando crucial a busca por novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa vem investigando a atividade de moléculas derivadas das quinazolininas, conhecidas por suas propriedades biológicas, como atividade antitumoral, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, ação inibidora de quinases, dentre outras. O objetivo geral desse estudo foi avaliar o efeito antitumoral de KDY23, um derivado quinazolinico, em células de GBM. Foi realizada a síntese orgânica e a caracterização físico-química das moléculas sintetizadas e prosseguiu-se com os ensaios biológicos. Após o tratamento com as moléculas sintetizadas, denominadas KDYs, KDY23 reduziu significativamente a viabilidade das células de GBM em concentrações a partir de 10 μ M, destacando-se como a molécula mais promissora. Por meio de ensaios de *western blotting*, observou-se a expressão das proteínas caspase-3 clivada e PARP clivada nas células tratadas com KDY23, indicando que a molécula promove a morte celular por apoptose. Para entender o mecanismo de ação do KDY23, realizou-se ensaios de qRT-PCR, que demonstraram que a molécula atua na via de sobrevivência e proliferação celular conhecida como via *EGFR-PI3K/AKT1/mTOR*. Os resultados obtidos sugerem que KDY23 pode ser um candidato potencial para o desenvolvimento de novas terapias contra o GBM.

Palavras-chave: Câncer, Glioblastoma, Quinazolininas, Descoberta de Novos Fármacos.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly invasive and aggressive brain tumor. Classified as grade 4 malignancy, it is one of the most lethal tumors, with an average survival of 10 to 20 months after diagnosis. GBM does not respond well to conventional treatments, making the search for new therapeutic approaches crucial. In this context, our research group has been investigating the activity of quinazoline-derived compounds, molecules known for their biological properties, such as antitumor, antihypertensive, anti-inflammatory activity, kinase inhibition, among others. The general objective of this study was to evaluate the antitumor effect of KDY23, a quinazoline derivative, on GBM cells. The organic synthesis and physicochemical characterization of the synthesized molecules were performed, followed by biological assays. After treatment with the synthesized molecules, named KDYs, KDY23 significantly reduced the viability of GBM cells at concentrations starting from 10 μ M, standing out as the most promising molecule. Through western blotting assays, the expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP proteins was observed in the cells treated with KDY23, indicating that the compound promotes cell death by apoptosis. To understand the mechanism of action of KDY23, qRT-PCR assays were performed, revealing that the compound acts on the survival and cell proliferation pathway known as the *EGFR-PI3K/AKT1/mTOR* pathway. The results suggest that KDY23 could be a potential candidate for the development of new therapies against GBM.

Keywords: Cancer, Glioblastoma, Quinazolines, New Drug Discovery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Classificação de GBM segundo o atlas genômico do câncer.....	22
FIGURA 2	Principais vias de sinalização da proliferação celular. As vias PI3K/AKT/mTOR e RAS/RAF/MAPK são mostradas.....	24
FIGURA 3	Mecanismo de ação de agentes terapêuticos sistêmicos padrão para tratamento de glioblastoma multiforme.....	29
FIGURA 4	Estrutura química das quinazolinas.....	34
FIGURA 5	Fluxograma contendo as etapas realizadas neste trabalho....	39
FIGURA 6	Esquema da formação dos derivados quinazolin-4-onas.....	40
FIGURA 7	Esquema com as etapas para a formação de derivados de cloroquinazolinas e aminoquinazolinas.....	40
FIGURA 8	Esquema das estruturas químicas propostas para as moléculas obtidas após a síntese de quinazolinas.....	41
FIGURA 9	Espectros de infravermelho das moléculas sintetizados.....	54
FIGURA 10	Espectros de RMN de ^1H dos precursores e da molécula KDY23.....	56
FIGURA 11	Espectro de RMN ^1H de KDY3 em DMSO d_6 com suas atribuições.....	57
FIGURA 12	Espectro de RMN ^1H de KDY5 em DMSO d_6 com suas atribuições.....	57
FIGURA 13	Espectro de RMN ^1H de KDY6 em DMSO d_6 com suas atribuições.....	58
FIGURA 14	Espectro de RMN ^1H de KDY23 em DMSO d_6 com suas atribuições.....	58
FIGURA 15	Viabilidade celular das células de GBM U87-MG após tratamento com KDYS.....	59
FIGURA 16	Avaliação de dose resposta de KDY23 frente a linhagem U87-MG de GBM (6 horas)	61
FIGURA 17	Avaliação de dose resposta de KDY23 frente a linhagem U87-MG de GBM (12 horas)	61

FIGURA 18	Avaliação de dose resposta de KDY23 frente a linhagem U87-MG de GBM (24 horas)	62
FIGURA 19	Avaliação de dose resposta de KDY23 frente a linhagem T98G de GBM	63
FIGURA 20	Imagens das células T98-G após o tratamento por 24 horas coradas com azul de metileno a 0,5%	64
FIGURA 21	Gráfico de CI_{50} de KDY23 frente as células U87-MG.....	65
FIGURA 22	Gráfico de CI_{50} de KDY23 frente as células T98G.....	66
FIGURA 23	Avaliação da viabilidade celular de U87-MG após tratamento com os precursores de KDY23.....	67
FIGURA 24	Avaliação da viabilidade das células de macrófagos J774.A1 (a) e RAW 264.7 (b) após tratamento com KDY23	71
FIGURA 25	<i>Western blotting</i> das proteínas envolvidas na morte celular por apoptose avaliadas nas células U87-MG após tratamento com KDY23 (10 μ M)	74
FIGURA 26	Análise da qualidade das amostras de RNA total	76
FIGURA 27	Esquema ilustrativo da via <i>EGFR/p13K/AKT/mTOR</i>	77
FIGURA 28	Avaliação da expressão gênica após tratamento das células U87-MG com KDY23	79
FIGURA 29	Via <i>PI3K/AKT/mTOR</i> das células de GBM após tratamento com KDY23 e a possível via alternativa de ativação de <i>mTOR</i>	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Especificações dos anticorpos primários utilizados.....	46
TABELA 2:	Sequência de nucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR.....	49
TABELA 3:	Alguns dados físico-químicos dos precursores utilizados e dos produtos obtidos na síntese.....	51
TABELA 4:	Quantificação RNA total e razão da absorbância A260nm/A280nm.....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3D	Estrutura tridimensional
4E-BP	Proteína de ligação do fator de iniciação da tradução 4E
AKT	AKT serina/treonina quinase 1
ARF	Co-fator de recombinação Erf
BCA	Ácido bicinconínico
BCR	<i>Break Point Region</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CDK	Quinases dependentes de ciclina
CDKN2A	Quinase 2A dependente de ciclina
CI50	Concentração inibitória
CT	<i>Cycle threshold</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOXO	Doxorrubicina
E2F	Supressor de tumor de retinoblastoma
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK1	Quinase 1 regulada por sinal extracelular
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GRB2	Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2
HTS	<i>High-throughput screening</i>
IDH1	Isocitrato desidrogenase (NADP(+)) 1
J774.A1	Linhagem celular de macrófagos murinos
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MEK1/2	Proteína quinase 2 ativada por mitógeno
MGMT	O ₆ -metilguanina DNA metiltransferase
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
MTT	Brometo de dimetiltiazol difeniltetrazólio

NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF1	Gene supressor tumoral neurofibromina 1
NF-κB	Fator nuclear κB
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Poli adenosina difosfato ADP-ribose polimerase
PBGD	<i>Porphobilinogen deaminase</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PDGFR	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfoinositídeo 3 quinase
PI3KR1	Subunidade reguladora 1 da fosfoinositide-3-quinase
pRB	Retinoblastoma supressor de tumor
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
PT53	Proteína tumoral p53
qPCR	Reação polimerase em cadeia em tempo real
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófagos murinos
RICTOR	Proteína resistente à rapamicina do mTOR
RNA	Ácido ribonucléico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Transcriptase reversa
RTQ	Receptores de tirosina quinase
S6K	S6 quinase
SNC	Sistema nervoso central
SOS	<i>Son of sevenless</i>
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TFE	Gene intensificador do fator de transcrição
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
TMZ	Temozolomida
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CÂNCER.....	17
1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME	19
1.3 CLASSIFICAÇÃO DO GLIOBLASTOMA.....	21
1.4 PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR DO GLIOBLASTOMA	23
1.5 TERAPIA ATUAL PARA GLIOBLASTOMA.....	26
1.6 MORTE CELULAR.....	31
1.7 QUINAZOLINAS.....	33
2 JUSTIFICATIVA.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	39
4.2 MATERIAIS.....	39
4.3 SÍNTESE DE NOVAS QUINAZOLINAS.....	39
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	41
4.4.1 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	41
4.4.2 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (¹ H RMN).....	42
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	42
4.5.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CÉLULAR E MARCADORES DE APOPTOSE.....	42
4.5.1.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	42
4.5.1.2 ENSAIO DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE U87-MG APÓS TRATAMENTO COM AS MOLÉCULAS KDY SINTETIZADOS.....	43
4.5.1.3 ENSAIO DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE U87-MG E T98G APÓS TRATAMENTO COM KDY23.....	44
4.5.1.4 ENSAIO DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE RAW 264.7 E J774.A1 APÓS TRATAMENTO COM KDY23.....	44

4.5.1.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	45
4.5.1.6 <i>WESTERN BLOTTING</i>	45
4.5.2 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS U87-MG APÓS TRATAMENTO COM O KDY23.....	46
4.5.2.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	46
4.5.2.2 ELETROFORESE DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL.....	47
4.5.2.3 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL.....	47
4.5.2.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS POR PCR EM TEMPO REAL.....	48
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 DADOS DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DAS MOLÉCULAS OBTIDAS.....	51
6.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER.....	52
6.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H	55
6.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS U87-MG APÓS TRATAMENTO COM KDYs.....	59
6.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOSE-RESPOSTA DE KDY23 NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS U87-MG E T98G DE GLIOBLASTOMA	60
6.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS U87-MG APÓS TRATAMENTO COM OS PRECURSORES DE KDY23	67
6.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE KDY23 NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MACRÓFAGOS CELULARES J774.A1 E RAW 264.7.....	71
6.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE KDY23 NA APOPTOSE DAS CÉLULAS U87-MG.....	73
6.9 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS DE GBM U87-MG APÓS TRATAMENTO COM KDY23.....	75
7 CONCLUSÕES	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é o termo utilizado para um grupo heterogêneo de doenças malignas em que células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos. Uma massa de células cancerosas é chamada de tumor e um crescimento descontrolado de um tumor resulta na destruição dos tecidos saudáveis ao redor. A disseminação de células tumorais pela corrente sanguínea ou linfática leva à formação de tumores secundários ou metástases em outros órgãos ou tecidos. Existem mais de 100 tipos diferentes de câncer. A maioria dos cânceres é nomeada de acordo com o órgão ou tipo de célula em que se iniciam – por exemplo, o câncer que começa no cólon é chamado de câncer de cólon; o câncer que começa nos melanócitos da pele é chamado de melanoma (NIH, 2021).

O câncer é caracterizado pela proliferação exacerbada, crescimento desordenado e alterações na diferenciação e coesão celular, tais aspectos são resultantes de mutações e danos no DNA das células. Os efeitos causados por uma mutação no DNA da célula, lesão ou ativação anormal de genes que coordenam a multiplicação celular, alteram o controle de proliferação, diferenciação e coesão celular favorecem o surgimento do câncer. Essas mutações podem ser hereditárias ou decorrentes de carcinógenos, como fatores ambientais, químicos, hormonais, virais e estilo de vida, por exemplo, alimentação inadequada, consumo de bebida alcoólica e cigarro (POLYAK, 2007; AKRAM *et al.*, 2017; COELHO *et al.*, 2018; SARTORI; BASSO, 2019).

As mutações genéticas podem acontecer de duas formas: pela ativação de proto-oncogenes em oncogenes e pela inibição dos genes supressores de tumor e dos genes que controlam a apoptose (LEE; MULLER, 2010; SARTORI; BASSO, 2019). Os proto-oncogenes tem função em células normais em expressar fatores de crescimento, transdutores de sinais celulares e fatores de transcrição nuclear que controlam o ciclo celular. Assim, a mutação desses proto-oncogenes para oncogenes induz o crescimento, divisão e progressão do câncer. Os genes supressores tumorais e controladores de apoptose auxiliam na morte de células em grande proliferação, no reparo do DNA e ativação do ponto de verificação no ciclo celular, a inibição desses

genes causa a perda de suas funções. Esses dois tipos de mutação geram um desequilíbrio no ciclo celular, com consequente desenvolvimento do câncer (LEE; MULLER, 2010).

O câncer é uma das principais causas de adoecimento e morte da população. Só em 2020 a estimativa foi de 19,3 milhões de novos casos e cerca de 10 milhões de mortes por câncer em todo o mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (SUNG *et al.*, 2021). Para o Brasil (2018-2019) foi estimada a ocorrência de 600 mil novos casos por ano, os dados de distribuição por região geográfica mostram que sul e sudeste concentram 70% das novas ocorrências, sendo que quase metade encontra-se na região sudeste (INCA 2018).

Apesar do grande avanço e inúmeras pesquisas, o tratamento do câncer ainda enfrenta muitas adversidades. Grande parte da terapia atual envolve processos invasivos como introdução de cateteres para administração de quimioterápicos, cirurgias para a remoção de tumores e radioterapia. Além disso, é importante ressaltar que as alternativas atuais de tratamento muitas vezes vêm acompanhadas de falhas como resistência aos medicamentos, toxicidade e diversos efeitos colaterais. A resistência aos quimioterápicos pode ser intrínseca, quando o paciente apresenta antes mesmo do início do tratamento fatores mediadores da resistência ou adquirida que se desenvolve durante o tratamento de tumores, inicialmente sensíveis e pode ser causada por mutações ou respostas adaptativas das células tumorais (HOLOHAN *et al.*, 2013).

Os esforços de pesquisadores para melhorar os métodos terapêuticos nas últimas décadas levaram a uma notável melhora na sobrevida dos pacientes oncológicos. Contudo, há ainda uma grande necessidade de melhorias e muitas lacunas a serem preenchidas (BRANNON-PEPPAS, BLANCHETTE, 2012).

Encontrar uma forma de tratamento eficaz contra a doença é um dos grandes desafios da pesquisa. A eficácia dos tratamentos está relacionada a eliminação seletiva das células cancerosas, afetando o menor número possível de células saudáveis, o que impacta diretamente na qualidade e eventual expectativa de vida do paciente (BRANNON-PEPPAS, BLANCHETTE, 2012).

1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são considerados os mais devastadores de todos os cânceres, uma vez que afetam predominantemente as células do cérebro ou da medula espinhal que são vitais na regulação do equilíbrio neurológico. Esses tumores afetam pessoas de todas as idades devido a anormalidades de desenvolvimento ou herança genética. Setenta por cento dos cânceres cerebrais e um quinto dos cânceres da medula espinhal são específicos de células gliais, portanto são chamados de gliomas, 80% dos gliomas são malignos. A gravidade de um tumor cerebral deve-se à sua natureza infiltrativa (OHGAKI *et al.*, 2009; RAJESH *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2013).

Os gliomas se originam da porção não neuronal ou glial do cérebro, ou seja, astrócitos, células oligodendrogliais, microgliais ou ependimárias (JIANG; UHRBOM, 2012). A OMS classifica os astrocitomas de 1 a 4 de acordo com a escala de malignidade, essa escala varia de acordo com suas características histológicas e sua correlação prognóstico/sobrevivência (ADAMSON *et al.*, 2009; KHADDOUR *et al.*, 2020).

O sistema de classificação da OMS baseia-se em atipia, mitose, proliferação endotelial e necrose. Tumores sem nenhuma dessas características são de grau 1 e com qualquer uma dessas características são de grau 2. Os tumores graus 1 e 2 são considerados benignos; grau 3 são malignos e grau 4 são além de malignos, os mais agressivos (LOUIS *et al.*, 2021; RAJESH *et al.*, 2017).

O Glioblastoma multiforme (GBM) é o glioma mais frequente em adultos, tem grau de malignidade 4 e é conhecido como um dos cânceres humanos mais agressivos, destrutivos e invasivos (TOUAT *et al.*, 2017; WECHSLER-REYA, SCOTT 2001). GBMs mostram significativa heterogeneidade intratumoral, como o próprio nome multiforme sugere (FURNARI *et al.*, 2007; PARSONS *et al.*, 2008; JIANG; UHRBOM, 2012).

Existem evidências convincentes que indicam que boa parte das células malignas no GBM é gerada por uma fração rara de células tumorais multipotentes e autorrenováveis, denominadas células-tronco de glioma ou células iniciadoras de glioma. A hipótese de células iniciadoras de glioma sugere que os tumores consistem em uma hierarquia celular com uma subpopulação de células capazes de manter e propagar o tumor devido à sua capacidade de autorrenovação e resistência à

quimioterapia e radioterapia (GALLI *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2017)

GBM é uma doença extremamente complexa, e parte dessa complexidade é devida ao seu isolamento das estruturas circundantes e à presença da barreira hematoencefálica (BHE) que impede a passagem de várias células imunes e quimioterápicos. O cenário genético e molecular heterogêneo do GBM constitui um desafio para o desenvolvimento de terapias eficazes, o que se reflete na falta de aprovação de medicamentos na última década (PARKER *et al.*, 2015; KHADDOUR *et al.*, 2020). Apesar de décadas de financiamento por instituições como o National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos, os avanços no tratamento do GBM têm sido limitados em comparação com outros tipos de câncer, como os de mama e pulmão. (YOUNG *et al.*, 2015).

Conforme o relatório estatístico do *The Central Brain Tumor Registry* dos EUA, a taxa média anual de incidência de GBM ajustada por idade durante o período de 2012 a 2019 foi de 3,27 por 100.000 indivíduos nos EUA. GBM é responsável por aproximadamente 14,2% de todos os tumores cerebrais e é mais comumente encontrado em adultos acima de 55 anos de idade (OSTROM *et al.*, 2023) com maior incidência em homens do que em mulheres (OHGAKI, KLEIHUES 2005; THAKKAR *et al.*, 2014; HANIF *et al.*, 2017).

Países desenvolvidos têm demonstrado maior incidência de gliomas do que os países menos desenvolvidos (THAKKAR *et al.*, 2014; HANIF *et al.*, 2017), o que pode ser devido à subnotificação de casos de gliomas, acesso limitado aos cuidados de saúde e diferenças nas práticas de diagnóstico (FISHER *et al.*, 2007; OHGAKI, 2009). Com relação as etnias, alguns autores citam uma maior incidência de GBM em asiáticos, latinos e brancos, alguns poucos estudos mostraram que os negros são menos propensos (IACOB, DINCA, 2009; HANIF *et al.*, 2017).

Até o momento, não há fatores de risco identificados ou causas carcinogênicas subjacentes para o desenvolvimento de GBM e o único fator de risco confirmado é a exposição a altos níveis de radiação ionizante (HANIF *et al.*, 2017; KHABIBOV *et al.*, 2022).

Quanto a localização a presença do tumor é mais frequente nos hemisférios cerebrais, sendo que cerca de 95% surgem na região supratentorial, enquanto uma pequena parcela dos tumores ocorre no cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal (NAKADA *et al.*, 2011; HANIF *et al.*, 2017).

Os tumores de GBM são caracterizados histopatologicamente por uma abundância de astrócitos pouco diferenciados e pleomórficos com atipia nuclear e alta atividade mitótica. São altamente vascularizados e a necrose é comum dentro desses tumores. A estrutura da BHE, o microambiente tumoral supressivo e a heterogeneidade do tumor fornecem vantagens às células de GBM, levando à diminuição da eficácia de agentes quimioterápicos, terapia direcionada e imunoterapia (KHABIBOV *et al.*, 2022). Metástases raramente são observadas em tumores GBM, no entanto, eles são altamente invasivos, e esses tumores empregam uma infinidade de mecanismos para evitar a detecção imunológica (PEARSON *et al.*, 2020).

Os sintomas comuns associados ao GBM são dores de cabeça, comprometimento cognitivo e alterações de personalidade, desequilíbrios na marcha, incontinência, perda sensorial, distúrbios visuais, convulsões, confusão e delírio. A maioria dos sintomas é inespecífica, portanto, a doença tem o risco de ser diagnosticada erroneamente como outras desordens neurológicas ou psicológicas, como demência, epilepsia ou acidente vascular cerebral (OMURO *et al.*, 2013; NAM *et al.*, 2018).

1.3 CLASSIFICAÇÃO DO GLIOBLASTOMA MULTIFORME

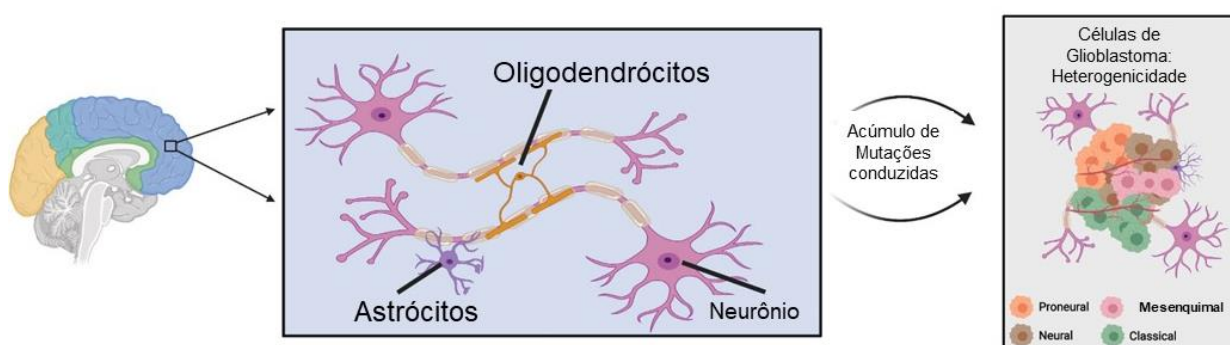
GBMs foram divididos em subtipos primários e secundários com base em sua apresentação clínica. GBMs primários são responsáveis pela grande maioria dos casos em pacientes mais velhos, enquanto os secundários são menos comuns e tendem a ocorrer em pacientes com menos de 45 anos. GBM primário manifesta-se primeiro de forma abrupta, sem evidência de sintomas prévios ou doença antecedente de grau inferior. Em contraste, GBM secundário resulta da transformação progressiva de astrocitomas de grau inferior, com mais de 70% dos gliomas de grau 2 transformando-se em doença de grau 3 e 4 dentro de 5 a 10 anos do diagnóstico (FURNARI *et al.*, 2007; JIANG; UHRBOM, 2012).

Apesar de suas histórias clínicas distintas, GBMs primários e secundários são morfológica e clinicamente indistinguíveis, embora apresentem padrões de transcrição notavelmente diferentes e aberrações recorrentes no número de cópias de DNA entre GBM primário e secundário (FURNARI *et al.*, 2007).

GBM é classificado ainda com o auxílio do perfil genético nos tipos proneural, neural, clássico, proliferativo e mesenquimal (FIGURA 1). Cada subtipo corresponde

a um grupo de alterações comumente encontradas nos perfis de expressão das células do tumor, definidos pela combinação de genes que são superexpressos ou regulados negativamente (ONZI 2014; VAN MEIR, HADJIPANAYIS *et al.*, 2010; VERHAAK *et al.*, 2010). Essa grande heterogeneidade intertumoral e intratumoral dificulta o desenvolvimento de terapias direcionadas (WU *et al.*, 2021).

FIGURA 1: Classificação de GBM segundo o atlas genômico do câncer.



Fonte: WU *et al.*, 2021

GBMs mesenquimais são caracterizados pela mutação do gene supressor tumoral neurofibromina 1 (*NF1*), bem como por mutações frequentes nos genes supressores tumorais *PTEN* (homólogo de fosfatase e tensina) e *TP53* (proteína tumoral p53). O subtipo clássico é altamente proliferativo e caracterizado por amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), mas nenhuma mutação *P53*. Enquanto o GBM proneural é frequentemente associado à mutação *P53* e exclusivamente às mutações *IDH1* (isocitrato desidrogenase 1) e *PDGFRA* (receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas). O subtipo neural é caracterizado por muitos genes que também existem nos neurônios normais não cancerosos do cérebro (VERHAAK *et al.*, 2010; BEHNAN *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021).

Os subtipos mesenquimal e clássico são tumores tipicamente mais agressivos, enquanto o subtipo proneural é menos agressivo e mais frequentemente observado em pacientes mais jovens (BEHNAN *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2021).

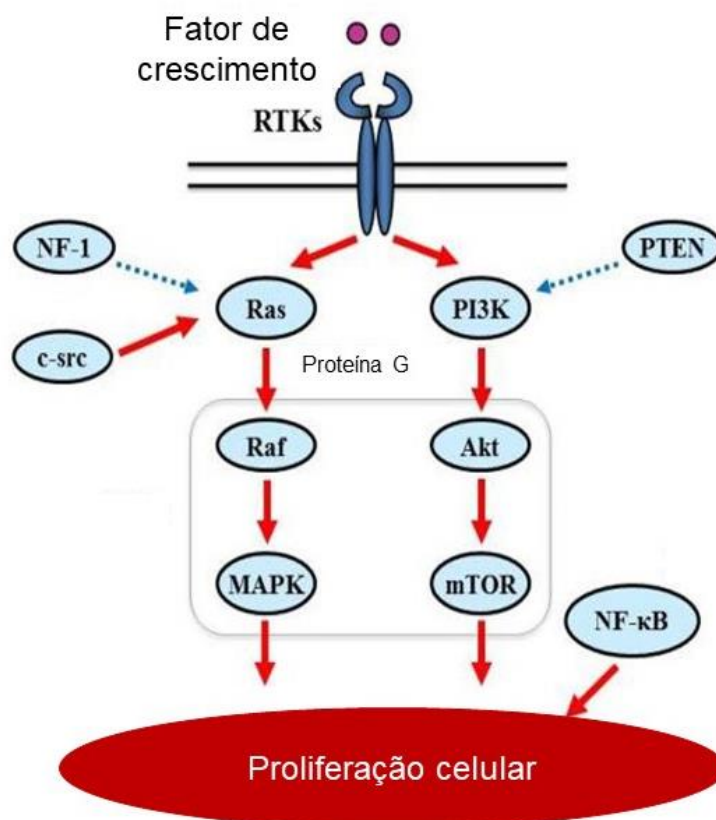
1.4 PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR DO GLIOBLASTOMA

Todos os processos do GBM de instabilidade genética, perda de controle do ciclo celular, superexpressão de fatores de crescimento e seus receptores, angiogênese, migração, invasão e apoptose aberrante são regulados por várias vias de sinalização. A tentativa de direcionar moléculas que interfiram nas vias de sinalização que são alteradas em GBM é uma promessa para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (NAKADA *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2021).

Estudos moleculares mostraram que a maioria dos tumores apresenta alterações recorrentes que interrompem as principais vias envolvidas na regulação do crescimento, receptores de tirosina quinase (RTQ), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), vias de sinalização de fosfoinosítídeo 3 quinase (PI3K), ciclo celular, reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) e apoptose, vias supressoras de tumor de retinoblastoma (E2F) e p53, bem como controle do estado da cromatina e comprimento dos telômeros (TOUAT *et al.*, 2017). Esses eventos de sinalização regulam a sobrevivência, a proliferação e a angiogênese das células (BEHL *et al.*, 2021).

O fator de crescimento EGFR desencadeia uma variedade de cascatas de sinalização envolvidas na proliferação de células tumorais, angiogênese, motilidade, diferenciação e sobrevivência (JORISSEN *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2017). A estrutura de EGFR consiste em domínio extracelular, domínio transmembrana e domínio intracelular da tirosina quinase. A ativação do EGFR leva à ativação de numerosas vias de sinalização a jusante, como PI3K-AKT-mTOR (FIGURA 2). A formação desse complexo de sinalização desencadeia uma variedade de cascatas de sinalização envolvidas na proliferação de células tumorais, angiogênese, motilidade, diferenciação e sobrevivência levando à proliferação do câncer e à resistência à terapia (KHABIBOV *et al.*, 2022; SIGISMUND *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017).

FIGURA 2: Principais vias de sinalização da proliferação celular. As vias PI3K/AKT/mTOR e RAS/RAF/MAPK são mostradas.



Fonte: NAKADA *et al.*, 2011 (adaptado)

Legenda: Os fatores de crescimento ligam-se aos receptores de tirosina quinase (RTQs), seguidos pela ativação de RAS/RAF/MAPK e/ou PI3K/AKT/mTOR. RAF, MAPK, AKT e mTOR são classificados como proteínas quinases específicas de serina/treonina (STQs). A tirosina quinase intracelular c-SRC também ativa RAS/RAF/MAPK.

A amplificação do gene *EGFR* e/ou sua superexpressão ao nível da proteína são alterações comuns que ocorrem em 35-45% dos casos de GBM (WILLIAM *et al.*, 2017; KHABIBOV *et al.*, 2022). A superexpressão de *EGFR* resulta em uma atividade anormal das vias de sinalização a jusante, incluindo a proteína *Son of sevenless* (SOS), proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2 (GRB2), proteína RAS e AKT (XU *et al.*, 2017; KHABIBOV *et al.*, 2022).

Após a ativação do EGFR, a via de sinalização MAPK é desencadeada pela ligação do GRB2 direta ou indiretamente ao EGFR. GRB2 também abriga 2 domínios SH₃, permitindo interações com sequências ricas em prolina presentes nas proteínas

SOS. A interação GRB2/EGFR precede o recrutamento de SOS para a membrana plasmática. SOS é um fator de troca de nucleotídeos de guanina que funciona para promover a conversão de Ras-GDP em Ras-GTP ativo. Posteriormente, RAS ativa RAF, uma proteína serina-treonina quinase, que então fosforila e ativa MEK1/2 (proteína quinase 2 ativada por mitógeno), resultando na ativação de ERK1/2 (quinase 1 regulada por sinal extracelular – MAPK) (FIGURA 2) (BATZER *et al.*, 1994; MARSHALL *et al.*, 1996; XU *et al.*, 2017).

A via PI3K/AKT/mTOR regula a quiescência e a proliferação celular, e tem papel importante no câncer (LI XIAOMAN *et al.*, 2016; KHABIBOV *et al.*, 2022). A PI3K pode ser ativada por vários fatores de crescimento como a família EGFR humana e por PDGFR. A ativação subsequente de PI3K ativa o complexo mTOR, ou seja, complexo 1 (mTORC1 = mTOR + RAPTOR proteína associada à regulação de mTOR), direta ou indiretamente. Essa ativação resulta na divisão e crescimento de células através da síntese de proteínas devido à ativação/fosforilação de p70 ribossomal S6 quinase (S6K) e proteína de ligação do fator de iniciação da tradução 4E (4E-BP). O complexo 2 (mTORC2 = mTOR + RICTOR proteína resistente à rapamicina) é ativado pela sinalização PI3K junto com fatores de crescimento por meio de processos desconhecidos, causando organização do citoesqueleto, metabolismo lipídico, sobrevivência celular e fosforilação da AKT (GUERTIN *et al.*, 2007; SENGUPTA *et al.*, 2010; ZONCU *et al.*, 2010; DANCEY *et al.*, 2010; THAKUR *et al.*, 2022).

PI3K participa da fosforilação de AKT através da adição de um grupo fosfato à AKT pelo complexo mTOR 2 (THAKUR *et al.*, 2022). Ambos os eventos são necessários para a ativação completa de AKT. A proteína AKT estimula a síntese de proteínas e o crescimento celular, atua na proliferação celular inativando os inibidores do ciclo celular e viabilizando proteínas do ciclo celular, além de promover a sobrevivência celular. Essa via PI3K/AKT/mTOR é hiperativada em vários tipos de câncer, incluindo o GBM (MARKMAN; DIENSTMANN; TABERNERO, 2010; KHABIBOV *et al.*, 2022).

Em condições normais, o TGF- β desencadeia uma via inflamatória responsável pela expressão de p21 e outros supressores tumorais. No entanto, em células cancerosas, TGF- β interrompe o ciclo celular e medeia características malignas. A proteína VEGF é um potente estimulador do crescimento de células endoteliais e um

regulador chave do crescimento normal e patológico de vasos sanguíneos e angiogênese (KEUNEN *et al.*, 2011; KHABIBOV *et al.*, 2022).

O conhecimento do número de vias de sinalização alternadas é importante pois pode direcionar aos possíveis alvos em potencial, trazendo uma maior eficácia ao tratamento e consequente melhoria dos resultados clínicos em pacientes com GBM (KHABIBOV *et al.*, 2022).

Vale a pena ressaltar que os gliomas malignos humanos raramente são dependentes de um único oncogene ou gene supressor de tumor, o que pode explicar a falta de eficácia de fármacos que visam apenas uma alteração molecular em ensaios clínicos (RAJESH *et al.*, 2017).

Vincular o curso clínico da doença a um programa de biologia celular, permite o desenvolvimento de terapias de acordo com os perfis de expressão gênica. Embora isso permita uma terapia mais individualizada que possa vir a ser um adjuvante ao tratamento até o presente momento, os tumores gliais de alto grau ainda apresentam alta frequência de recorrência após o tratamento e são essencialmente incuráveis (PREUSSER, DE RIBAUPIERRE *et al.*, 2011; WESTPHAL, LAMSZUS 2011; ONZI 2014).

1.5 TERAPIA ATUAL PARA GLIOBLASTOMA

As diretrizes atuais recomendam uma abordagem multidisciplinar, o tratamento padrão ouro para pacientes com GBM recém diagnosticados consiste em radioterapia com quimioterapia concomitante e adjuvante (PREUSSER *et al.*, 2011; THON; KRETH; KRETH, 2013). Além da ressecção aberta do tumor que representa um dos pilares no tratamento do GBM e geralmente é considerada o primeiro passo dentro do algoritmo de gerenciamento (STUPP *et al.*, 2010; THON; KRETH; KRETH, 2013).

A ressecção cirúrgica de tumores cerebrais foi revolucionada no final dos anos 1980 e início dos anos 1990 com o desenvolvimento da estereotaxia sem moldura. Permitiu a colocação precisa de instrumentos cirúrgicos usando orientação por imagem e foi modernizado com novas tecnologias de imagem. A extensão da ressecção do tumor foi positivamente correlacionada com o tempo de sobrevida, sendo desejável a ressecção total bruta quando possível. No entanto, alcançar a ressecção total bruta envolve muitos desafios, incluindo a identificação bem-sucedida

das margens do tumor, bem como evitar o córtex adjacente (KIRCHER *et al.*, 2012; AZAGURY *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2021).

Além disso, as células neoplásicas do GBM possuem natureza infiltrativa devido a sua alta capacidade proliferativa, características que reforçam os desafios de uma ressecção total mesmo com hemisferectomias (CUDDAPAH *et al.*, 2014; SILANTYEV *et al.*, 2019). Notavelmente, esses tratamentos são bastante invasivos e acabam fragilizando consideravelmente a saúde dos pacientes (FILIPPO *et al.*, 2021; (HARTER; WILSON; KARAJANNIS, 2014).

A radioterapia, uma importante opção terapêutica para tratar pacientes com GBM também apresenta algumas limitações. É conhecida há décadas a importância da hipóxia em tumores sólidos como um importante preditor de resistência ao tratamento e causador de piora na evolução clínica. A hipóxia tumoral limita os danos causados pela radiação ionizante com base na redução do estresse oxidativo, bem como na limitação da fixação mediada por oxigênio (O₂) aos danos no DNA induzidos por radiação. GBM é conhecido pelo desenvolvimento hipóxico substancial (TELAROVIC; WENGER; PRUSCHY, 2021; PEPPER *et al.*, 2022;).

A barreira hematoencefálica (BHE) constitui um problema adicional para o tratamento, visto que, para ultrapassá-la os fármacos necessitam de características químicas específicas como baixo peso molecular, não estar ionizado, além de outros fatores como concentração, afinidade com as proteínas transportadoras, conformação, metabolismo e *clearance* do fármaco/polímeros (OZDEMIR-KAYNAK; QUTUB; YESIL-CELIK TAS, 2018).

A temozolomida (TMZ), é o fármaco mais utilizado na quimioterapia padrão para GBM recém-diagnosticado e recorrente com algum fármaco adjuvante. É um agente alquilante capaz de atravessar a BHE, é bem tolerada embora tenha efeitos adversos graves como boa parte dos quimioterápicos, sobretudo quando utilizado em dosagem contínua, e sua eficácia é limitada (TONN *et al.*, 2012; THON; KRETH; KRETH, 2013; PRZYSTAL *et al.*, 2019).

As ações biológicas da TMZ parecem ser mediadas pela metilação na posição O⁶ da guanina, levando a mutações que acabam escapando do sistema de reparo. Esse sistema promove uma cascata de sinalização ativando os *checkpoints* do ciclo celular e causa a parada do ciclo celular e a apoptose por meio de quebras de fita simples e dupla no DNA. As células tumorais com gene *MGMT* (metilguanina-metil

transferase) metilado são mais suscetíveis aos efeitos citotóxicos da TMZ do que as células com *MGMT* funcional (D'ATRI *et al.*, 1998; KHABIBOV *et al.*, 2022).

Embora a TMZ seja o fármaco de primeira escolha no tratamento de GBM, a quimioterapia única resultou na resistência do tumor ao medicamento após um determinado período, dificultando o sucesso do tratamento. Buscando melhorar a terapia de GBM buscou-se a combinação com outros fármacos anticancerígenos e em alguns casos entraram em ensaios clínicos (LUN *et al.*, 2016; WICK *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2020).

O bevacizumabe, um inibidor do crescimento vascular endotelial que foi desenvolvido para bloquear a angiogênese, é uma opção de tratamento comumente utilizada nos EUA para tratamento de GBM recorrente, associado a TMZ (FERRARA *et al.*, 2004; GROSSMANN *et al.*, 2017). Ensaios clínicos de fase II e III para pacientes com GBM recorrente, bem como dois ensaios clínicos randomizados de fase III para pacientes com GBM recém-diagnosticado, não encontraram melhora na sobrevida global com a adição de bevacizumabe à terapia padrão (CHINOT *et al.*, 2014; GILBERT *et al.*, 2014; WICK *et al.*, 2015; WICK *et al.*, 2016; GROSSMANN *et al.*, 2017).

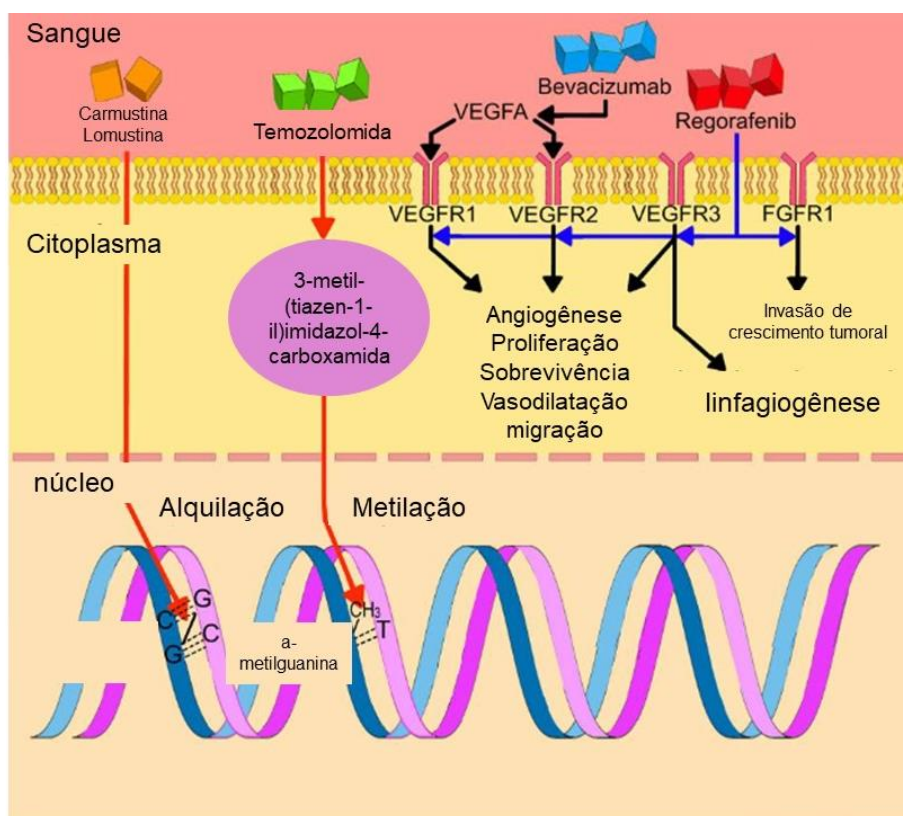
A carmustina (também conhecida como BCNU) é um pequeno agente alquilante e molécula de mostarda nitrogenada. Sua ação é fazer com que as bases de guanina e citosina no DNA formem ligações cruzadas entre as fitas. A lomustina é uma terapia antitumoral alquilante oral, que possui eficácia anti-GBM devido à sua alta lipofilicidade e pequeno tamanho, o que facilita a passagem pela BHE (WU *et al.*, 2021; KHABIBOV *et al.* 2022).

O regorafenibe é um inibidor de multiquinase recentemente aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA), agência reguladora americana, para tratamento adjuvante de alguns tipos de câncer como o câncer colorretal metastático, carcinoma hepatocelular e tumores estromais gastrointestinais. Apresenta eficácia considerável na supressão do crescimento de células de GBM, embora informações disponíveis acerca da efetividade do medicamento para GBM seja limitada (JIANG *et al.*, 2019).

A outra modalidade de tratamento que mostrou melhora na sobrevida do paciente com GBM é a adição do campo de tratamento de tumor ao padrão de tratamento atual (ressecção cirúrgica máxima do tumor com quimiorradiação concomitante usando a TMZ e mais 6 meses utilizando a TMZ como adjuvante), que consiste em um dispositivo usado pelo paciente no couro cabeludo e fornece campos

elétricos que rompem os microtúbulos no fuso mitótico levando à morte das células tumorais. No entanto, esse tratamento tem se mostrado desafiador para os pacientes devido às baixas taxas de adesão ao seu uso e ao alto custo (STUPP *et al.*, 2005; STUPP *et al.*, 2017; KHADDOUR; JOHANNIS; ANSSTAS, 2020). A FIGURA 3 apresenta alguns fármacos e seu mecanismo de ação em GBM.

FIGURA 3: Mecanismo de ação de agentes terapêuticos sistêmicos padrão para tratamento de glioblastoma multiforme.



Fonte: KHABIBOV *et al.*, 2022

GBM possui um microambiente imunossupressor, referido por muitos autores como “tumores frios”. Esses tumores não possuem infiltração de células T tumorais pré-existentes, o que resulta em resistência do tumor aos inibidores do *checkpoint* imunológicos. Esses tumores são ainda caracterizados pela falta de antígenos tumorais, defeitos na apresentação de antígenos e elevado acúmulo de células imunossupressoras. O tratamento com inibidores de *checkpoint* imunológico demonstra eficácia limitada, isso porque além das características agressivas do tumor já citadas, o tratamento permanece um desafio, embora a patogênese da doença

esteja bem estabelecida o tumor não responde à terapia convencional (AHIR *et al.*, 2017).

A taxa de sobrevida do paciente com o GBM é desanimadora, estima-se que apenas 5% sobrevivam por até 5 anos, sendo que o tempo médio de sobrevida seja de apenas 15 meses com a terapia atual disponível. (STUPP *et al.*, 2009; OSTROM *et al.*, 2014; SHEA *et al.*, 2016).

Além da falta de eficácia dos fármacos no tratamento de GBM, os quimioterápicos de forma geral apresentam efeitos colaterais como perda de cabelos, troca de unhas, aftas, perda de apetite, náuseas, vômito e diarreia. O paciente em tratamento quimioterápico ainda pode ter maior susceptibilidade a infecções, devido ao comprometimento de células da medula, hematomas, sangramentos e fadiga (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

Além de todas essas questões, a maioria dos tumores de GBM recidivam durante ou após o tratamento, então é imprescindível o desenvolvimento de novos fármacos que possam oferecer benefícios clínicos a esses pacientes para melhorar a sobrevida e diminuir a morbidade e as complicações associadas à doença. Essa necessidade de novas terapias levou a uma extensa pesquisa pré-clínica que expandiu o conhecimento e a compreensão sobre a doença, caracterizando suas alterações moleculares e genéticas que controlam o crescimento do tumor, bem como sua interação ao sistema imunológico, identificando possíveis alvos de ação terapêutica (KHADDOUR; JOHANNIS; ANSSTAS, 2020).

No entanto, a aprovação limitada de medicamentos para GBM em relação às novas terapias experimentais que foram testadas e a modesta melhora na sobrevida alcançada na última década demonstram a obrigação de mais pesquisas no campo da neuro-oncologia para desenvolver novas terapias que possam melhorar a qualidade de vida dos pacientes (KHADDOUR; JOHANNIS; ANSSTAS, 2020). Além de minimizar os problemas que surgem particularmente na quimioterapia devido à resistência aos medicamentos atuais e sua baixa especificidade (RIEDL; ZWEYTICK; LOHNER, 2011).

O conhecimento de vias celulares alteradas em células de glioblastoma pode promover o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que melhoram a qualidade de vida do paciente e prolongam a sobrevida. Um regime farmacológico com alta eficácia e toxicidade reduzida se faz necessário.

1.6 MORTE CELULAR

A morte celular é um processo extremamente importante ao desenvolvimento, homeostase dos tecidos e integridade dos organismos multicelulares, uma vez que, aquelas células indesejáveis serão removidas durante o processo de transformação, embriogênese, patogênese e renovação do tecido (JAN; CHAUDHRY, 2019).

A apoptose ou morte celular programada é um processo que os organismos usam para eliminar o excesso de células e controlar o número de células (REED *et al.*, 2002). A apoptose é um importante mecanismo de morte celular em condições fisiológicas e patológicas. Durante o desenvolvimento, envelhecimento e para manter a homeostasia, ocorrem constantes processos apoptóticos (ELMORE, 2007). A morte celular programada é regulada a nível gênico, quando ocorre algum tipo de dano celular, essas células danificadas são removidas de forma eficiente por este processo (PISTRITTO *et al.*, 2016). A desregulação da apoptose, ou morte celular programada, é uma característica do câncer, pois é um processo celular crítico pelo qual células danificadas ou anormais são eliminadas (CHENG *et al.*, 2017)

A iniciação da apoptose ocorre por meio da ativação de proteases endógenas, denominadas caspases, que comprometem toda a estrutura interna da célula, contribuindo para a morte e preparação da remoção da célula por fagocitose (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). Sendo assim, a apoptose é considerada um mecanismo de defesa antitumoral reduzindo a população de células alteradas (NICHOLSON, 2000).

O mecanismo de apoptose é complexo e compreende várias vias de sinalização, podendo ser iniciado por vias extrínsecas ou intrínsecas. A via do processo apoptótico extrínseca é mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e FAS) A via intrínseca também chamada de via mitocondrial, medeia a apoptose iniciada por sinais internos, como dano ao DNA, induzida por sinais de estresse, incluindo agentes quimioterápicos e radiação. Podem ser mediadas pelas caspases que resultam em uma via comum de apoptose (PISTRITTO *et al.*, 2016).

As caspases são fundamentais no mecanismo de apoptose, uma vez que, são iniciadoras e executoras. As caspases iniciadoras são sintetizadas na sua forma inativa, pró-caspase, e a partir de interações com compostos adaptadores específicos, realizam uma auto-proteólise e se ativam. As caspases iniciadoras ativadas clivam as

caspases executoras, e é desta forma, que as caspases executoras clivam substratos celulares culminando na morte celular por apoptose (PISTRITTO *et al.*, 2016).

A caspase-3 é a caspase executora principal que é clivada e ativada pelas caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-9). A caspase-3 é clivada em um resíduo de aspartato para produzir uma subunidade p12 e p17 para formar a enzima caspase-3 ativa. A caspase-3 ativa degrada múltiplas proteínas celulares e é responsável por alterações morfológicas e fragmentação do DNA nas células durante a apoptose (MCILWAIN *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2017).

A poli adenosina difosfato ADP-ribose polimerase (PARP) é uma família de enzimas que desempenham papéis importantes no reparo de danos ao DNA. PARP-1 é conhecido por estar envolvida em vários processos celulares, incluindo reparo de DNA, recombinação, estabilidade genômica, regulação da transcrição e morte celular, durante a apoptose, a PARP-1 é clivada por caspases (HASSA *et al.*, 2008; QIN *et al.*, 2016).

Embora a clivagem de PARP-1 por caspases seja um fenômeno universal durante a apoptose, o significado dessa clivagem *in vivo* é amplamente desconhecido. Postula-se que a clivagem de PARP-1 pode ocorrer em células em apoptose para inativar sua capacidade de reparar o DNA a fim de preservar os *pools* de energia (HERCEG *et al.*, 2001; D'AMOURS *et al.*, 2001; PÉTRILLI *et al.*, 2004). Também é proposto que o produto de 24 kDa da clivagem de PARP-1 se ligue irreversivelmente ao DNA para impedir o acesso de enzimas de reparo de DNA ao DNA fragmentado (YUNG; SATOH, 2001; PÉTRILLI *et al.*, 2004).

Células mortas apoptóticas sofrem encolhimento celular e subsequente fragmentação em corpos apoptóticos circundados por membrana plasmática, reduzindo a ocorrência de respostas pró-inflamatórias. Alterações apoptóticas nucleares envolvem condensação parcial da cromatina ao redor do envelope nuclear e/ou fragmentação dos núcleos em massas redondas altamente empacotadas de cromatina condensada, sendo este último estágio uma das mais distintas características morfológicas da apoptose (BOHM *et al.*, 2003; BEYER *et al.*, 2013; SUSIN *et al.*, 2000; GARCIA-BELINCHÓN *et al.*, 2015).

Por outro lado, as células necróticas apresentam edema celular que culmina com a ruptura da membrana plasmática, permitindo a liberação do conteúdo intracelular e as subseqüentes respostas inflamatórias. As alterações nucleares observadas na morte celular necrótica são representadas pela ausência de

condensação da cromatina ou, em alguns casos, pela presença de aglomerados passivos de DNA (JÄÄTTELÄ *et al.*, 2003; VANDENABEELE *et al.*, 2010).

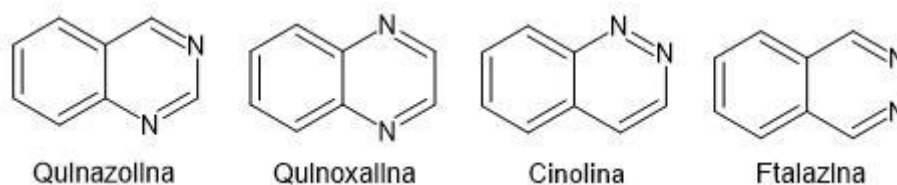
1.7 QUINAZOLINAS

As moléculas heterocíclicas, particularmente as que contêm nitrogênio, têm uma grande relevância medicinal sendo, portanto, moldes para desenvolvimento de muitos medicamentos e produtos farmacêuticos. Entre as estruturas aromáticas heterocíclicas contendo nitrogênio, as quinazolinas são consideradas como moléculas singulares, apresentando diversas propriedades terapêuticas (SZOLLOSI *et al.*, 2016; HAMEED *et al.*, 2018; GHONEIM *et al.*, 2018; DHUGURU *et al.*, 2022; DHUGURU *et al.*, 2022 b).

As quinazolinas foram reconhecidas inicialmente por sua atividade antimalárica, atualmente já foram descritas diversas aplicações biológicas relevantes, como atividade antimicrobiana, antifúngica, anticonvulsivante, antitumoral, anti-hipertensiva, antidiabética, anti-inflamatória, e importante ação de inibição de quinases (DHUGURU *et al.*, 2022 b; EL-AZAB *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2021; SHAGUFTA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018). Por essa razão, a comunidade científica tem grande interesse em buscar novos derivados de quinazolinas e descobrir suas propriedades no combate a doenças (WDOWIAK *et al.*, 2021).

A quinazolina é uma molécula heterocíclica bicíclica formada a partir da fusão de dois anéis aromáticos de seis membros, um anel de benzeno e um de pirimidina. É amarela e amorfa, sua massa molar é 130,15 g/mol de fórmula química $C_8H_6N_2$. Com base em vários padrões de substituição de átomos de nitrogênio, é isomérico com quinoxalina, cinolina e ftalazina (FIGURA 4). Essas formas isoméricas também são chamadas de diazanaftalenos (FIGURA 4) (FAISAL *et al.*, 2021 WDOWIAK *et al.*, 2021; DHUGURU *et al.*, 2022 b).

FIGURA 4: Estrutura química das quinazolininas



Fonte: Própria autora (2024).

Existem vários medicamentos aprovados com estrutura quinazolina no mercado, como cloridrato de prazosina, mesilato de doxazosina, e cloridrato de terazosina (JAFARI *et al.*, 2016; DEVI *et al.*, 2017; FAISAL; SAEED, 2021). Já foi descrita a atuação de derivados de quinazolina como agentes de ligação ao DNA ou como bloqueadores adrenérgicos eficazes (KAMEL *et al.*, 2016; FAISAL; SAEED, 2021). Muitos derivados de quinazolininas também constituem blocos de construção para cerca de 150 alcalóides naturais isolados de numerosas famílias do reino vegetal, de animais e de microorganismos (FAISAL; SAEED, 2021).

Medicamentos mediados por quinazolinona como fenquizona, albaconazol e idelalisibe, exibem potente atividade antifúngica, antitumoral, antimicrobiana e citotóxicas (FAISAL; SAEED, 2021; WITT; BERGMAN, 2000). Na terapia de combinação, o lapatinib mostrou ser ativo para câncer de mama (MCKEE; MCKEE; BOST, 1947; FAISAL; SAEED, 2021). Dacomitinib é usado para tratar carcinoma de pulmão de células não pequenas (KUMAR *et al.*, 2009; FAISAL; SAEED, 2021). A balaglitazona tem sido utilizada em ensaios que estudam o tratamento da diabetes mellitus. Alfuzocina, verublina e erlotinibe são agentes anticancerígenos (SELVAM E KUMAR, 2011; KSHIRSAGAR, 2015; FAISAL; SAEED, 2021).

Durante os últimos anos, o FDA aprovou várias classes inovadoras de fatores quimioterápicos anticancerígenos dentre os derivados de quinazolininas. Eles demonstraram eficácia terapêutica significativa, especialmente contra tumores sólidos (BATHULA *et al.*, 2020; WDOWIAK *et al.*, 2021).

Os efeitos antitumorais das quinazolininas podem se manifestar através de inúmeras vias. Um mecanismo anticancerígeno eficaz é a inibição da PI3K. Esta via PI3K/AKT/mTOR é crucial em funções reguladoras em muitas atividades celulares (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006; PENG *et al.*, 2016; WDOWIAK *et al.*, 2021).

Outras propriedades anticancerígenas dos derivados de quinazolininas podem ser devidas à inibição de RTQ por exemplo, EGFR. Os RTQs, que estão envolvidos na sinalização transmembrana, estão associados aos receptores de vários fatores de crescimento (CADENA *et al.*, 1992; ALQASOUMI *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2016 b; WDOWIAK *et al.*, 2021). Erlotinib, afatinibe e gefitinibe são exemplos de inibidores de EGFR, têm aplicações na terapia de pacientes com câncer de pulmão e bexiga (FAEHLING *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; WDOWIAK *et al.*, 2021).

Atualmente estão disponíveis no mercado os inibidores de múltiplos vivo. Esses medicamentos como o axitinib, pazopanib, vandetanib entre outros, podem melhorar os mecanismos de resistência, incluindo mutações pontuais nos sítios de ligação, comparados aos inibidores de um único RTQ, possibilitando uma nova abordagem na quimioterapia do câncer. Entretanto, seu uso deve ser combinado a outros agentes quimioterápicos e/ou radiação para melhora dos resultados terapêuticos, visto que os inibidores dos RTQ apresentam atividade citostática e não citotóxica nas células tumorais (STEINMETZ *et al.*, 2018; GOEDEGEBUURE *et al.*, 2019; CHOUDHARY *et al.*, 2021).

As quinazolininas também podem apresentar propriedades apoptóticas em linhagens de células cancerosas por meio da atuação como inibidores de tubulina (LI YANG *et al.*, 2019). A tubulina é a proteína estrutural dos microtúbulos e desempenha papel crucial na divisão celular (WDOWIAK *et al.*, 2021).

Já foi descrita a ação de derivados de quinazolininas como inibidores da sinalização Wnt/ β -catenina. Vários componentes da via Wnt/ β -catenina foram identificados como oncogenes ou supressores de tumor, sendo uma via fundamental para a proliferação celular descontrolada em vários tipos de tumores, particularmente no câncer colorretal (LI *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

O GBM é uma das neoplasias mais agressivas com maior taxa de mortalidade associada. No entanto, os tratamentos disponíveis estão associados a algumas limitações, como altas variações em tumores sólidos e desregulação de múltiplas vias celulares. A heterogeneidade do tumor GBM e sua infiltração agressiva nos tecidos próximos dificultam o tratamento cujas modalidades terapêuticas atuais são majoritariamente paliativas (FURNARI *et al.*, 2007; PARSONS *et al.*, 2008; JIANG; UHRBOM, 2012).

O atual regime farmacológico padrão disponível para glioblastomas, como radioterapia e ressecção cirúrgica após tratamento principalmente com o quimioterápico TMZ, permanece ineficaz, devido à resistência ao medicamento, metástase e recorrência tumoral. Assim, a demanda por uma estratégia terapêutica eficaz para GBM permanece (LUN *et al.*, 2016; WICK *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2020).

Nesse contexto, existe interesse consistente e relevante da comunidade científica em desenvolver fármacos que possam apresentar melhores resultados no tratamento, para otimizar a eficácia terapêutica e proporcionar qualidade de vida ao paciente, bem como aumento na expectativa de sobrevida do paciente.

As quinazolininas são uma classe de moléculas amplamente utilizadas em síntese orgânica, com várias propriedades biológicas. Diversos derivados de quinazolininas já são fármacos aprovados por agências reguladoras de vários países, com ação inclusive antitumoral como já citado anteriormente (HAMEED *et al.*, 2018; GHONEIM *et al.*, 2018; SZOLLOSI *et al.*, 2016; DHUGURU *et al.*, 2022; DHUGURU *et al.*, 2022 b).

Nosso grupo de pesquisa realizou a síntese de alguns derivados de quinazolininas e avaliaram seu efeito citotóxico em células de glioblastoma (U87-MG) (ANTUNES, 2013). Diante dos bons resultados citotóxicos apresentados para as nessas células, o presente trabalho propôs a sintetizar de 8 moléculas derivadas de quinazolininas, denominadas KDYs. A partir de ensaios de viabilidade celular (MTT) foi selecionado a molécula (KDY23) que apresentou maior efeito citotóxico nas células de glioblastoma (U87-MG; T98G). A partir desse resultado, os ensaios foram direcionados à molécula KDY23, na qual foi realizada a caracterização físico química, ensaios de dose-resposta, avaliação de morte celular por apoptose por meio de

ensaios de *western blotting* e avaliação de vias de sinalização de sobrevivência, proliferação e migração por meio de qRT-PCR.

.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar derivados de quinazolinas e avaliar seu potencial efeito antitumoral em células de GBM.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

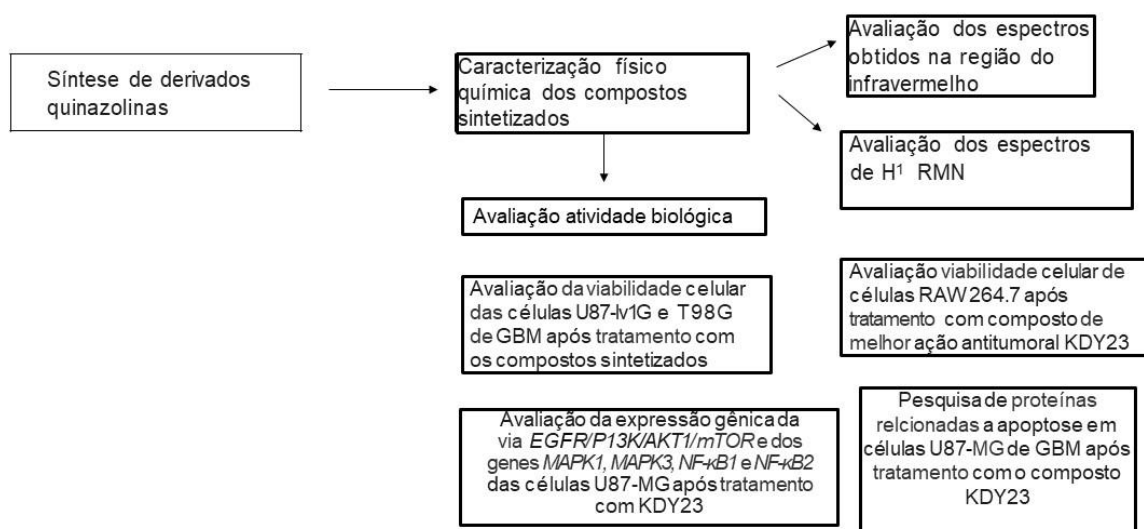
- Caracterizar as interações intramoleculares em estado sólido das moléculas derivadas de quinazolinas;
- Caracterizar as interações intermoleculares em solução aquosa de hidrogênio das moléculas derivadas de quinazolinas;
- Avaliar a viabilidade das células de glioblastoma após tratamento com as moléculas sintetizadas derivadas de quinazolinas (KDYs);
- Avaliar o efeito dose/ resposta de KDY23 em células de glioblastoma;
- Avaliar a viabilidade das células de GBM após o tratamento com os precursores de KDY23;
- Avaliar a morfologia das células de GBM após tratamento com KDY23, TMZ e DOXO;
- Avaliar a viabilidade celular de macrófagos tratados com KDY23;
- Avaliar a apoptose celular por meio da expressão das proteínas PARP clivada e caspase-3 clivada após o tratamento com KDY23;
- Analisar a expressão diferencial de 8 genes (*EGFR*, *PI3K*, *AKT*, *mTOR*, *MAPK-1*, *MAPK-3*, *NF-κB1* e *NF-κB2*) importantes nas vias de sinalização de sobrevivência e proliferação celular após o tratamento com KDY23.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi organizado da forma mostrada no esquema abaixo (FIGURA 5).

FIGURA 5: Fluxograma contendo as etapas realizadas neste trabalho



Fonte: Própria autora (2024).

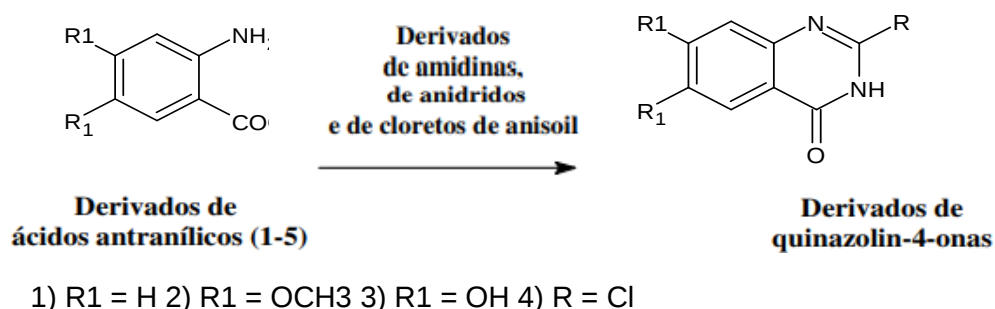
4.2 MATERIAIS

Todos os reagentes e solventes usados nos experimentos foram adquiridos de empresas idôneas (Merck, Aldrich, J.T. Baker e Synth) em alto grau de pureza, sendo utilizados sem nenhum tratamento prévio conforme orientação dos fabricante.

4.3 SÍNTESE DE NOVAS QUINAZOLINAS

As sínteses das quinazolinas seguiram metodologias já padronizadas na literatura científica (TOBE *et al.*, 2003) e (CONNOLLY, *et al.*, 2005) conforme estão descritas nos esquemas de síntese nas FIGURAS 6 e 7.

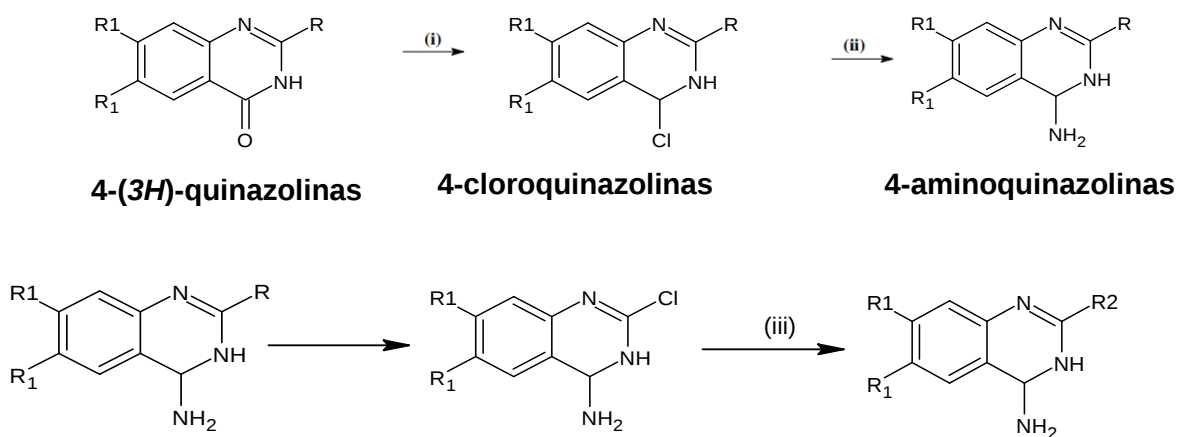
FIGURA 6: Esquema da formação dos derivados quinazolin-4-onas.



Fonte: Própria autora 2024

Legenda: Procedimento de ciclização para derivados de 4-(3H)-quinazolinonas. Reagentes e condições: (a) acetato de formamidina, 140°C, 8 horas (TOBE *et al.*, 2003); (b) dicloridrato de guanidina; NaOEt, EtOH, 130°C, 5 horas. (c) dibromidrato de 2- aminoacetamidina, MeOH, 80°C, 6 horas; (amerLLY, *et al.*, 2005) anidrido acético e benzóico, refluxo, 2 horas e NH₃; (i) Cloreto de o, m, p-anisoila, Et₃N, THF, TA, 3 horas; (ii) NH₃; (iii) 5% KOH aq, EtOH, refluxo, 1 hora (Rendimento ~76%).

FIGURA 7: Esquema com as etapas para a formação de derivados de cloroquinazolinas e aminoquinazolinas.



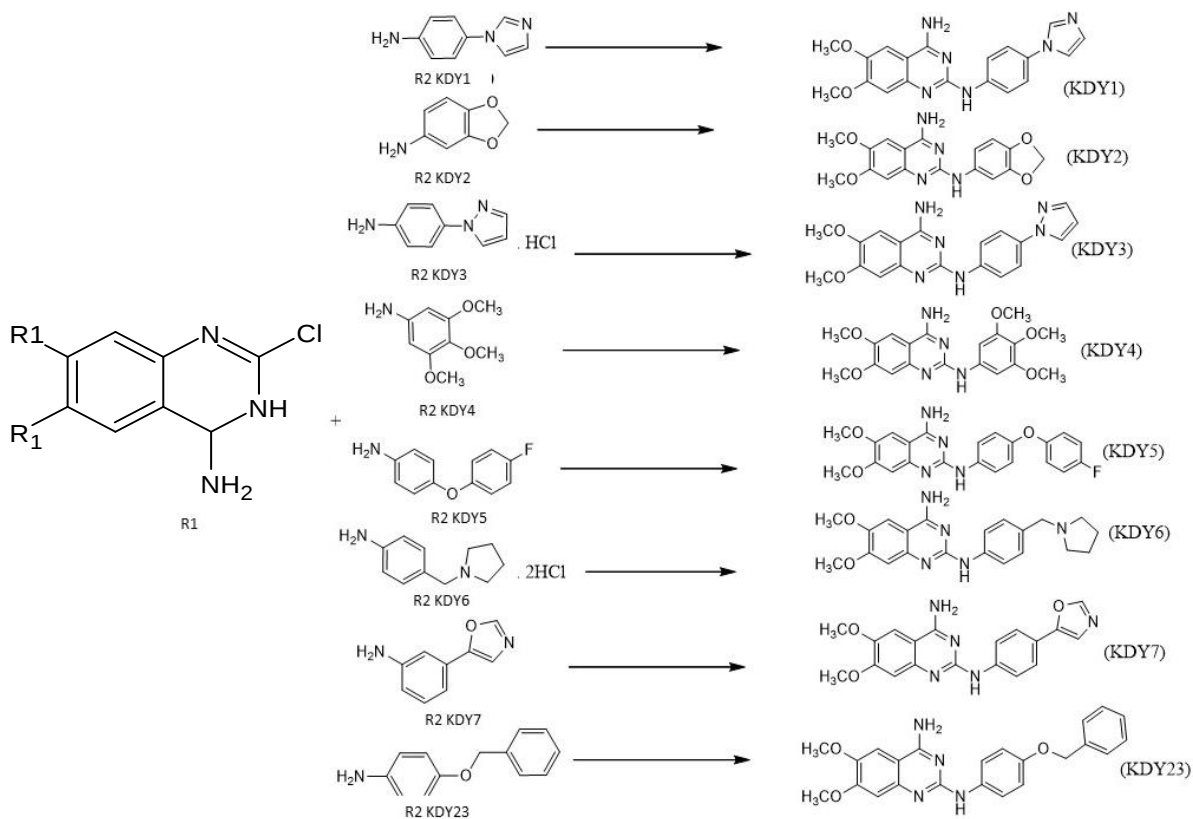
- 1) R1 = H 2) R1 = OCH₃ 3) R1 = OH 4) R = Cl 5) R2=Benxilóxianilina; 1H-imidazol-1-il) anilina; 4-(1H-pirazol-1-yl) anilina; 4-(4-Fluorophenoxy)anilina

Fonte: Própria autora (2024).

Legenda: Reagentes e condições: Derivado clorado: 1) SOCl₂ ou POCl₃, DMF catalítico, refluxo, 3 horas (i); 2) CH₂Cl₂, H₂O, NaHCO₃. (ii) e 3) NH₃, ou anilinas aromáticas, isopropanol, refluxo, 2 horas (iii). (TOBE *et al.*, 2003) (Rendimento ~67%).

Foram propostos a síntese de 8 derivados quinazolínicos, cujas estruturas químicas dos precursores e dos produtos que esperava-se obter estão representados na FIGURA 8.

FIGURA 8: Esquema das estruturas químicas propostas para as moléculas obtidas após a síntese de quinazolininas.



Fonte: Própria autora (2024).

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.4.1 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) das moléculas puras foram obtidos utilizando um espectrofotômetro da Perkin Elmer (série Spectrum Two™) com transformada de Fourier, a partir de pastilhas das amostras prensadas com KBr. Elas foram preparadas macerando a molécula desejada juntamente com o KBr na proporção de 1:100, em um gral de ágata. Esse material foi transferido para o pastilhador e prensado utilizando uma prensa manual. Os espectros foram obtidos como a média de 8 varreduras consecutivas e resolução de 2 cm^{-1} . O programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão: 10.03.08.0133) foi utilizado para a

aquisição dos espectros. Os dados foram exportados para edição no programa Microcal Origin 9.0.

4.4.2 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (H^1 RMN).

Os espectros de H^1 RMN foram registrados em um espectrômetro Oxford Instruments Pulsar (60 MHz), usando-se DMSO- d_6 como solvente. Todos os experimentos foram realizados à 37 °C. Os dados foram tratados usando o programa MESTRENOVA 12.0.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.5.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E MARCADORES DE APOPTOSE

4.5.1.1 CULTURA DE CÉLULAS

Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares U87-MG e T98G como modelo para GBM. U87-MG é uma linhagem humana de células epiteliais originalmente obtida do cérebro de um paciente homem de idade desconhecida (U-87 ATCC® HTB-14). Esse tipo de células tem sido uma marca registrada da investigação científica, resultando em muitas publicações oferecendo contribuições para a pesquisa de GBM (POKORNÁ *et al.*, 2021). As células foram gentilmente cedidas pelo CIPOI (Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância) localizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. A linhagem T98G é uma linhagem de células de fibroblastos derivados de tumor glioblastoma multiforme de um homem caucasiano de 61 anos (STEIN, 1979) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) código 0406. Também foram utilizadas duas linhagens de macrófagos murinos - J774.A1 e RAW 264.7 para avaliar a atividade da molécula KDY23 em células não tumorais.

As linhagens de células foram cultivadas em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute - RPMI 1640 (LONZA, 12-702F) adicionado de 1% de Penicilina/Estreptomicina (LONZA, 21F095302) e 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, 10-BIO500), previamente inativado por tratamento em banho maria a

56° C por 30 minutos. As células foram acondicionadas em garrafas de cultura mantidas em estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂ a 37° C). Ao atingirem 90% de confluência, as células U87-MG e T98G foram removidas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma Aldrich T4049). As células J774.A1 e RAW 264.7 foram removidas da garrafa utilizando *scrapers*, após as células serem destacadas das garrafas, elas foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, 4° C. O precipitado foi homogeneizado em meio de cultura, as células foram contadas, com o corante de exclusão azul de tripan (Sigma Aldrich, 15250-061), em câmara de Neubauer (Hausser Scientific 3100) e plaqueadas em diferentes densidades de acordo com o ensaio experimental.

4.5.1.2 ENSAIO DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS U87-MG APÓS TRATAMENTO COM AS MOLÉCULAS KDYS SINTETIZADAS.

Para avaliar a viabilidade das células foi utilizada a técnica de MTT (MOSMANN, 1983) que tem como princípio a redução do sal solúvel tetrazolium, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] de coloração amarela, pela deidrogenase mitocondrial presente nas células viáveis, resultando em um produto chamado de formazam, um precipitado insolúvel púrpura, liberado no meio de cultura. A concentração de cristais formados é diretamente proporcional à concentração de células viáveis (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018).

Durante 24 horas as placas de 96 poços contendo 2×10^5 células/ mL foram incubadas em estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂) para permitir a adesão das células nas placas. Em seguida, iniciou-se os tratamentos, onde foram testadas 4 moléculas sintetizadas, denominadas como KDY3, KDY5, KDY6, e KDY23, todos na mesma concentração, 10µM, com dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado como solvente de todos as moléculas sintetizadas e tampão fosfato salino (PBS). A concentração de DMSO por poço de tratamento foi em torno de 1%. Os tratamentos foram realizados em triplicata e foram realizados 3 experimentos independentes.

Após o tempo de 24 horas de tratamento, foram adicionados 20 µL de uma solução a 5mg/mL de MTT (Sigma Aldrich, M5655), com posterior incubação à 37°C em estufa de CO₂, durante quatro horas. Posteriormente, foram centrifugadas à 2000 rpm, durante três minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de DMSO (Sigma Aldrich, D8418). As placas

foram incubadas novamente à 37°C em estufa durante 30 minutos. Terminado o período de incubação, foi realizada a leitura em leitor de microplaca (ThermoFisher Multiskan FC 51119000) a 570nm. Dessa leitura foi calculada a média da absorbância das triplicatas, subtraída da média da absorbância dos testes do branco e então o controle (PBS) foi considerado 100% de viabilidade para a confecção dos gráficos de viabilidade das células em porcentagem.

4.5.1.3 ENSAIO DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS U87-MG E T98G APÓS TRATAMENTO COM KDY23

Após os resultados obtidos no ensaio anterior identificou-se a molécula que obteve a melhor atividade antitumoral: KDY23. Para a determinação do CI_{50} de KDY23, o mesmo tratamento foi realizado em ambas as linhagens (U87-MG e T98G): 2×10^5 células/mL foram tratadas com KDY23 nas concentrações de 1µM; 5µM; 7,5 µM, 10µM; 25µM e 50µM. As células também foram tratadas com a TMZ, fármaco referência no tratamento de GBM, na concentração de 400 µM, com dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado como solvente de todas as moléculas sintetizadas e TMZ e PBS. Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento para determinação da viabilidade pelo teste MTT, como descrito anteriormente na seção 4.5.1.2. A determinação do CI_{50} foi feita conforme descrito na seção “Análise Estatística”.

Após a avaliação dose/resposta de KDY23, foi realizado um novo ensaio de MTT utilizando a linhagem U87-MG, avaliando os reagentes utilizados na síntese de KDY23 de forma separada (R1, R2) e forma misturada (R1+R2), na concentração final de 10 µM. Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento para determinação da viabilidade pelo teste MTT, como descrito anteriormente na seção 4.5.1.2.

4.5.1.4 ENSAIO DE VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE RAW 264.7 E J774.A1 APÓS TRATAMENTO COM KDY23

Para avaliar a viabilidade das células de macrófago J774.A1 e RAW 264.7 tratadas com KDY23, também foi utilizada a técnica de MTT (MOSMANN, 1983). Todo o procedimento foi realizado conforme já descrito na seção 4.5.1.2. As células RAW 264.7 e J774.A1 foram tratadas com KDY23 nas concentrações de 1µM, 5µM, 10µM,

25µM, 50µM, também com DMSO e PBS. Os ensaios foram realizados em colaboração com a professora Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro da UFVJM.

4.5.1.5 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a extração das proteínas das células U87-MG, as mesmas foram rapidamente removidas com auxílio de *scrapers*, homogeneizadas em tampão de extração-RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP40; 0,25% Deoxicolato de Sódio; 5 mM Fluoreto de Sódio; 2 mM Ortovanadato de Sódio; 100µg/ml PMSF; 0,1 mg/mL aprotinina). Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (SMITH *et al.*,1985). Após quantificação das proteínas, as amostras acrescidas de tampão da amostra 5x (0,0625M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol), foram aquecidas a 95° C por 5 minutos e armazenadas em biofreezer -80° C para posterior análise das proteínas por *western blotting*.

4.5.1.6 WESTERN BLOTTING

As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sendo a corrida realizada a 30 V por 30 minutos, 100 V por 90 minutos e 120 V até a saída das proteínas do gel em cuba Digel (DGV10). O tampão de corrida utilizado foi Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,4. Para a etapa de transferência foi utilizada membrana de PVDF (Amersham Hybond P0.45), com dimensões iguais às do gel de poliacrilamida. A membrana foi ativada por dez segundos em metanol, cinco minutos em água destilada e dez minutos em tampão de transferência (Tris 25 mM pH 8,4, Glicina 192 mM, 20% de metanol) seguida pela montagem do *sandwich*. A transferência foi feita por duas horas e meia a três horas utilizando a cuba de transferência e fonte da BIORAD. Após a transferência a membrana foi incubada por duas horas com solução de bloqueio constituída por albumina bovina (BSA) (Sigma Aldrich A2153) a 3% ou 5% diluída em TBS-Tween 0,1% (Tris 20mM, NaCl 150 mM, 0,1% Tween 20). A incubação com anticorpo primário

foi feita *overnight* à 4 °C, e com o anticorpo secundário anti-mouse IgG (GE Amersham NA934V) ou anti-rabbit (GE Amersham NA931V) por 45 minutos, nas condições especificadas na TABELA 1. Após a incubação com cada anticorpo, foram realizadas três lavagens de dez minutos com TBS-T. A revelação do blotting foi através de fotodocumentação/ filme radiográfico.

TABELA 1. Especificações dos anticorpos primários utilizados

Anticorpo	Espécie	Marca, Código	Solução de Bloqueio (em TBS- Tween 0,1%)	Diluição do Primário/Diluyente	Diluição do Secundário/Diluyente
Anti-Caspase 3c	Rabbit	Cell Signaling Technology, 9664	BSA 3%	1:500/BSA 5%	1:5000/BSA 5%
Anti-PARPc	Rabbit	Cell Signaling Technology, 95415	BSA 3%	1:1000/ BSA 5%	1:5000/ BSA 5%
Anti-Actina	Mouse	BIORAD VMA00078	BSA 5%	1:5000/ BSA5%	1:5000/BSA 5%

BSA= Soro Albumina Bovina

4.5.2 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS U87-MG APÓS TRATAMENTO COM O KDY23.

4.5.2.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para extração do ácido ribonucléico (RNA) total, as células foram cultivadas como já descrito anteriormente. A metodologia de extração de RNA, eletroforese e quantificação das amostras de RNA total foi realizada conforme protocolo utilizado por PEREIRA (2013). As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^6 células por placa de petri de 9 mm. Em seguida, iniciou-se os tratamentos com KDY23 [10µM], com TMZ [400µM], com PBS e DMSO como controles. Foi empregado Trizol® para obtenção de RNA total. Essas células foram removidas das placas com ajuda de um espalhador de células tipo *scraper*, transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 1500 rpm a 4°C por 10 minutos, o precipitado formado foi utilizado para extração de RNA. As amostras foram transferidas para um microtubo e homogeneizadas em 1 mL

do reagente trizol gelado. As amostras foram incubadas e homogeneizadas por 5 minutos 15-30° C em bancada e depois centrifugadas a 14400 rpm, 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo. Foi adicionado 200µl de clorofórmio, homogeneizado e, após a centrifugação (12000 rpm, 4°C, por 10 minutos), foi separada a fase aquosa (superior) contendo o RNA total. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. Para precipitar o RNA total foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas novamente em temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugadas a 14400 rpm por 10 minutos a 4° C. O RNA formou um precipitado em forma de gel no fundo e nas paredes do tubo. Para lavagem do RNA o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado uma vez utilizando etanol 75%. A amostra foi misturada em vórtex e centrifugada a 12600 rpm por 5 minutos a 4° C. O precipitado foi seco por 30 minutos (temperatura ambiente). O RNA foi dissolvido em 30 µL água livre de RNase e estocado a -80° C.

4.5.2.2 ELETROFORESE DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL

Para verificar a integridade do RNA extraído as amostras foram analisadas em gel de agarose (Agarose 1%; Água DEPC; Tampão TAE 1x - Tris-borato 89mM, EDTA 2mM, pH 8,3). Para a corrida foi adicionado 1 µL da amostra, 2 µL de tampão da amostra, 1 µL de gel red. A eletroforese procedeu a 100 V por cerca de uma hora. O gel foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta e a imagem do gel captada no sistema de fotodocumentação Gel DocTM XR+, (Bio Rad®)

4.5.2.3 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL

A quantificação das amostras de RNA foi realizada no equipamento espectrofotômetro *Nano Vue plus* (GE®) sendo a concentração calculada em µg.mL⁻¹ através da fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times F_c \times f_d$$

Onde A₂₆₀ corresponde ao valor de absorbância da amostra ao comprimento de onda de 260 nm; F_c corresponde ao fator de conversão que para RNA é 40; f_d corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura, que neste caso foi de 100; e o

resultado é a concentração em $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do RNA foi analisada com base na razão da absorbância $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$.

4.5.3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS POR PCR EM TEMPO REAL

O PCR em tempo real (qRT-PCR) foi utilizado para verificar a expressão de genes importantes nos processos de sobrevivência e proliferação celular. A síntese de cDNA foi realizada incubando-se 2 μg de RNA total extraído a partir da cultura de células de GBM (U87-MG) com iniciadores randômicos (Random Primer 250ng - Invitrogen), 50U da enzima Super Script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen) e os seguintes ciclos: 37°C por 60 minutos; 95°C por 5 minutos conforme previsto pelo fabricante.

A qRT-PCR foi realizada em um sistema 7500 *Fast Real-Time* (Applied Biosystems®), utilizando sistema *SYBR green*. O fluoróforo *SYBR green* é um corante que se liga na alça menor da dupla fita de DNA emitindo luz fluorescente. A fluorescência é mensurada à medida que os produtos de amplificação são gerados. Quanto maior o número de duplas fitas de DNA formadas durante a reação de PCR, maior a emissão de fluorescência. A presença de DNA dupla fita na solução é capaz de aumentar essa emissão em até 10 vezes para uma mesma concentração de *SYBR green*. Os primers foram desenhados utilizando *Primer Express Software* (PerkinElmer Life Sciences) e validados através da análise das curvas de dissociação e modelo de titulação. Cada qRT-PCR (volume final de 20 μl) contém 30 ng de RNA transcrito (cDNA), 400 nM de cada primer e 10 μl de qPCRBio *SYBR Green Mix 2X* (PCR Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata. As condições da qRT-PCR foram: 95°C por 2 minutos (1 ciclo), 95°C durante 5 segundos, 60°C por 30 segundos (40 ciclos) conforme previsto pelo fabricante.

Os resultados foram avaliados pelo método do CT comparativo (User Boletim n° 2, PerkinElmer Life Sciences) sendo os valores comparados pelas eficiências de cada par de oligonucleotídeos previamente padronizados no laboratório. Os produtos (*amplicons*) obtidos durante a qRT-PCR foram detectados através da curva de amplificação gerada ao longo da reação denominada de ciclo limiar da fase logarítmica da amplificação ou CT (*Cycle threshold*). O CT reflete o número do ciclo no qual a fluorescência gerada na reação atravessa o limiar ou linha de base e é inversamente proporcional à concentração de DNA ou RNA da amostra analisada.

Assim, uma unidade de CT equivale ao dobro do produto amplificado de cópias iniciais de *amplicons*. Para quantificar a expressão gênica relativa foi utilizado o método $\Delta\Delta C_t$, este método compara a expressão de um gene de interesse entre diferentes amostras utilizando um gene normalizador.

O gene GAPDH foi usado como normalizador e a amostra (PBS) foi usada como controle. A TABELA 2 mostra a sequência de nucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR.

TABELA 2. Sequência de nucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR

GENES	SEQUÊNCIA (5' - 3')
<i>GAPDH</i> senso	GTTTCGTCATGGGTGTGAACC
<i>GAPDH</i> anti-senso	CCAGGGGTGCTAAGCAGTTG
<i>AKT-1</i> senso	TTGTGAAGGAGGGTTGGCTG
<i>AKT-1</i> anti-senso	TCACGTTGGTCCACATCCTG
<i>m-TOR</i> senso	GACGAGAGATCATCCGCCAG
<i>m-TOR</i> anti-senso	ACAAGGGACCGCACCATAAG
<i>PI3K</i> senso	TGGACGGCGAAGTAAAGCATT
<i>PI3K</i> anti-senso	AGTGTGACATTGAGGGAGTCG
<i>EGFR</i> senso	CTACAACCCCAACACGTACC
<i>EGFR</i> anti-senso	GAGCCGTGATCTGTCACCAC
<i>MAPK-1</i> senso	CCAACCTCTCGTACATCGGC
<i>MAPK-1</i> anti-senso	CTCTGGCAGTAGGTCTGGTG
<i>MAPK-3</i> senso	TTGCCGATCCTGAGCATGAC
<i>MAPK-3</i> anti-senso	GCCCACAGACCAGATGTCTG
<i>NF-κB 1</i> senso	CAGAGGCGTGTATAAGGGGC
<i>NF-κB 1</i> anti-senso	AGAGCTGCTTGGCGGATTAG
<i>NF-κB 2</i> senso	GTATCCAGTACACCTGGCGG
<i>NF-κB 2</i> anti-senso	TCTGTGGCTAGATGCAAGGC

Fonte: própria autora (2024)

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para realização da análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para as análises de expressão proteica, utilizou-se o software Image J (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Para análise do CI_{50} foram utilizados os testes de regressão não linear e a curva de dose resposta foi obtida utilizando o software GraphPad Prism (log [KDY23] vs. resposta – slope variável). Para análise dos dados de viabilidade e expressão gênica, foi empregado o teste de ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes, em triplicada e foram mostrados como média $\pm$ desvio padrão. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 DADOS DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DAS MOLÉCULAS OBTIDAS

Com as sínteses foram obtidos 8 derivados de quinazolininas, cujo aspecto, cor e massa do produto obtido são apresentados na TABELA 3, bem como as informações de aspecto e cor dos precursores (KDY1 - KDY7 e KDY23) para comparação.

Com base nessas informações não é possível confirmar a formação das moléculas, mesmo ocorrendo alterações no aspecto e cor para a maioria das prováveis quinazolininas. Desse modo fez-se necessário a caracterização por meio de métodos espectrométricos, tais como espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H para se obter tal confirmação.

TABELA 3: Dados físico-químicos dos precursores utilizados e dos produtos obtidos na síntese.

Molécula	Aspecto (estado de agregação / cor)	Formação de produto
R1	Pó branco	-
R2KDY1	Pó branco	-
KDY1	Pó branco	52,1mg
R2KDY2	Pó marrom	-
KDY2	Pó branco	52mg
R2KDY3	Pó branco	-
KDY3	Pó branco	356mg
R2KDY4	Líquido rosa a alaranjado	-
KDY4	Pó cinza	362,34mg
R2KDY5	Cristais brancos a bege escuro	-
KDY5	Pó cinza	280 mg
R2KDY6	Pó branco	-
KDY6	Pó branco	149,7mg
R2KDY7	Pó branco	-
KDY7	Pó branco	146mg
R2KDY23	Pó bege	-
KDY23	Pó marrom claro	256mg

Legenda: R1: precursor 1 (comum a todos as moléculas) R2KDY1 precursor 2 KDY1; R2KDY2 precursor 2 KDY2; R2KDY3 precursor 2 KDY3; R2KDY4 precursor 2 KDY4; R2KDY5 precursor 2 KDY5; R2KDY6 precursor 2 KDY6; R2KDY7 precursor 2 KDY7; R2KDY23 precursor 2 KDY23.

Fonte: própria autora (2024).

6.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de compostos orgânicos, pois possibilita obter informações dos grupos funcionais da molécula. Cada porção da molécula pode absorver radiação eletromagnética e promover vibrações de sistemas moleculares que são característicos da molécula. Desse modo, cada molécula apresenta um perfil único para sua absorção da radiação de infravermelho para dentro do espectro eletromagnético (BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESCHEIN, 2010; MOHAMED *et al.*, 2017).

A técnica de FTIR foi utilizada para avaliar se houve diferença nos espectros da amostra sintetizada comparada com seus precursores. Essa diferença de padrões de bandas indica que a molécula sintetizada é um produto diferente de seus precursores. Durante a formação de uma nova molécula, diversas ligações químicas acontecem provocando mudanças nos átomos que compõem as moléculas envolvidas, podendo perturbar o momento de dipolo das ligações de grupos funcionais. Essa perturbação nos momentos de dipolo é evidenciada pela alteração de intensidade, ao passo que mudanças na energia dos modos vibracionais, correspondem aos deslocamentos das bandas no espectro (DENADAI *et al.*, 2006; SWARBRICK, 2007).

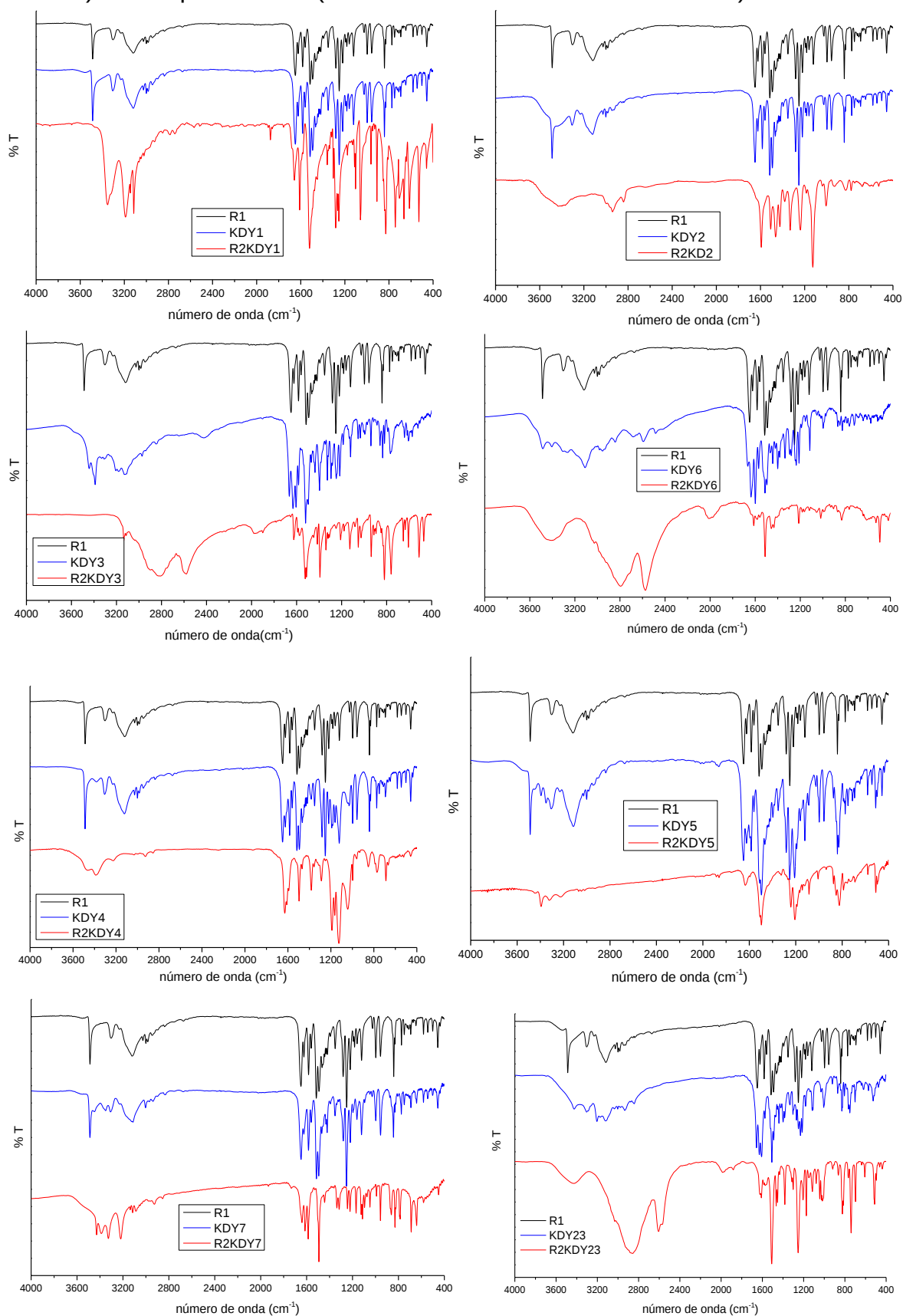
Na FIGURA 9 estão apresentados os espectros de infravermelho dos derivados de quinazolinas (KDY1 - KDY7 e KDY23) e seus precursores (R1 e R2KDY1 – R2KDY7 e R2KDY23). Os espectros foram obtidos na região do infravermelho médio ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) por possibilitar a observação dos principais modos vibracionais de moléculas orgânicas, tais como estiramento de ligações simples (O-H, C-H e N-H) (MOHAMED *et al.*, 2017).

Ao comparar os espectros das quinazolinas com seus precursores (FIGURA 9), é possível observar que ocorreram mudanças significativas do produto em relação ao precursor R2, sendo observado o desaparecimento de bandas relacionadas ao grupo amina. Isso foi muito marcante para KDY3 e KDY6 onde ocorre o desaparecimento das bandas na região $3000\text{ a }2200\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao sal de amônio quaternário (NH_4^+) presente no precursor R2. Contudo ao compararmos com o precursor R1, KDY1, KDY2, KDY4 e KDY7 apresentaram espectros com perfil das

bandas muito próximo a eles. A partir desses resultados concluiu-se que possivelmente não ocorreu a formação das moléculas KDY1, KDY2, KDY4 e KDY7.

Nos espectros das quinazolinas (KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23) foram observados o aparecimento ou deslocamento de bandas sugerindo a formação dessas moléculas. As principais alterações foram o aparecimento de nova banda entre 3400 e 3170 cm^{-1} atribuída a formação da ligação entre os precursores 1 e 2 por meio da amina secundária (R1-NH-R2); modificações na região de vibrações de núcleos aromáticos (1600-1580 e 1500-1450 cm^{-1}) (PAVIA, 2010) e o desaparecimento de uma banda na região de 830-670 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C-Cl. Essas absorções são características de quinazolinas (UDREA *et al.*, 2021).

FIGURA 9: Espectros de infravermelho dos derivados de quinazolina (KDY1 - KDY7 e KDY23) e seus precursores (R1 e R2KDY1 – R2KDY7 e R2KDY23).



FONTE: Elaborada pela autora (2024).

6.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H .

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica analítica que fornece informações estruturais e dinâmicas de moléculas, seja em solução ou no estado sólido. O princípio da técnica é a absorção da radiação eletromagnética na região das radiofrequências, sendo o fenômeno observado em núcleos que possuem um momento magnético. Quando colocados em um campo magnético, os momentos nucleares se alinham em uma orientação determinada pelo spin nuclear, que é uma propriedade fundamental de certos núcleos. Os sinais de RMN refletem as mudanças detectadas pela radiação emitida quando os núcleos excitados retornam ao seu estado fundamental. Os núcleos mais frequentemente estudados em RMN são ^{13}C e ^1H , cujo spin é igual a $\frac{1}{2}$, possuindo assim, duas orientações: alinhado com o campo magnético ou contra ele (SWARBRICK, 2007).

Os espectros de RMN obtidos permitem confirmar as interações intermoleculares e/ou formação de novas ligações evidenciando as variações no deslocamento químico, alterações no perfil do sinal ou nas suas intensidades (SWARBRICK, 2007; JANSOOK; OGAWA; LOFTSSON, 2018).

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos para KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23 e seus precursores (R1 e R2KDY3, R2KDY5, R2KDY6 e R2KDY23). Na FIGURA 10 foi demonstrado como foi feita a comparação entre os espectros, sendo exemplificado o que foi observado para a molécula KDY23. Nas figuras 12, 13, 14 e 15 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H com as atribuições de sinais de hidrogênio da amostra.

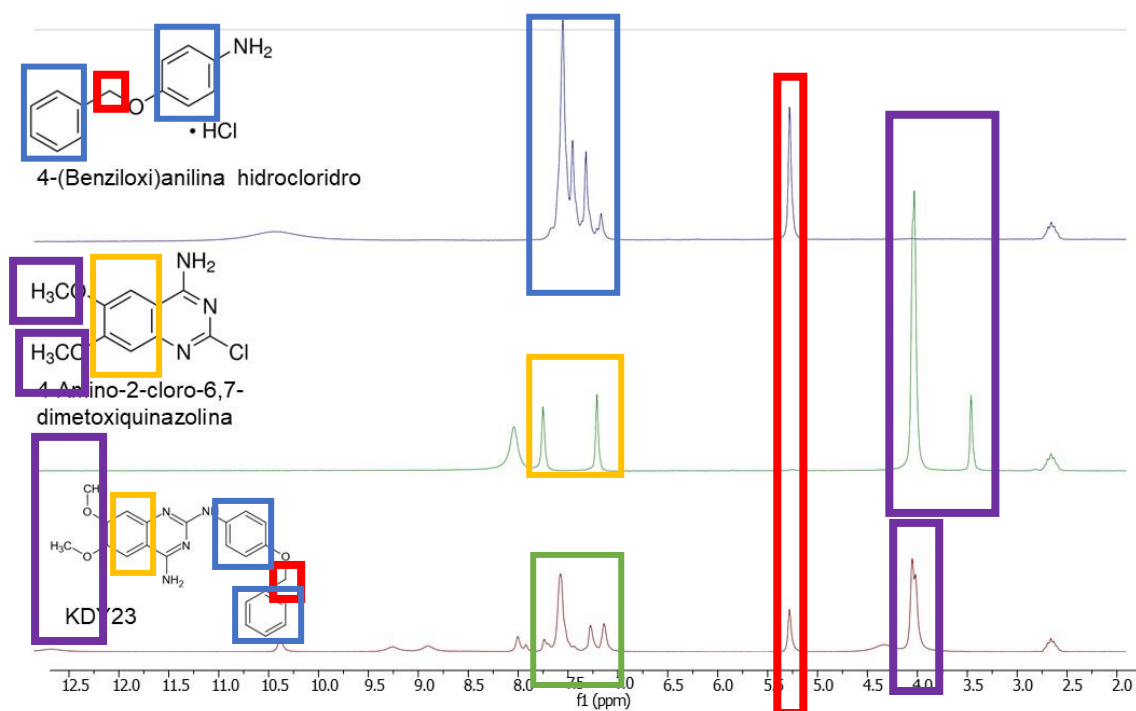
Como exemplificado na FIGURA 10, observa-se que nos espectros das quinazolininas apresenta uma intensa modificação na região dos hidrogênios aromáticos (6,5-8,0 ppm) devido a junção de sinais tanto do anel do derivado R1 quanto do novo derivado R2. Em todas as moléculas KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23 foi observado sinais em torno de 7,8, 7,1 e 4 ppm atribuídos aos dois diferentes hidrogênios aromáticos e os hidrogênios dos grupos metoxila do seu precursor R1 (4-amino-2-cloro-6,7-dimetoxiquinazolina), respectivamente. O aparecimento de hidrogênios entre 2 e 5 ppm depende da presença ou não do substituinte alifáticos no grupo R2. Além da presença de sinais de 8-12 ppm atribuído a presença de hidrogênio dos grupos amina, contudo esse sinal pode ser bastante modificado a depender da

sua interação com o solvente DMSO. Os dados de ^1H RMN assim como os FTIR confirmam a formação das quinazolininas.

Com base nos dados obtidos utilizou-se uma ferramenta de busca *Scifinder* para avaliar se na literatura consta alguma molécula com a estrutura química proposta para as moléculas obtidos. Foi encontrado um registro de patente descrito por Kung e colaboradores (2000) onde consta a descrição química dessa molécula. Embora o RMN de ^1H descrito na referida patente se apresente de forma superficial, existe uma descrição de aparecimento de múltiplos sinais de hidrogênio entre 6.9 e 7.5 ppm. É importante ressaltar que o registro de patente se refere a síntese da molécula e não o seu uso para tratamento de glioblastoma. Assim, está sendo solicitado o registro de patente da molécula KDY23 para tratamento de glioblastoma.

Assim como o presente estudo, o trabalho desenvolvido por Nunes (2018) o espectro de RMN de ^1H das quinazolininas sintetizadas apresentou sinais em torno de 4 ppm referente aos dois diferentes hidrogênios aromáticos comum as quinazolininas.

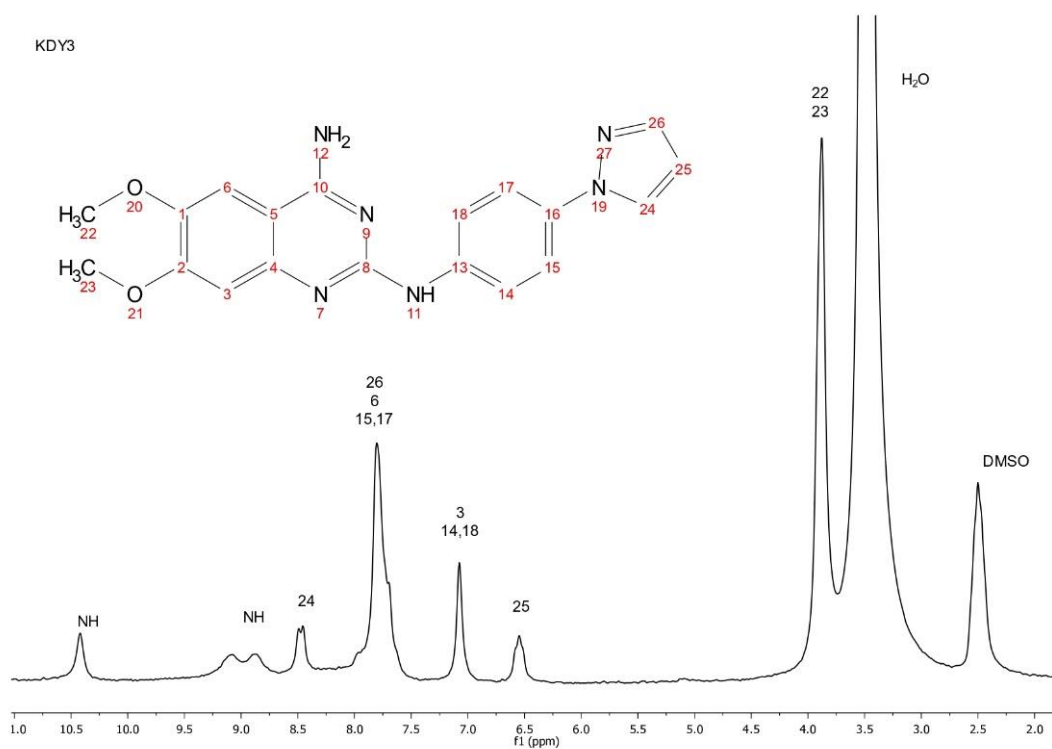
FIGURA 10: Espectros de RMN de ^1H dos precursores e da molécula KDY23.



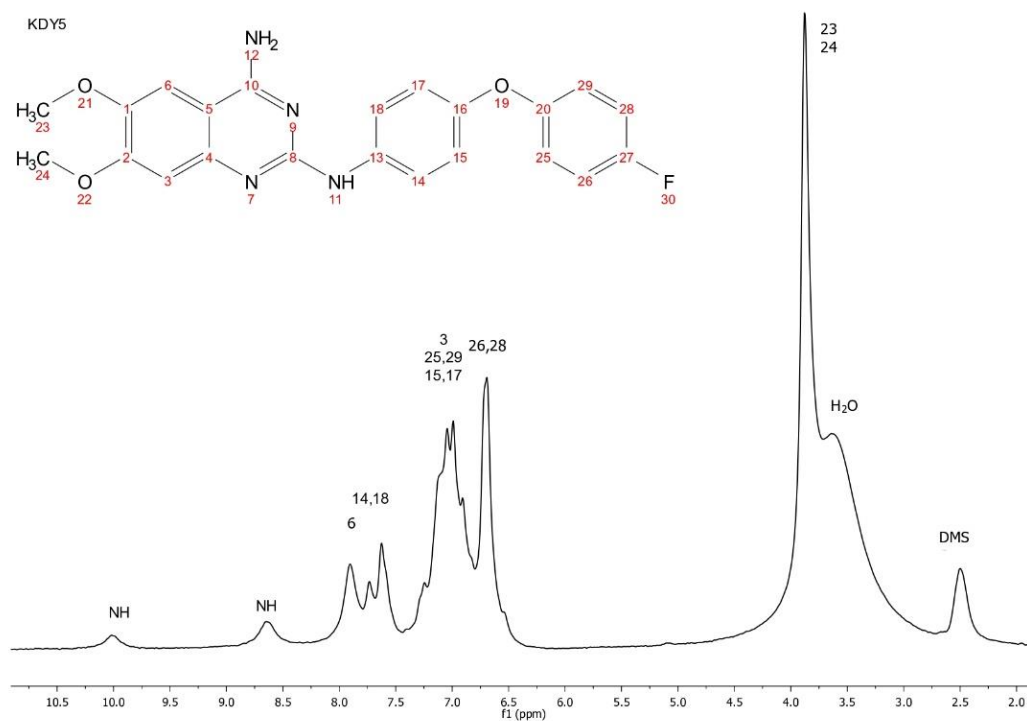
FONTE: Elaborada pela autora (2024)

Legenda: RMN de ^1H : ressonância magnética nuclear de hidrogênio

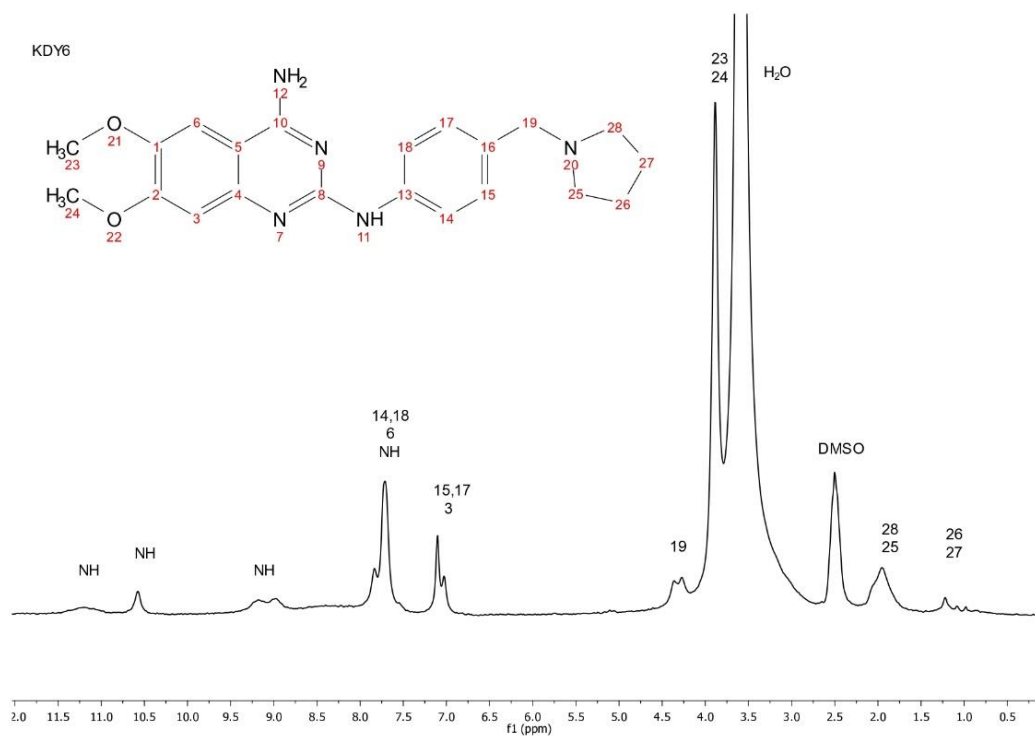
Figura marcada em verde corresponde aos picos presentes em ambos os precursores e no produto.

FIGURA 11: Espectro de RMN ^1H de KDY3 em DMSO d_6 com suas atribuições.

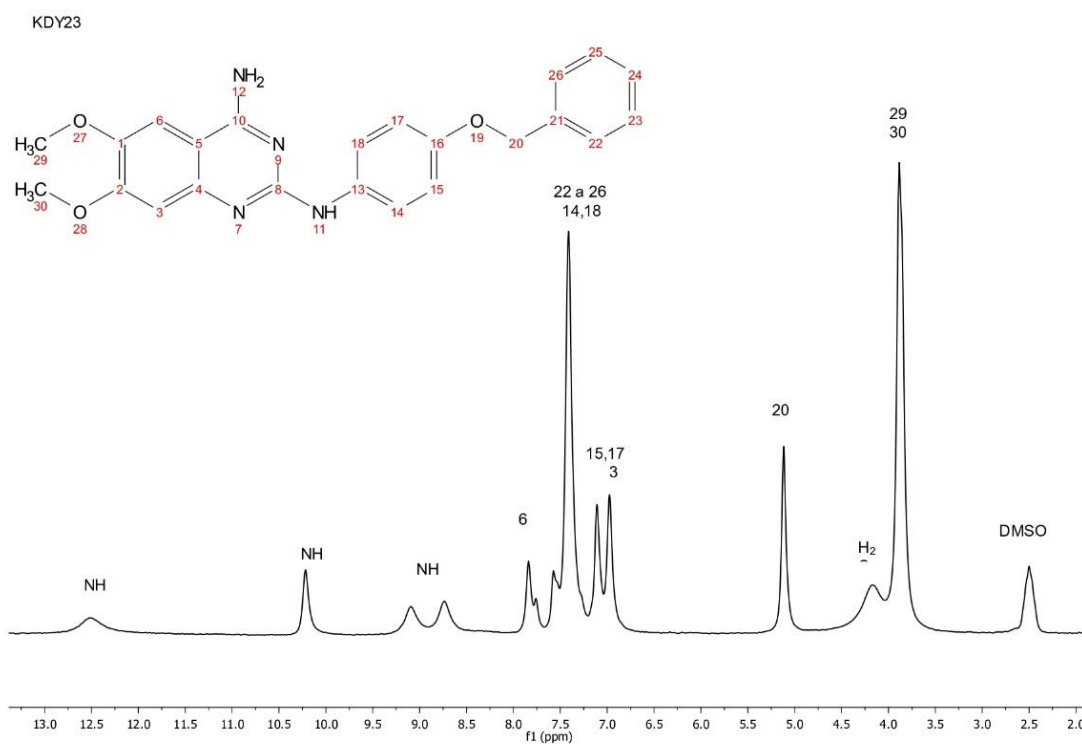
Fonte: Própria autora (2024).

FIGURA 12: Espectro de RMN ^1H de KDY5 em DMSO d_6 com suas atribuições.

Fonte: Própria autora (2024).

FIGURA 13: Espectro de RMN ^1H de KDY6 em DMSO d_6 com suas atribuições.

Fonte: Própria autora (2024).

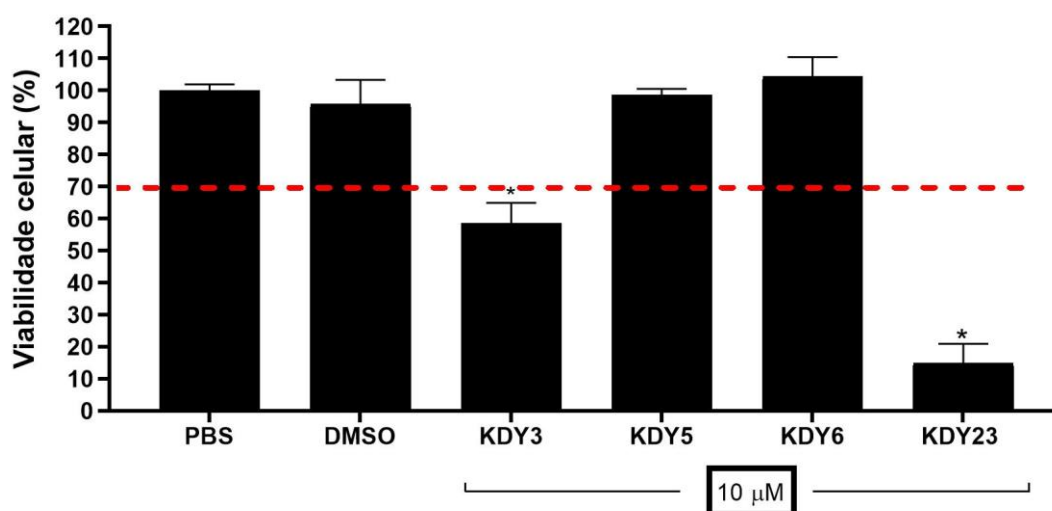
FIGURA 14: Espectro de RMN ^1H de KDY23 em DMSO d_6 com suas atribuições.

Fonte: Própria autora (2024).

6.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS U87-MG APÓS TRATAMENTO COM KDYS.

A verificação da viabilidade das células é fundamental para grande parte dos ensaios *in vitro*. A avaliação da citotoxicidade é rotineiramente realizada por meio do ensaio de MTT, um método colorimétrico baseado na avaliação da atividade metabólica celular. O mecanismo bioquímico do teste envolve enzimas oxidoredutases celulares dependentes de NAD(P)H que convertem o corante de MTT insolúvel, por meio da redução do seu anel tetrazólico, em cristais solúveis de formazan (BAHUGUNA *et al.*, 2017). Os resultados dos ensaios de viabilidade das células após tratamento com KDY3, KDY5, KDY6, KDY23 (todos na concentração de 10 μ M) pelo período de 24 horas, estão representados na FIGURA 15. A escolha do tempo de tratamento foi realizada conforme ensaios previamente descritos na literatura (SOUSA *et al.*, 2015; MONTALDI 2009).

FIGURA 15: Viabilidade das células de GBM U87-MG após tratamento com KDYS.



FONTE: Elaborada pela autora (2024)

* $p < 0,05$ vs DMSO. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Diante dos resultados apresentados na FIGURA 15 pode-se observar que KDY3 reduziu aproximadamente 42% da viabilidade celular, já os tratamentos com KDY5 e KDY6 não reduziram significativamente a viabilidade. O tratamento com KDY23 reduziu significativamente a viabilidade celular (85%). Os resultados obtidos de KDY23 foram muito promissores, principalmente se compararmos com dados na literatura da TMZ, fármaco de primeira escolha no tratamento do GBM. No trabalho

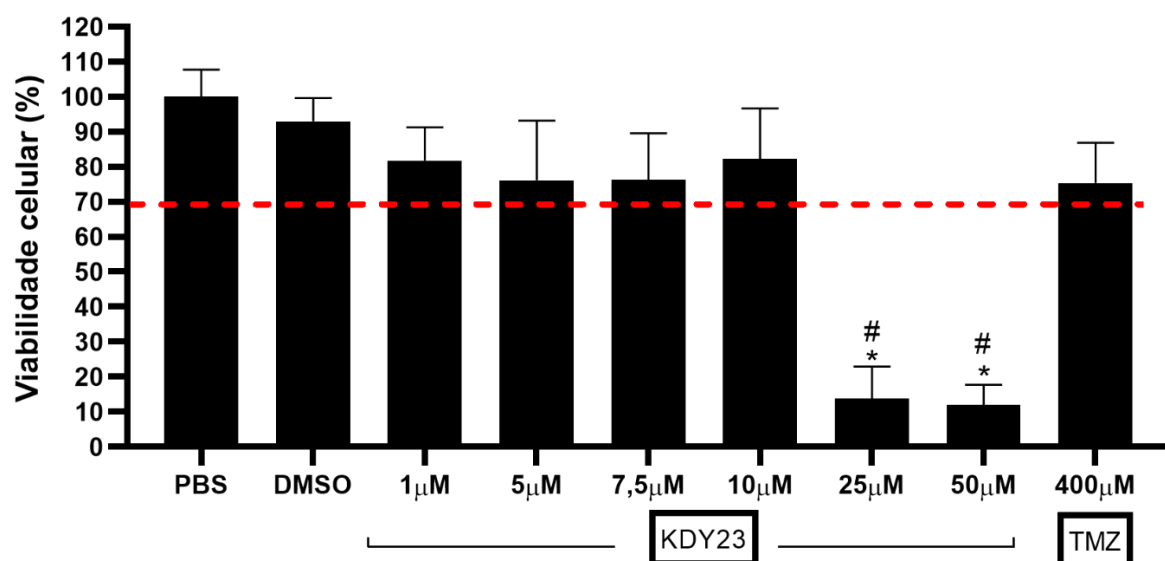
desenvolvido por Tresch *et al.* (2021) onde avaliava dentre outros a viabilidade celular *in vitro* de células gliais humanas e caninas utilizando diferentes dosagens de TMZ, foi demonstrado que para a linhagem U87-MG a dosagem de TMZ utilizada para diminuir a viabilidade das células em 91% foi de 400 μ M, concentração muito superior à que foi utilizada nesse trabalho para KDY23.

No estudo realizado por Atif *et al.* (2015) foi realizada uma exposição repetida a diferentes concentrações de TMZ por 3 dias e não houve redução da viabilidade das células U87-MG, mesmo na concentração de 200 μ M. Após 6 dias de exposição repetida, a viabilidade das células apresentou uma diminuição nessa mesma concentração, mas de apenas 20%. Outro trabalho que apresentou alguns dados da viabilidade das células de TMZ utilizando o mesmo método e a mesma linhagem de células de GBM utilizada no presente estudo foi o realizado por Pazhouhi e colaboradores (2016). Foi testada a associação do fármaco à timoquinona a fim de avaliar um efeito sinérgico da TMZ. Os resultados apresentados demonstraram que a viabilidade das células após 24 horas de tratamento com TMZ associada a timoquinona numa concentração de 200 μ M reduziu um pouco mais de 20% a quantidade de células viáveis. Esses resultados expressivos de KDY23 direcionaram os demais ensaios para essa molécula no presente estudo, visto que foi a molécula com maior citotoxicidade apresentada nas células U87-MG.

6.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOSE-RESPOSTA DE KDY23 NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS U87-MG E T98G DE GLIOBLASTOMA.

Foram realizados novos ensaios de MTT para avaliar a viabilidade das células U87-MG com diferentes concentrações de KDY23 (1 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M) e em diferentes tempos de tratamento (6, 12 e 24 horas). Os resultados obtidos demonstraram que os tratamentos por 6 horas e 12 horas reduziram a viabilidade das células a partir da concentração de 25 μ M (FIGURAS 16 e 17). Já o tratamento por 24 horas reduziu a viabilidade das células a partir da concentração de 5 μ M (31,81%). Nos demais tratamentos: 7,5 μ M, 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M com KDY23 houve redução significativa da viabilidade das células, sendo observada a redução de, 68,98%, 85%, 95,03%, 96,04% respectivamente.

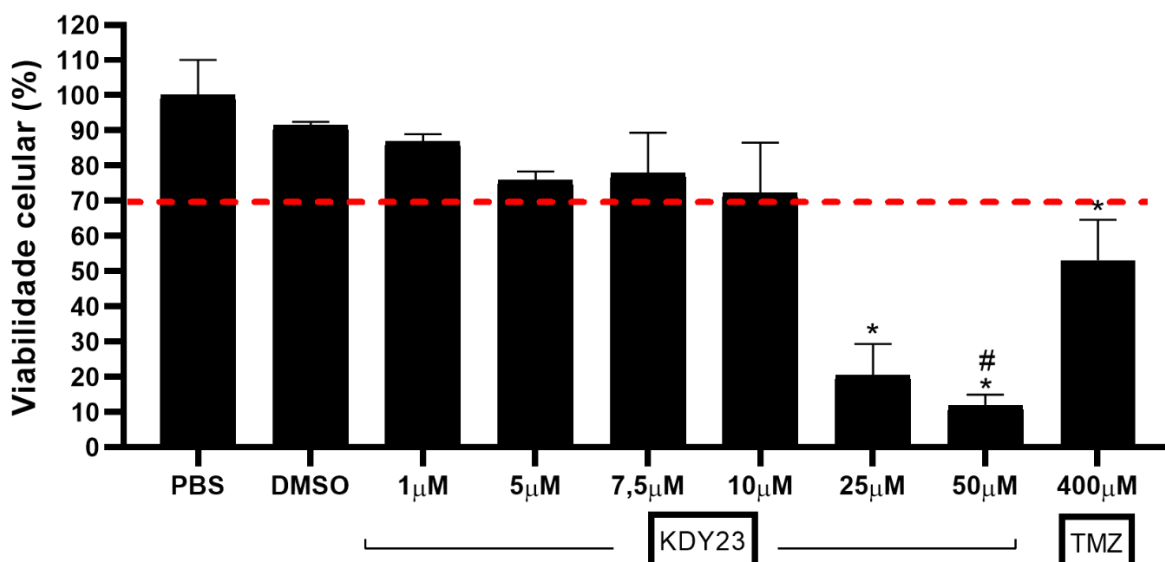
FIGURA 16: Avaliação de dose resposta de KDY23 frente a linhagem U87-MG de GBM (6 horas)



FONTE: Elaborada pela autora (2024)

* $p < 0,05$ vs DMSO, # $p < 0,05$ vs TMZ. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

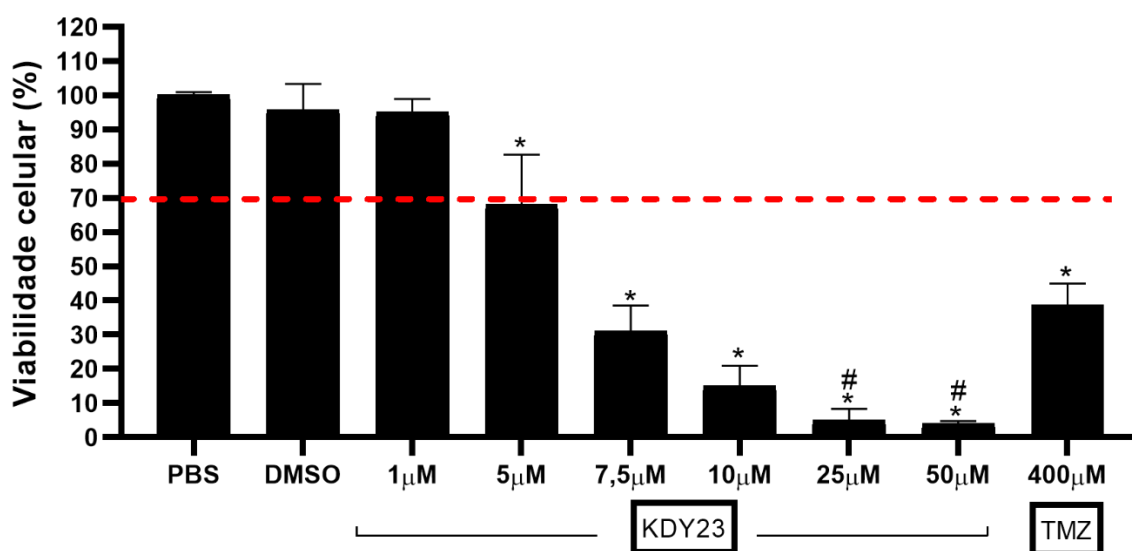
FIGURA 17: Avaliação de dose resposta de KDY23 frente a linhagem U87-MG de GBM (12 horas)



FONTE: Elaborada pela autora (2024)

* $p < 0,05$ vs DMSO, # $p < 0,05$ vs TMZ. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

FIGURA 18: Avaliação de dose resposta de KDY23 frente a linhagem U87-MG de GBM (24 horas)

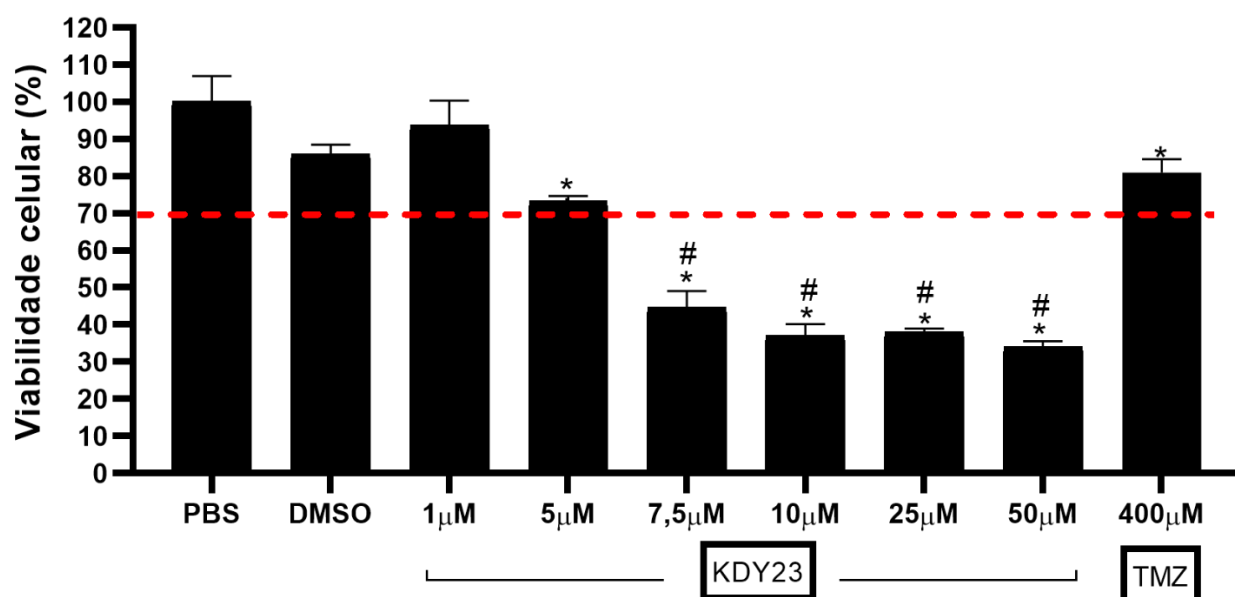


FONTE: Elaborada pela autora (2024)

* $p < 0,05$ vs DMSO, # $p < 0,05$ vs TMZ. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

A partir dos resultados, foram realizados ensaios de viabilidade das células com a linhagem T98G nas mesmas concentrações (1 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M), pelo tempo de 24 horas. A FIGURA 19 demonstra que KDY23 apresentou o mesmo perfil citotóxico da linhagem U87-MG. A linhagem T98G também só não induziu alteração significativa da viabilidade das células na concentração de 1 μ M, apresentado uma diminuição de 6,39%. Nos demais tratamentos: 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M com KDY23 houve redução significativa da viabilidade das células, sendo observada a redução de 26,65%, 55,48%, 63,04%, 62,02%, 66,02% respectivamente.

FIGURA 19: Avaliação de dose resposta de KDY23 frente a linhagem T98G de GBM.



FONTE: Elaborada pela autora (2024)

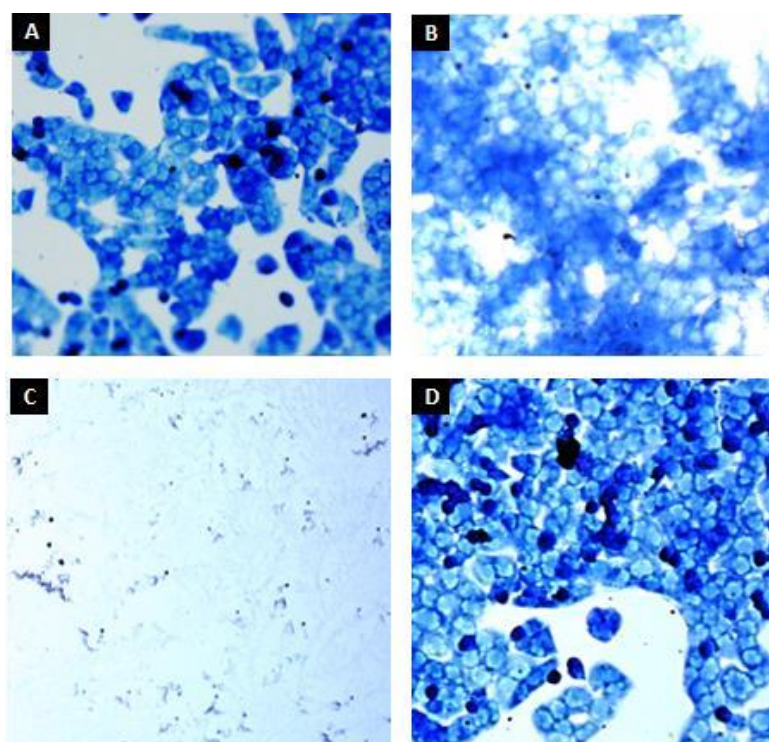
* $p < 0,05$ vs DMSO, # $p < 0,05$ vs TMZ. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Embora KDY23 tenha apresentado resultados satisfatórios para ambas as linhagens nota-se que a redução de viabilidade celular foi maior em U87-MG, isso pode ser explicado pelo perfil genético e molecular de T98G. A linhagem T98G apresenta superexpressão de vários genes de reparo de DNA como *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), *BRCA2* (*Breast Cancer 2*), *BRIP1* (*BRCA1 Interacting Protein C-terminal Helicase 1*), *EXO1* (*Exonuclease 1*), *NEIL3* (*Nei Endonuclease VIII-like 3*), *RAD54L* (*RAD54- Like*) e *XRCC2* (*X-ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 2*). Tal característica pode ser associada com maior agressividade do tumor, além de promover maior resistência ao tratamento (BOBOLA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2015; TELL *et al.*, 2005). Interessantemente, uma das principais diferenças entre as linhagens reside na resistência à TMZ: enquanto a U87-MG apresenta sensibilidade, T98G é descrita como resistente ao fármaco, ambas características inerentes às linhagens (LEE, 2016), comportamento que pôde ser observado nos resultados dos ensaios de viabilidade (FIGURAS 18 e 19). Em estudo com a T98G, Pinevich e colaboradores (2022) reportaram que apenas a dose máxima de 5 mM de TMZ foram capazes de inibir a proliferação das células, o que pode ser atribuído aos altos níveis de expressão do gene *MGMT* encontrados em células naturalmente resistentes à TMZ (POON *et al.*, 2021; TRESCH *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que embora se trate de resultados *in vitro* e que demande realização de ensaios mais específicos e avaliação do comportamento de KDY23 *in vivo*, são resultados promissores. Os resultados obtidos quando comparados a TMZ, KDY23 demonstrou citotoxicidade maior *in vitro*

A partir dos resultados obtidos, os demais ensaios foram realizados tratando as células pelo tempo de 24 horas. A FIGURA 20 ilustra a morfologia das células T98G após o tratamento com TMZ 400 μM (**A**), após o tratamento com DOXORUBICINA (DOXO) 10 μM (**B**), após o tratamento com KDY23 na concentração de 10 μM (**C**), e no controle (PBS) (**D**), coradas com azul-de-metileno (0,5%) e observadas ao microscópio óptico.

FIGURA 20: Imagens das células T98-G após o tratamento por 24 horas coradas com azul de metileno a 0,5%.



FONTE: Elaborada pela autora (2024).

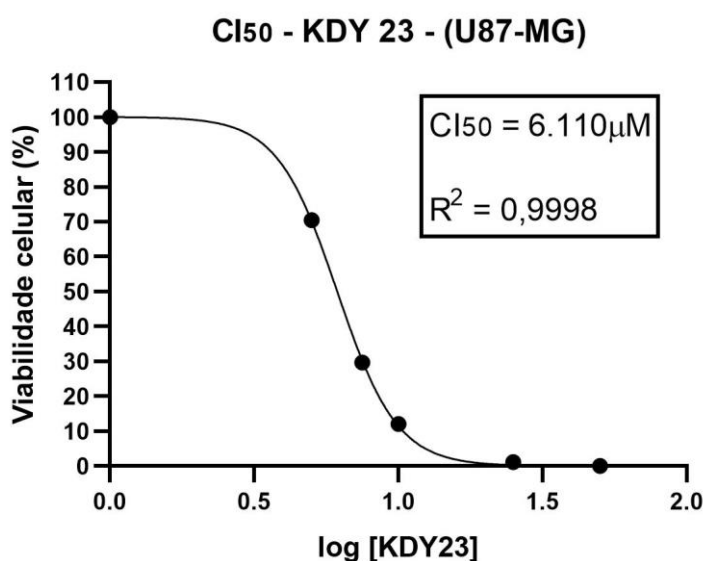
Legenda: (**A**) TMZ 400 μM , (**B**) DOXO 10 μM , (**C**) KDY23 10 μM e PBS (**D**). Aumento de 20x

O azul-de-metileno é um corante básico que reage com os componentes ácidos da célula, com isso é possível visualizar o núcleo corado de azul-escuro e o citoplasma corado de azul-claro, embora não corado também é possível observar a membrana citoplasmática delimitando o citoplasma (JUNIOR, 2014). Diante da análise dessas

imagens é nítido a expressiva redução do número de células T98G após o tratamento com KDY23 comparadas ao controle (PBS) e aos demais tratamentos. Não sendo possível sequer uma delimitação morfológica dessas células já que os campos observados no microscópio óptico se apresentavam em sua maioria praticamente vazios, apresentando apenas o que se parece com resíduos celulares. O tratamento com TMZ e DOXO demonstram uma diminuição no número de células e alteração da morfologia quando comparados ao controle (PBS), no entanto visualmente essas imagens corroboram com os demais resultados obtidos através dos ensaios de viabilidade celular sendo o tratamento com KDY23 o mais eficaz e expressivo contra as células de glioblastoma.

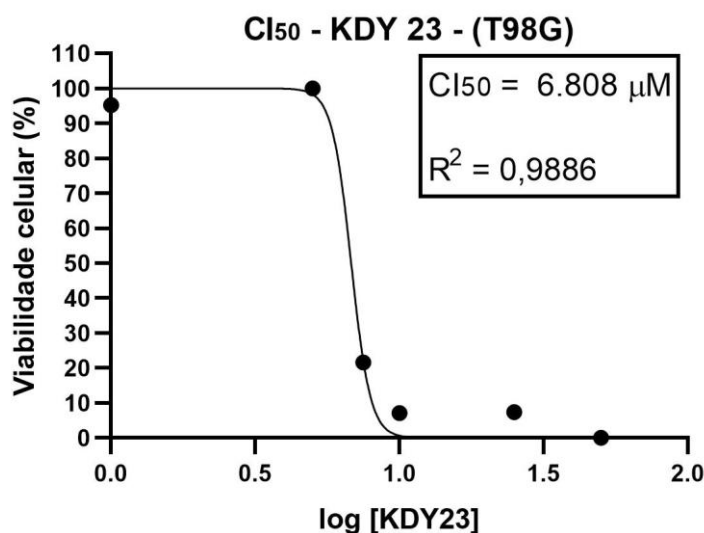
A partir dos dados obtidos na análise de dose resposta foi calculado o valor da concentração inibitória responsável por diminuir 50% da viabilidade celular (CI_{50}) de KDY23 nas linhagens U87-MG e T98G. Posteriormente, foi feita análise de regressão não linear e plotado um gráfico com a viabilidade em porcentagem *versus* log da concentração de KDY23. Conforme indicado na FIGURA 21, a CI_{50} de KDY23 nas células U87-MG foi de 6,11 μ M. Já na linhagem T98G a concentração que reduziu 50% da sua viabilidade celular foi de 6,80 μ M como ilustrado na FIGURA 22.

FIGURA 21: Gráfico de CI_{50} de KDY23 frente as células U87-MG



FONTE: Elaborada pela autora (2024)

Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

FIGURA 22: Gráfico de CI_{50} de KDY23 frente as células T98G

FONTE: Elaborada pela autora (2024)

Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Em uma revisão realizada por Poon *et al.* (2021) foi avaliada a sensibilidade à TMZ medida pela metade da concentração inibitória máxima (CI_{50}) em diferentes linhagens celulares estratificadas pelo tempo de exposição à TMZ. A dose utilizada para linhagem U87-MG foi de 240,0 µM (POON *et al.*, 2021). No trabalho realizado por Pojo *et al.* (2015) foi avaliado o papel do oncogene *HOXA9* na viabilidade, morte e invasão de células GBM, sob condições basais e tratamento com TMZ. Foi mensurado os valores da meia concentração inibitória (CI_{50}) após 6 dias de tratamento com TMZ em dois grupos utilizando a linhagem U87-MG, um grupo com o gene *HOXA9* silenciado e o outro grupo sem silenciamento do gene. Para as células U87-MG que silenciaram o oncogene *HOXA9*, o valor de CI_{50} encontrado foi de 578 µM e para as células que não houve o silenciamento do gene *HOXA9*, o valor de CI_{50} foi indeterminado.

Fuster e colaboradores (2022) expuseram o transcriptoma de T98G de GBM a pontos quânticos de cádmio-selênio por 72 horas. E a concentração que inibiu 50% da viabilidade celular de T98G foi de 250 µg/mL, resultado considerado promissor

embora para que aplicações dos pontos quânticos possam ser autorizadas, seria necessária uma avaliação toxicológica.

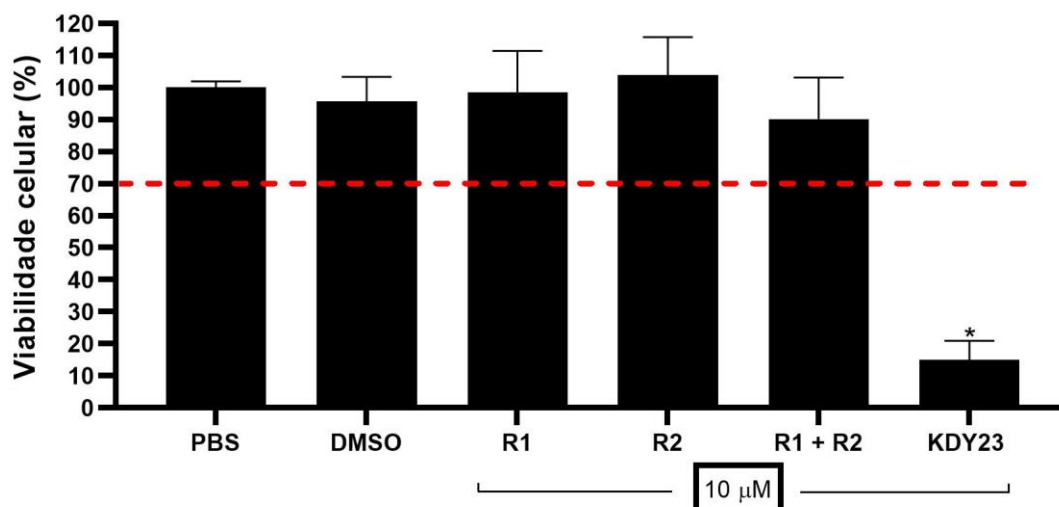
Em uma revisão sistemática realizada por Poon *et al.*, (2021) foi avaliada a sensibilidade a TMZ de linhagens celulares de glioma maligno e determinaram a média dos valores de CI_{50} tanto para a linhagem U87-MG como T98G. Foi calculado a média de 56 estudos que utilizaram a TMZ frente a T98G e a concentração que diminui 50% da viabilidade celular foi de 438,3 μ M em 72 horas de tratamento.

O que se observa diante dos resultados obtidos no presente trabalho é que KDY 23 utiliza de doses muito baixas para a diminuição da viabilidade celular de GBM, sugerindo maior eficácia *in vitro* comparada a outras terapias, inclusive ao fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença.

6.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS U87-MG APÓS TRATAMENTO COM OS PRECURSORES DE KDY23

Foi avaliado também, utilizando o mesmo ensaio de MTT, a viabilidade das células U87-MG após tratamento com os precursores de KDY23, afim de verificar se os radicais isolados dos precursores apresentam potencial em diminuir a viabilidade das células U87-MG. A FIGURA 23 mostra que os precursores sozinhos (R1 e R2) ou misturados (R1+R2) (concentração de 10 μ M) não diminuíram a viabilidade das células. O resultado obtido sugere que o efeito citotóxico apresentado nas células de glioblastoma foi devido a presença da molécula sintetizada KDY23.

FIGURA 23: Avaliação da viabilidade celular de U87-MG após tratamento com os precursores de KDY23.



FONTE: Elaborada pela autora (2024)

* $p < 0,05$ vs DMSO. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

R1: 4-amino-2-cloro-6,7-dimethoxiquinazolina

R2: 4-benziloxi anilina hidrocloreto

O desenho, a síntese e a avaliação biológica das quinazolininas são dados como potentes inibidores de múltiplos alvos intracelulares, incluindo microtúbulos e múltiplos RTQ (SIRISOMA *et al.*, 2008). Um estudo realizado por Choudhary *et al.*, (2021) demonstrou que as atividades multialvo das moléculas derivadas de quinazolininas podem afetar múltiplas vias e podem exercer seu potencial antitumoral contra múltiplos alvos.

O PHA-848125 (N ,1,4,4-tetrametil-8-[[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]amino]-4,5-di-hidro-1H - pirazolo[4,3-h]quinazolina-3-carboxamida) é um derivado de quinazolina inibidor multiquinase com ampla atividade antitumoral em estudos pré-clínicos com boa tolerabilidade em estudos de fase 1. Estima-se que essa molécula atue afetando duas vias principais envolvidas na patogênese do GBM, a via de controle da progressão da fase G1-S através da inibição de CDKs e as vias de sinalização mediadas por receptores de fator de crescimento de tirosina quinase, como os receptores de tropomiosina (ALBANESE *et al.*, 2013).

Albanese e colaboradores em 2013 testaram a eficácia dessa molécula *in vitro* frente a várias linhagens de GBM, onde houve redução expressiva da viabilidade celular após o tratamento. Além disso, através de estudos em modelos experimentais os autores demonstraram que a molécula ultrapassava a BHE.

SUN *et al.*, realizaram um estudo em 2020 onde sintetizaram 17 novas moléculas com oxazina tricíclica e quinazolinas fundidas com oxazepina e testaram o efeito antitumoral *in vitro* de todas as novas moléculas sintetizadas em cinco linhagens celulares: carcinoma gástrico humano, carcinoma epidermóide humano, adenocarcinoma humano, e câncer de mama humano, a inibição do crescimento foi observada para a maioria das moléculas. Duas obtiveram capacidade de inibição mais notável que medicamentos já aprovados pelo FDA, lapatinibe, gefitinibe e erlotinibe.

Fourth e colaboradores em 2021 utilizaram uma série de pirimidodiazepínicos à base de quinazolina e sintetizaram pela reação de ciclocondensação de 2-cloro-4-anilinoquinazolina-chalconas com 2,4,5,6-tetraaminopirimidina. Todos os derivados de quinazolinas foram selecionados pelo *National Cancer Institute* (NCI) para testar sua atividade anticancerígena contra 60 linhagens de células tumorais de diferentes tipos de cânceres humanos. Entre as moléculas testadas, quinazolina-chalcona apresentou alta atividade antiproliferativa das linhagens celulares RPMI-8226 de leucemia, HCT-116 de câncer de cólon, LOX IMVI de melanoma e linhagens celulares de câncer de mama MCF7.

Sirisoma *et al.*, (2008) utilizando um ensaio de ativador de caspase-3 de alto rendimento em células vivas, identificaram uma nova série de 4-anilinoquinazolinas como indutoras de apoptose. Além de descobrirem a molécula 2-cloro- N- (4-metoxifenil) -N -metilquinazolin-4-amina, como um indutor altamente ativo de apoptose e como potente inibidor da proliferação celular em células T47D. A molécula inibiu a polimerização da tubulina, foi eficaz em células que superexpressam o transportador ABC Pgp-1 e foi eficaz nos modelos de camundongos de câncer de próstata MX-1.

Em 2018, Lin *et al.*, relataram uma série de derivados de quinazolinas como potenciais inibidores de PI3K. Entre as moléculas sintetizadas, duas exibiram capacidade de inibição efetiva contra isoformas PI3K e linhagens celulares de glioma. Uma delas demonstrou excepcional seletividade de proteínas quinases, exibiu inibição significativa do crescimento tumoral de > 90% no modelo de xenoenxerto cerebral U87-MG e demonstraram perfis de segurança aceitáveis.

São conhecidas as propriedades biológicas e farmacológicas dos derivados de quinazolinas, por isso parecem ser uma escolha atraente de solução terapêutica. Várias quinazolinas já foram aprovadas para uso clínico como drogas anticancerígenas pela FDA dos EUA. Há esperança de que a síntese de novos

derivados de quinazolininas e o desenvolvimento de métodos de sua aplicação possam contribuir para o estabelecimento de terapias altamente eficazes para pacientes oncológicos (SZEWC *et al.*, 2022).

No entanto sabe-se que dentre os muitos desafios no tratamento do glioblastoma envolve questões relacionadas à entrega ao cérebro, pois a existência da BHE diminui a eficiência da entrega sistêmica de fármacos ao tumor-alvo no cérebro (ESTANQUEIRO *et al.*, 2015).

As propriedades físico-químicas, como tamanho e carga da partícula, lipofilicidade, permeabilidade e taxa de dissolução, da ferramenta de administração de fármacos influenciam diretamente o potencial das moléculas de atravessar a BHE (THAKUR *et al.*, 2022). Muito embora o enfoque desse trabalho não seja em estratégias direcionadas a demonstrar que a molécula KDY23 tenha capacidade de atravessar a BHE, uma vez que se trata do estudo de uma doença que atinge a região cerebral, já foi demonstrado por inúmeros trabalhos estratégias que possam permitir ou melhorar a perfusão nesse local (THAKUR *et al.*, 2022).

Certas características podem ser personalizadas selecionando um sistema transportador e uma composição adequada usando metodologia de formulação adequada, modificação da química da superfície e enxerto da superfície com ligantes específicos. Nos últimos anos, muitos trabalhos foram realizados nesta área, e várias abordagens foram exploradas para melhorar a biodistribuição específica, as características de superfície e o direcionamento de fármacos anticancerígenos (THAKUR *et al.*, 2022; CHO *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que tem sido relatado que as moléculas contendo nitrogênio terciário (atributos estruturais de numerosas fármacos do SNC) exibem maior grau de permeação cerebral (TOFT *et al.*, 1987; THAKUR *et al.*, 2022).

Uma possibilidade viável poderia ser a utilização de nanotecnologia, empregando metodologias para preparar materiais e dispositivos com características e tamanhos únicos, muitas vezes na faixa de 1 a 100 nanômetros. As nanopartículas poliméricas demonstraram aumentar a biodisponibilidade do fármaco para as células cancerosas, ao mesmo tempo em que superam a resistência a múltiplos fármacos, proporcionando assim uma entrega segura através da circulação sistêmica e através da administração oral direta, se adotada (KADHIM *et al.*, 2022; BAHJAT *et al.*, 2022; PATRA *et al.*, 2018).

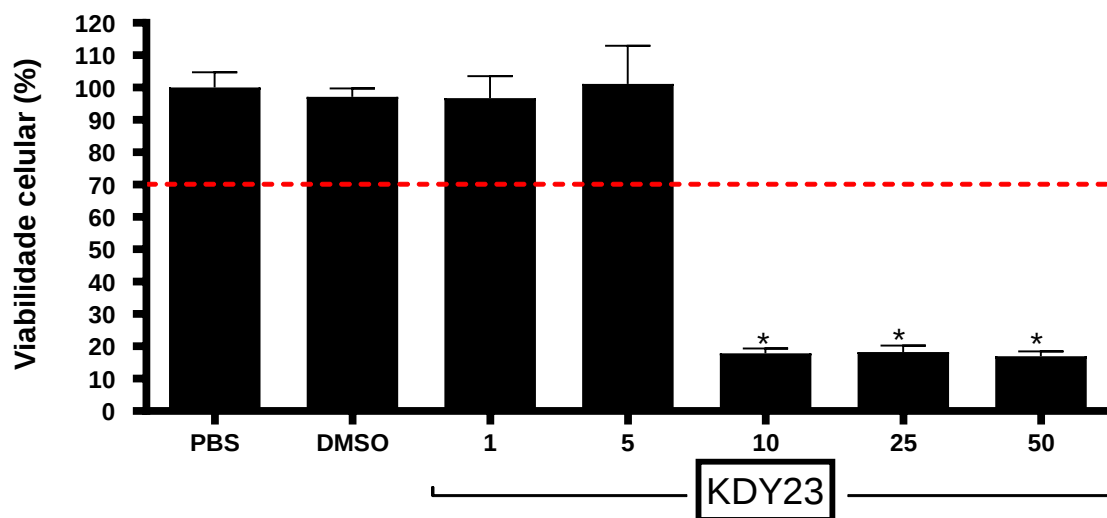
A TMZ embora seja o fármaco de primeira escolha no tratamento quimioterápico de GBM tem eficácia farmacológica reduzida devido à sua baixa biodisponibilidade. Essa baixa biodisponibilidade pode ocorrer devido a uma baixa permeabilidade através da BHE e das membranas das células tumorais (BAHJAT *et al.*, 2022). Um estudo conduzido por Kadhim e colaboradores em 2022 realizou o nanoencapsulamento de TMZ com dois polímeros diferentes chamados ácido polilático-co-glicólico PLGA e o álcool polivinílico (PVA). As nanopartículas produzidas foram capazes de atravessar a BHE e atingir as células-alvo, demonstrando assim a biodisponibilidade aprimorada por meio da penetração aprimorada do nanotransportador nas células malignas. Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir ensaios posteriores com a molécula KDY23 em modelos de xenoenxertos em animais e ensaios de nanoencapsulamento.

6.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE KDY23 NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MACRÓFAGOS J774.A1 E RAW 264.7

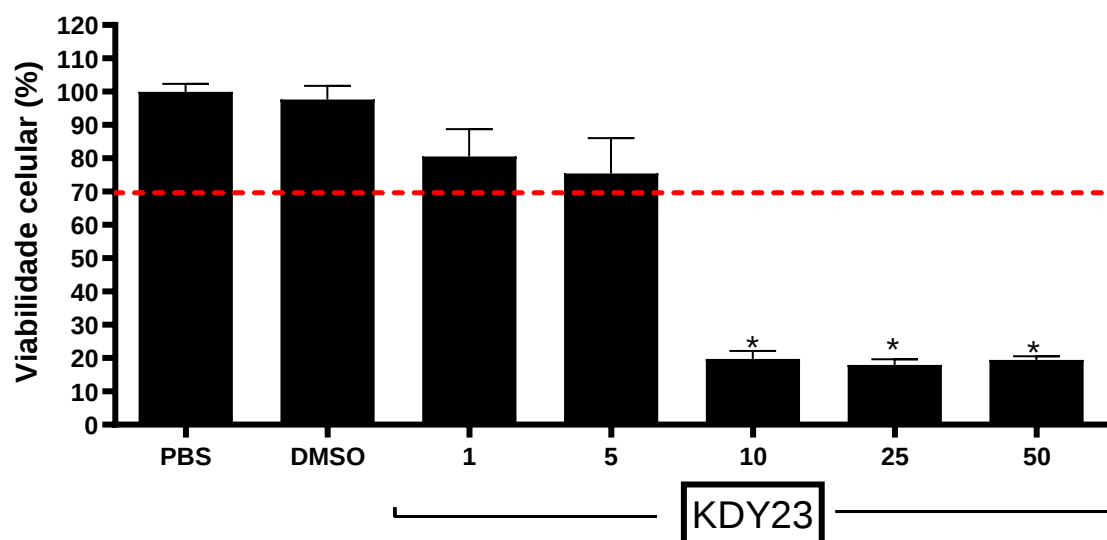
Diante dos resultados promissores obtidos nas linhagens de células de GBM U87-MG e T98G, foi avaliada a viabilidade de células não tumorais de macrófagos (J774. A1 e RAW 264.7) após tratamento com KDY23. A FIGURA 24a mostra os resultados dos ensaios de viabilidade das células após tratamento com KDY23 nas concentrações 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M na linhagem J774. A1. O tratamento com KDY23 nas concentrações 1 μ M e 5 μ M não reduziram significativamente a viabilidade das células. Os tratamentos com 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M de KDY23 reduziram significativamente a viabilidade das células, sendo observada a redução de 80,9%; 83% e 84,6%, respectivamente. Já a FIGURA 24b mostra os resultados dos ensaios de viabilidade das células após tratamento com KDY23 nas concentrações 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M na linhagem RAW 264.7. O padrão de resultados de viabilidade das células após tratamento com KDY23 nessa linhagem foi semelhante a J774. A1, não induzindo alteração significativa da viabilidade nas concentrações 1 μ M e 5 μ M, já nas concentrações maiores de KDY23 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M houve uma expressiva redução da viabilidade das células.

FIGURA 24: Avaliação da viabilidade das células de macrófagos J774.A1 (a) e RAW 264.7 (b) após tratamento com KDY23.

(a)



b)



FONTE: Elaborada pela autora (2024)

*p<0,05 vs DMSO. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o tratamento com KDY23 também reduz a viabilidade das linhagens de células RAW 264.7 e J774.A1, apresentando perfil citotóxico semelhante na concentração de 10 μ M àquele mostrado nas células U87-MG e T98G. Nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M, KDY23 apresentou maior citotoxicidade nas células U87-MG comparadas às células RAW 264.7 e

J774.A1. Embora a seletividade seja uma característica positiva em um quimioterápico, a grande maioria dos fármacos hoje disponíveis para tratamento de câncer atinge também as células não cancerosas, isso acontece também com a TMZ que embora seja o fármaco padrão para tratamento de GBM apresenta, dentre alguns pontos negativos já citados nesse trabalho, uma toxicidade severa o que desencadeia vários efeitos colaterais (RAMALHO *et al.*, 2019; KADHIM *et al.*, 2022).

A quimioterapia tradicional afeta as principais vias de sinalização, proliferação celular, sobrevivência, migração, adesão, diferenciação e superexpressão em vários tumores sólidos (CUARTAS *et al.*, 2021). Por essa razão a seletividade é uma questão desafiadora no tratamento de câncer, pois as células normais muitas vezes utilizam essas vias de sobrevivência. A maioria dos agentes anticancerígenos atuais não diferencia entre células cancerígenas e normais, levando a toxicidade sistêmica e efeitos adversos, limitando a dose máxima do fármaco. Além disso, a rápida eliminação e ampla distribuição em órgãos e tecidos-alvo requer a administração de uma droga em grandes quantidades, o que torna o tratamento mais caro e resulta em toxicidade indesejável (SINHA *et al.*, 2006; ESTANQUEIRO *et al.*, 2015).

A própria TMZ por exemplo leva à morte celular promovendo a metilação do DNA, uma vez que promove essa ação em outras células normais (RAMALHO *et al.*, 2019). A toxicidade no tratamento do câncer é encontrada não somente na quimioterapia, um estudo de meta análise realizado em 2018 por Pasquali *et al.* avaliou tanto a efetividade quanto a toxicidade dos tratamentos disponíveis para melanomas cutâneos metastáticos. Segundo esse trabalho os inibidores do *checkpoint* imunológico aumentaram a toxicidade do tratamento em comparação com a quimioterapia. Assim, mesmo que KDY23 apresente citotoxicidade também para linhagens de células não tumorais, acredita-se que a baixa concentração (10 μ M) para reduzir a viabilidade das células seja um ponto favorável para a continuidade da pesquisa com essa molécula.

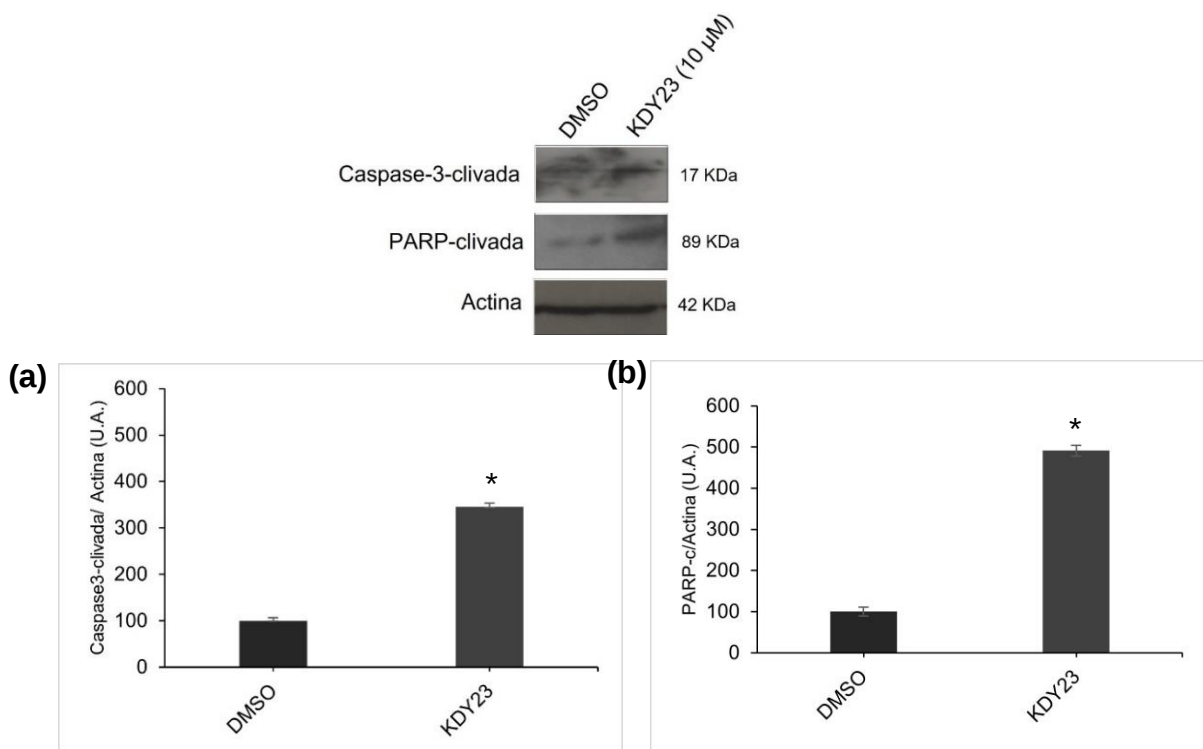
6.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE KDY23 NA APOPTOSE DAS CÉLULAS U87-MG.

A fim de pesquisar o mecanismo de morte das células que a molécula KDY23 provoca nas células de glioblastoma utilizou-se o método de *western blotting*, para avaliar as proteínas relacionadas com a apoptose como a caspase-3-clivada e a PARP-clivada. Para os ensaios de *western blotting* foi utilizado como controle dos

experimentos o solvente DMSO, visto que a quantidade de células necessárias para os experimentos é grande e assim foi necessário diminuir as amostras dos experimentos. É importante ressaltar que, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, DMSO não diminuiu significativamente a viabilidade celular e assim pode ser usado como controle. A FIGURA 25 mostra a presença das proteínas capase-3-clivada e PARP-clivada nas células tratadas com KDY23 na concentração de 10 μ M. Foi feita análise semiquantitativa do *western blotting* normalizando-se os valores de PARPc e caspase 3 clivada pelo valor de densitometria β actina. Ao realizar a quantificação da densitometria das bandas, foi observado um aumento na quantidade da proteína de aproximadamente 3,5 vezes de caspase-3 clivada no tratamento com KDY23 em relação ao controle (DMSO). Em relação a PARPc observou-se um aumento na quantidade da proteína de aproximadamente 5 vezes de PARPc no tratamento com KDY23 em relação ao controle (DMSO) (FIGURAS 25a e 25b).

A expressão de proteínas pró-apoptóticas nas células U87-MG após o tratamento com KDY23 demonstradas nesse trabalho são resultados muito promissores. Pesquisas realizadas sobre o processo de apoptose demonstram que este é um processo importante na quimioterapia do câncer, uma vez que a maioria dos fármacos anticancerígenos exerce seu efeito antitumoral a partir da indução de apoptose. Trabalhos na literatura têm demonstrado que fármacos convencionais, tais como flavopiridol, cisplatina, paclitaxel, doxorubicina, induzem apoptose em células tumorais *in vitro* (MIZUTANI *et al.*, 2005; BRENES *et al.*, 2007). Em muitos casos, a terapia anticancerígena eventualmente resulta na ativação de caspases, sendo que tal ativação em resposta à quimioterapia pode ser iniciada a partir da ativação da via extrínseca ou através da mitocôndria pela estimulação da via intrínseca (FULDA; DEBATIN, 2006).

FIGURA 25: *Western blotting* das proteínas envolvidas na morte celular por apoptose avaliadas nas células U87-MG após tratamento com KDY23 (10 μ M).



Fonte: Própria autora (2024).

* $p < 0,05$ vs DMSO. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Legenda: **(a)** Gráfico de barras mostrando expressão de caspase-3-clivada nas amostras controle (DMSO) e tratadas (KDY23). **(b)** Gráfico de barras mostrando expressão de PARP-c nas amostras controle (DMSO) e tratadas (KDY23).

Hsia *et al.*, (2022) avaliaram a ação anticancerígena de bisdemetoxicurcumina em células de GBM 8401/ luc2 *in vitro* e *in vivo*. Esse composto induziu apoptose por meio da inibição de BCL-2 (proteína anti-apoptótica) e aumento de BAX (proteínas pró-apoptóticas) e liberação de citocromo c. Nos testes *in vivo* foi observado a presença da caspase 3 ativada pelo tratamento com o referido composto em células xenoenxertadas.

Já Cheng *et al.*, (2017) avaliou a viabilidade celular e a indução de apoptose em células de GBM U87-MG após tratamento com um medicamento anti-helmíntico, a niclosamida. Utilizando a técnica de *western blotting* foi demonstrado que a niclosamida promove a apoptose em várias células cancerígenas, incluindo células U87-MG aumentando significativamente a expressão de PARP clivada.

6.9 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS U87-MG APÓS TRATAMENTO COM KDY23.

Para os ensaios de qRT-PCR foram realizados a extração de RNA total das células tratadas com KDY23 [10 µM] e TMZ [400 µM] e foi usado como controle o PBS. A TABELA 4 apresenta a quantificação do RNA total e os valores da razão da absorbância A260nm / A280nm, que demonstra a pureza do RNA extraído de um dos três experimentos independentes. O RNA extraído que apresenta valor de A260/280 igual ou maior que 2,0 é considerado relativamente livre de proteínas. Os valores apresentados indicam uma possível contaminação de proteínas, então foi adicionado ao mastermix 1,0 U µL de inibidor de RNase (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; Applied Biosystems, 2023, p. 26).

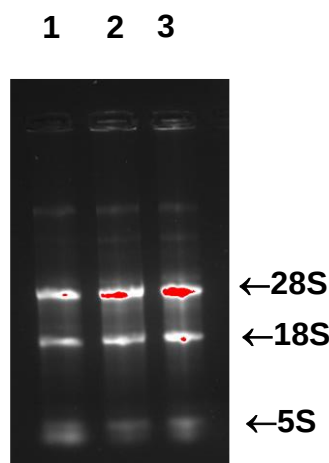
TABELA 4. Quantificação RNA total e razão da absorbância A260nm/ A280nm.

AMOSTRAS	Quantificação RNA total	Relação Abs 260/280
PBS	492 ng/µl	1,320
KDY23	467,2 ng/ µl	1,615
TMZ	479,6 ng/ µl	1,474

Fonte: Própria autora (2024).

A FIGURA 26 mostra a integridade do RNA total visualizado através de gel de agarose 1%.

FIGURA 26: Análise da qualidade das amostras de RNA total.

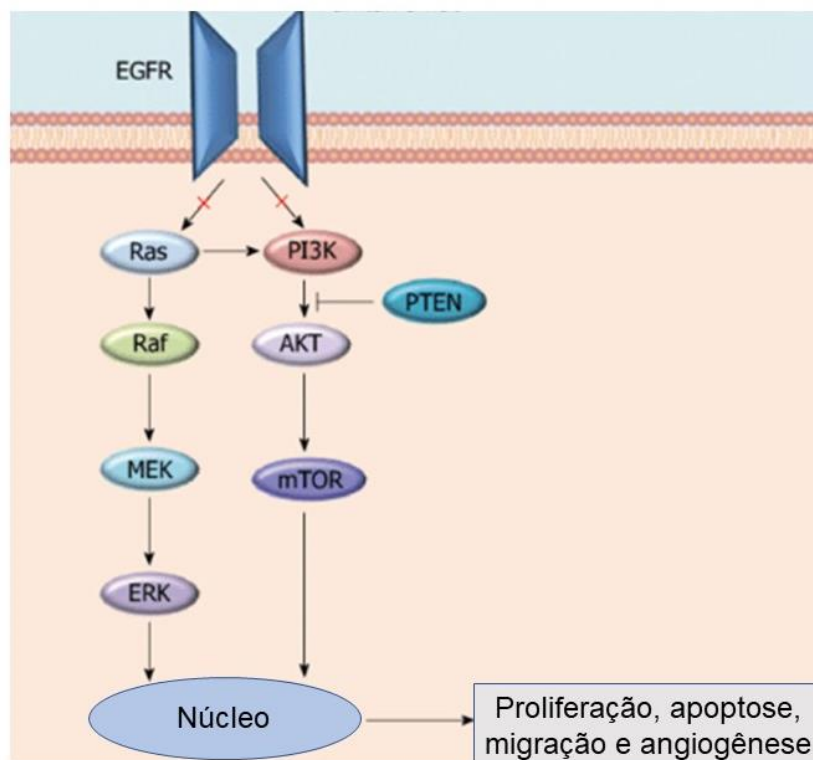


Fonte: Própria autora (2024).

Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando a presença das bandas correspondentes às frações do RNA ribossômico 28S, 18S e 5S. 1-2-3 amostras de RNA (PBS, KDY23, TMZ), respectivamente.

Através dos ensaios de qRT-PCR foi avaliada a expressão de genes relacionados com a sobrevivência e a proliferação celular afim de verificar a(s) via(s) de sinalização que são modificadas positiva ou negativamente após o tratamento com KDY23 em células U87-MG. Foram avaliados 9 genes sendo um deles o normalizador *GAPDH*. Os dados quantitativos de expressão gênica são frequentemente normalizados para os níveis de expressão de controle ou os chamados genes de "manutenção". Esse gene tem esse papel porque sua expressão permanece constante nas células ou tecidos sob investigação. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) é um dos genes de manutenção mais comumente usados em comparações de dados de expressão gênica (BARBER *et al.*, 2005). Além do *GAPDH* foram avaliados os genes: *EGFR*, *AKT-1*, *PI3K*, *m-TOR*, *MAPK1*, *MAPK3*, *NFκB-1* e *NFκB-2*. Todos esses genes expressam proteínas relacionadas as vias de proliferação, apoptose, migração e/ ou angiogênese celular. A FIGURA 27 mostra esquema ilustrativo da via EGFR/PI3K/AKT/mTOR. (FIGURA 27).

FIGURA 27: Esquema ilustrativo da via EGFR/PI3K/AKT/mTOR



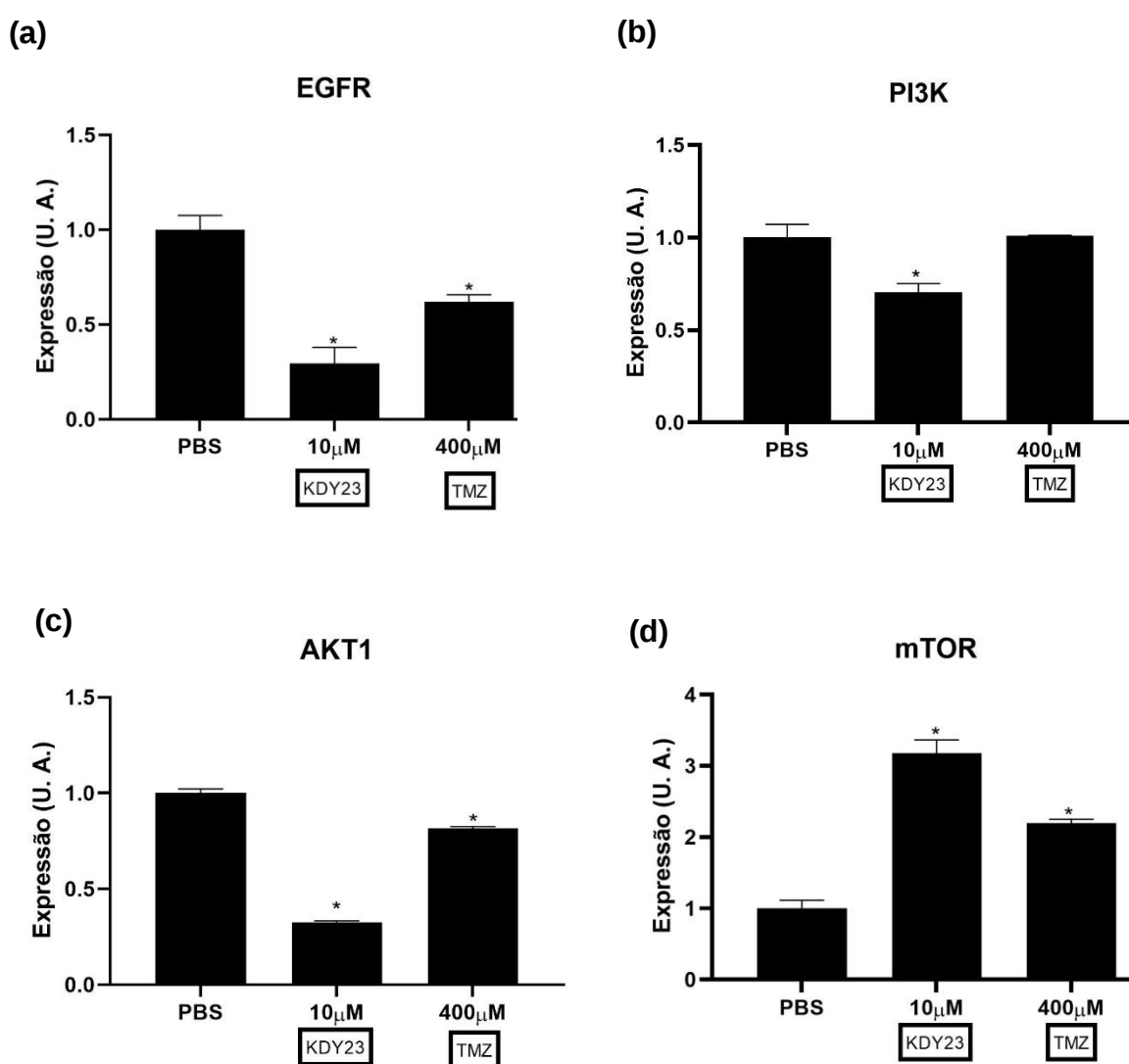
Fonte: SFORZA *et al.*, 2016 adaptado

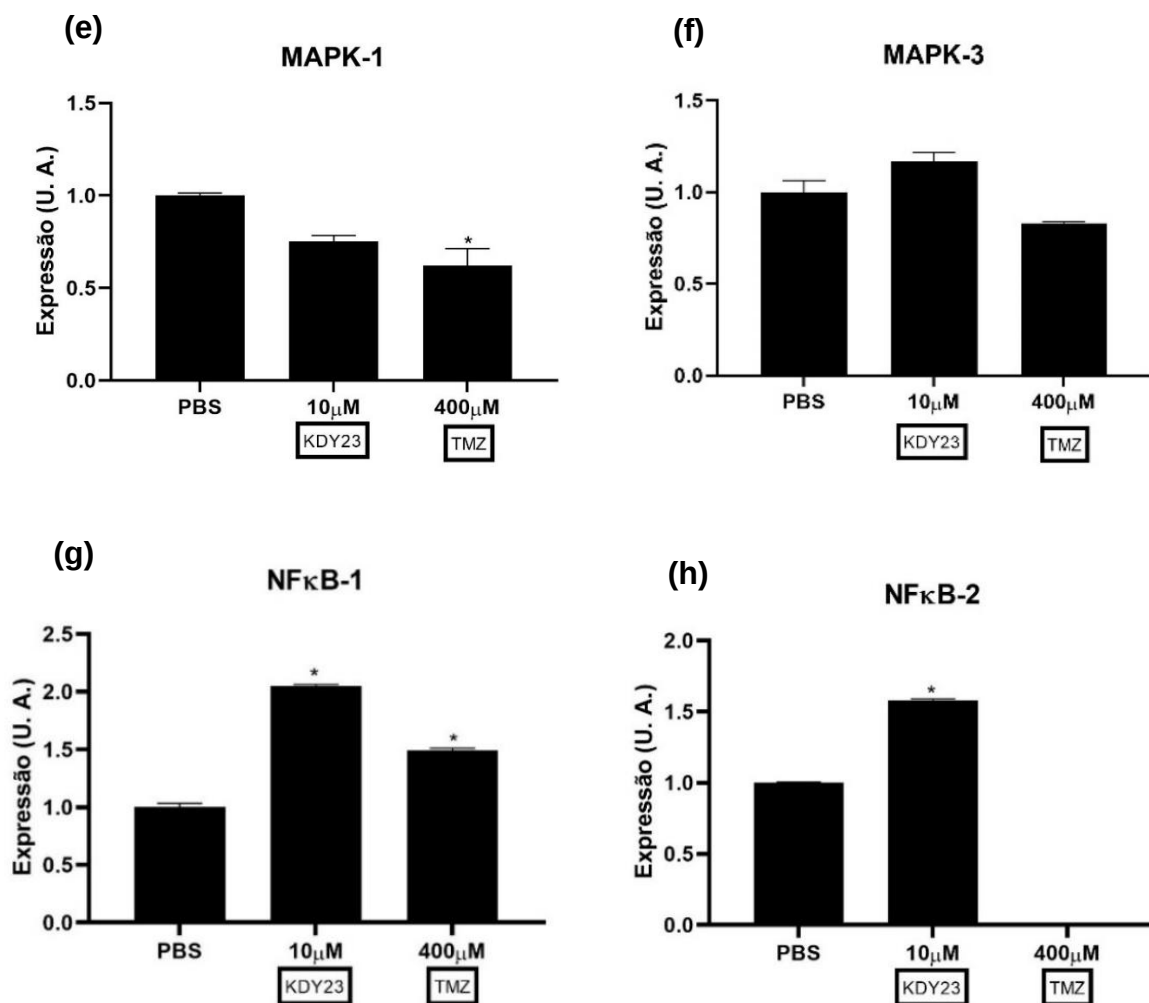
Legenda: A ligação de ligantes como o fator de crescimento epidérmico (EGF) ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) ativa entre outras vias, a via PI3K/AKT a jusante e regula vários processos fisiológicos.

A análise por PCR em tempo real do grupo tratado com KDY23 apresentou redução de aproximadamente 0,71 vezes no nível de RNA mensageiro de *EGFR* transcrito comparado ao grupo controle (PBS). O tratamento com TMZ reduziu aproximadamente 0,39 vezes em relação ao controle (PBS) (FIGURA 28a). Já em relação aos transcritos de *PI3K*, *AKT1* houve uma diminuição de aproximadamente 0,3 e 0,68 vezes respectivamente do tratamento com KDY23 quando comparado ao grupo controle (PBS). O tratamento com TMZ não demonstrou alteração estatisticamente significativa na expressão de *PI3K* e uma redução na expressão de *AKT1* em torno de 0,19 vezes comparado ao grupo controle (PBS) (FIGURAS 28b, 28c). O transcrito de *mTOR* apresentou aumento de aproximadamente 2,17 vezes comparado ao grupo controle (PBS). O tratamento com TMZ aumentou a expressão de *mTOR* em 1,2 vezes (FIGURA 28d). Já a expressão de *MAPK-1* e *MAPK-3* não apresentou alteração significativa nas células tratadas com KDY23. O tratamento com TMZ reduziu a expressão de *MAPK-1* em 0,38 vezes quando comparadas ao grupo

controle (PBS) (FIGURA 28e, 28f). As células U87-MG tratadas com KDY23 aumentaram a expressão de *NFκB-1* e *NFκB-2* em 1 e 0,58 vezes respectivamente, o tratamento com TMZ aumentou a expressão de *NFκB-1* em 0,49 vezes e não apresentou expressão do gene *NFκB-2* (FIGURA 28g, 28h). Todos os resultados comparados ao grupo controle (PBS).

FIGURA 28: Avaliação da expressão gênica dos genes *EGFR* (a), *PI3K* (b), *AKT-1* (c) *mTOR* (d) *MAPK1* (e) *MAPK3* (f) *NFκB-1* (g) *NFκB-2* (h) após tratamento das células U87-MG com KDY23.





Fonte: própria autora (2024).

*p<0,05 vs PBS - valores em triplicata

Em muitos tipos de câncer, incluindo o GBM, *NFκB* está frequentemente ativado de forma constitutiva, contribuindo para proliferação celular, resistência a apoptose, angiogênese e resistência a terapias antitumorais (BANDO *et al.*, 2000; KARIN *et al.*, 2002; SPARMANN *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2020). Diante dos resultados apresentados é possível observar que houve um aumento na expressão de *NFκB-1* e *NFκB-2* nas células U87-MG após o tratamento com KDY23. Diante do resultado apresentado, sugere-se que o aumento de expressão pode ser uma resposta adaptativa da célula ao promover mecanismos de ativação de vias de sinalização de sobrevivência na tentativa de resistência ao tratamento. Uma vez que *NFκB* é um fator de transcrição que regula a expressão de genes envolvidos em várias respostas celulares incluindo inflamação, resposta imune, crescimento celular e sobrevivência (MANTOVANI *et al.*, 2008; POLLARD *et al.*, 2004; SPARMANN *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2020).

A expressão de *EGFR*, *PI3K* e *AKT1* está diminuída comparada ao controle PBS, o que indica possivelmente um alvo no qual a molécula KDY23 exerce seu mecanismo de ação. *PI3K* pode ser ativada por fatores de crescimento como a família *EGFR* humana e por fatores de crescimento da família do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (THAKUR *et al.*, 2022). Diante da diminuição da expressão de *EGFR* pressupõe-se que a diminuição da expressão de *PI3K* seja em decorrência dessa via a jusante. Sendo assim uma diminuição de *EGFR* poderia diminuir consequentemente *PI3K*. No mesmo sentido, houve uma diminuição da expressão de *AKT-1*, essa diminuição pode ser pelo fato de *PI3K* ser responsável por ativar *AKT-1* participando de sua fosforilação (THAKUR *et al.*, 2022).

Por outro lado, a expressão de *mTOR* está aumentada o que pode sugerir uma tentativa de sobrevivência da célula apresentando uma resposta adaptativa. A proteína *mTOR* é ativada quando os nutrientes são suficientes, o que promove o anabolismo e o armazenamento e a utilização de energia. Quando os nutrientes são relativamente escassos, o corpo deve inibir a ativação de *mTOR* para manter o material celular e a energia estáveis. As células tumorais requerem grandes quantidades de proteínas, lipídios e nucleotídeos para responder às suas necessidades de crescimento e divisão (LIU *et al.*, 2019; ZOU *et al.*, 2020). Consequentemente, a via *mTOR* possui atividade anormal em tumores sendo sempre muito estimulada para manter o crescimento, a sobrevivência e a proliferação das células tumorais (ZOU *et al.*, 2020).

A sinalização *PI3K/AKT/mTOR* é uma via intracelular crucial na regulação de funções celulares fundamentais, incluindo, mas não se limitando a, regulação do crescimento celular, motilidade, sobrevivência, metabolismo e angiogênese. O aumento da expressão de *mTOR* nas células U87-MG após tratamento com KDY23 pode estar sendo ativado por várias vias alternativas quando a via *EGFR/AKT/PI3K* está suprimida (LI X *et al.*, 2022; MENDOZA; ER; BLENIS, 2011).

A supressão da via *PI3K/AKT* pode levar à ativação de *mTOR* por mecanismos de *feedback* negativo. Quando a via *PI3K/AKT* é inibida, pode haver desregulação de inibidores *upstream*, como *PTEN*, resultando na ativação de *mTOR* (CARRACEDO *et al.*, 2008). Outra possibilidade seria através da *AMPK*, que é uma quinase sensível ao estado energético da célula. Em condições de estresse ou depleção energética, *AMPK* é ativada e geralmente inibe *mTOR*. No entanto, a regulação cruzada entre

AMPK e mTOR é complexa e pode, em alguns contextos, levar à ativação de mTOR em resposta a mudanças na homeostase celular (INOKI *et al.*, 2012).

Existem diversas vias de sinalização que interagem com mTOR, como as vias reguladas por HIF (*hipoxia-inducible factors*) e fatores de crescimento independentes de EGFR. A ativação de receptores de outras tirosinas quinases, como PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) ou IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*), pode também ativar mTOR (LAPLANTE *et al.*, 2012). Fatores de crescimento e citocinas presentes no microambiente tumoral também podem ativar mTOR através de receptores alternativos. Por exemplo, VEGF e suas vias associadas podem contribuir para a ativação de mTOR. Alterações no metabolismo celular induzidas pelo tratamento antitumoral podem levar a mudanças na ativação de mTOR. O metabolismo de aminoácidos, por exemplo, é um regulador importante de mTOR, e mudanças na disponibilidade de nutrientes podem influenciar sua ativação (FAES *et al.*, 2021; JEWELL *et al.*, 2013; VOSS *et al.*, 2014). mTOR pode ser ativado também por outras vias como a via WNT que tem sido implicada na sinalização de mTOR (CASTILHO *et al.*, 2009; INOKI *et al.*, 2006; ZONCU *et al.*, 2010).

A via RAF/MEK/ERK(MAPK) é uma via de sinalização crítica na transmissão de sinais das membranas para o núcleo. E assim como PI3K/AKT/mTOR, a ativação das vias de sinalização RAF/MEK/ERK(MAPK) foi observada em uma grande fração de cânceres sólidos. A via Ras-ERK(MAPK) ativa de forma cruzada a sinalização PI3K-mTORC1 regulando PI3K, TSC e mTORC1 (BRITTEN *et al.*, 2013; LI X *et al.*, 2022; MENDOZA; ER; BLENIS, 2011; SHIMIZU *et al.*, 2012).

Ambas as vias compartilham entradas comuns e também podem ser ativadas via RAS. Além disso, quando uma via é suprimida, a outra via pode oferecer eficácia compensatória. A ativação da via RAS-ERK(MAPK) pode levar à atividade de mTORC1 pela sinalização ERK(MAPK) e RSK para o complexo TSC que detecta uma variedade de fatores de crescimento e sinais de estresse. Alguns fatores podem induzir a fosforilação de TSC2 mediada por ERK e RSK que atuam ativando mTORc1 independente de PI3K (MENDOZA; ER; BLENIS, 2011; ROUX *et al.*, 1994; ZONCU; EFEYAN; SABATINI 2011).

Malta *et al.* (2017) relataram que o gene intensificador do fator de transcrição (*TFE*) regulado positivamente pode ativar a via Rag GTPase/mTORC1. Nas células normais, essa via é ativada para que as células possam absorver melhor os nutrientes

para manter as funções fisiológicas. Nas células tumorais, essa via é frequentemente superativada para atender suas necessidades nutricionais de rápido crescimento.

Os resultados obtidos demonstraram que não houve alteração significativa na expressão dos genes *MAPK-1* e *MAPK-3* após o tratamento com KDY23 nas células de glioblastoma. O resultado obtido indica que a expressão inalterada das *MAPKs 1* e *3* poderiam levar a ativação de *mTOR*. Apenas esse dado não é suficiente para afirmar que a superexpressão de *mTOR* é ativada por essa via ou não pois os demais genes que compõem a via *RAS/RAF/MEK/ERK(MAPK)*, não foram explorados. Sendo necessários ensaios adicionais para confirmar essa hipótese.

A proteína EGFR é um dos alvos terapêuticos mais utilizadas para bloquear a progressão de diversos tipos de tumores malignos, incluindo câncer de pulmão, mama, esôfago, cólon, pâncreas e próstata. A primeira geração de agentes inibidores de tirosina quinase, gefitinib e erlotinib reduzem rapidamente o tamanho do tumor no tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas, bem como, lapatinib é reconhecido como um inibidor duplo de EGFR e HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), aprovado para câncer de mama metastático. Esses inibidores de tirosinas quinases (gefitinibe, erlotinibe e lapatinibe) são competidores reversíveis contra o sítio de ligação do EGFR e têm sido usados com sucesso clínico. EGFR é um dos alvos de fármacos mais valiosos para o tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas (SUN *et al.*, 2020 CUARTAS *et al.*, 2021; LI YANG *et al.*, 2019)

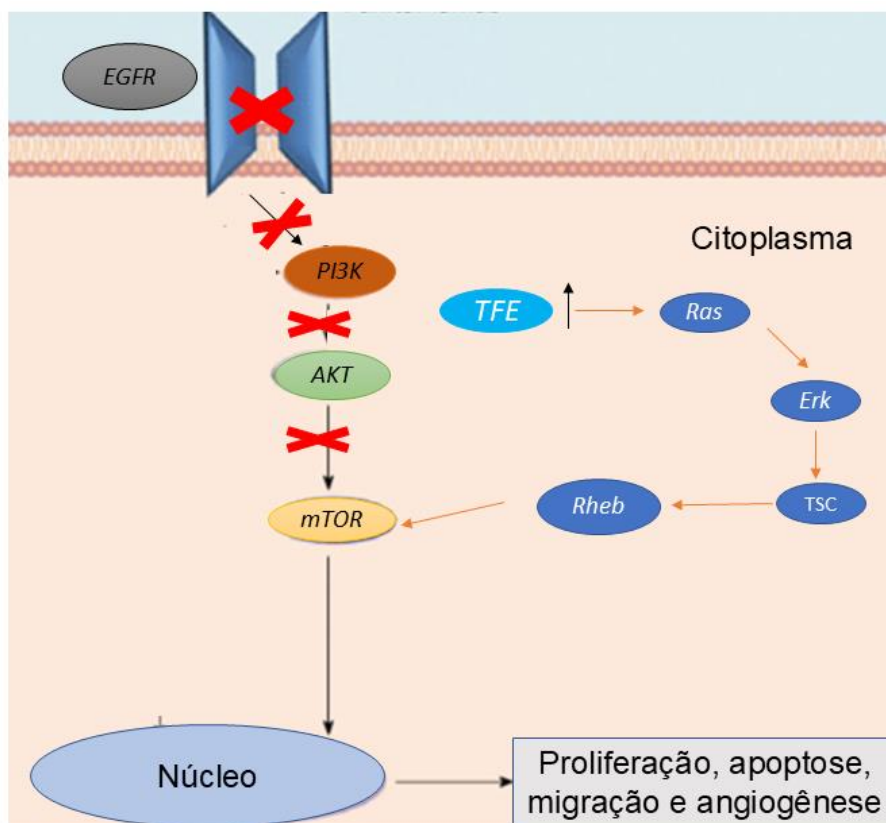
Como dito anteriormente o esqueleto das quinazolininas tem sido amplamente utilizado na concepção de fármacos antitumorais. A maioria dessas moléculas são inibidores de proteínas quinases que foram desenvolvidos como alvos do receptor EGFR. No entanto, muitos derivados serviram como diferentes inibidores de proteínas tirosina quinases devido às semelhanças em seus bolsões de ligação da proteína quinase e a versatilidade dos modelos estruturais de quinazolina, incluindo B-RAF, PI3K e fator de crescimento VEGFR (BUENADICHA *et al.*, 2001; LI YANG *et al.*, 2019).

Atualmente, a maioria dos inibidores de EGFR comercializados ou clínicos contém o andaime 4-anilinoquinazolina. Notavelmente, várias categorias químicas diferentes também são igualmente válidas como os compostos tricíclicos pirroloquinazolininas (AHN *et al.*, 1999; LI YANG *et al.*, 2019).

Importante ressaltar que foi avaliada completamente a via de proliferação e sobrevivência celular, (*EGFR/AKT/PI3K/mTOR*), porém existem outras vias de sinalização envolvidas na proliferação e sobrevivência celular. Portanto, existe a possibilidade de que a molécula KDY23 atue diminuindo a expressão de outros genes que atuem nessas outras vias. E como já foi citado anteriormente as quinazolininas podem atingir múltiplos alvos intracelulares. Essa característica se confirmada seria mais um ponto positivo, uma vez que fármacos multialvos são as principais alternativas para lidar com doenças complexas (SÁNCHEZ-TEJEDA *et al.*, 2020).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que KDY23 diminui a expressão de *EGFR*, *PI3K*, *AKT* permitindo sugerir que é nessa via que KDY23 exerce seu mecanismo de ação citotóxico. A hipótese levantada para justificar o aumento da expressão de *mTOR* como uma resposta adaptativa da célula seria a ativação de *mTOR* por uma via alternativa, como por exemplo através da regulação positiva do gene intensificador do fator de transcrição (*TFE*) que ativa a via *RAS/ERK(MAPK)/TSC/RHEB/mTORC1*. A ativação dessa via promoveria a absorção de nutrientes pelas células tumorais para atender às necessidades do rápido crescimento dos tumores. Contudo, mesmo diante dessa adaptação, KDY23 é capaz de induzir a morte das células tumorais por apoptose. Diante do conjunto de resultados obtidos, a FIGURA 29 ilustra o possível efeito que KDY23 possui nas células tumorais de glioblastoma.

FIGURA 29: Via PI3K/AKT/mTOR das células de GBM após tratamento com KDY23 e a possível via alternativa de ativação de *mTOR*.



Fonte: SFORZA *et al.*, 2016 adaptado

Legenda: Após os resultados de expressão gênica obtidos nesse trabalho, observou-se que a molécula KDY23 diminui a expressão de *EGFR*, *PI3K* e *AKT* o que sugere que é através dessa via que exerce seu mecanismo de ação citotóxico. A hipótese I para justificar o aumento da expressão de *mTOR* como uma resposta adaptativa da célula é pela sua ativação por uma via alternativa, através da regulação positiva do gene *TFE* que ativa a via *Ras/Erk/TSC/Rheb/mTORC1*. A ativação dessa via promoverá a absorção de nutrientes pelas células tumorais para atender às necessidades do rápido crescimento dos tumores.

7 CONCLUSÕES

Apesar das mudanças observadas no aspecto e cor dos derivados de quinazolininas em comparação com os precursores, essas alterações não são suficientes para confirmar a formação das moléculas desejados. Por isso, foi essencial realizar a caracterização dos produtos por métodos espectrométricos.

Os dados de FTIR demonstram que a formação das moléculas KDY1, KDY2, KDY4 e KDY7 possivelmente não ocorreu, já que seus espectros são muito semelhantes aos de seus precursores R1, indicando pouca ou nenhuma mudança estrutural. Em contraste, para as moléculas KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23, as mudanças observadas nos espectros, como o aparecimento de novas bandas e o desaparecimento de outras, sugerem a formação dessas quinazolininas.

Os dados de ^1H RMN corroboram as observações feitas pela FTIR, confirmando a formação das moléculas quinazolina KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23. As modificações nos espectros, especialmente na região dos hidrogênios aromáticos e a presença de sinais específicos atribuídos aos hidrogênios aromáticos e metoxila, além dos hidrogênios dos grupos amina, indicam que a junção dos precursores ocorreu como esperado. Assim, a análise conjunta dos dados de FTIR e ^1H RMN fornece evidências conclusivas sobre a formação desses derivados de quinazolininas.

As moléculas KDY3, KDY5, KDY6 e KDY23 apresentaram diferentes níveis de eficácia na redução da viabilidade celular. A molécula KDY23 destacou-se entre os demais demonstrando uma eficácia notável, especialmente quando comparado ao TMZ, que requer uma concentração muito maior. Portanto, KDY23 mostra-se um candidato promissor para o tratamento de GBM em termos de eficácia em baixas concentrações.

KDY23 apresenta perfil citotóxico dependente da concentração nas linhagens celulares U87-MG e T98G. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que KDY23 tem um efeito citotóxico robusto e dose-dependente em ambas as linhagens celulares testadas.

O tratamento com KDY23 demonstrou expressiva redução do número de células T98G, evidenciada pela quase ausência de células observadas e pela presença de resíduos celulares, indicando alta eficácia citotóxica. Comparado ao controle (PBS) e aos tratamentos com TMZ e DOXO, KDY23 se destaca como o mais eficaz e potente no combate às células de GBM. Essas observações visuais

corroboram com os resultados dos ensaios de viabilidade celular, confirmando KDY23 como uma promissora opção terapêutica contra o GBM.

A citotoxicidade observada nas células de GBM U87-MG é devida à molécula sintetizada KDY23 e não aos seus precursores isolados (R1 e R2) ou misturados. Os precursores, tanto individualmente quanto combinados (R1+R2), não mostraram redução significativa na viabilidade celular. Esses resultados indicam que a atividade citotóxica relevante contra as células U87-MG é atribuída à estrutura específica da molécula KDY23 sintetizada.

KDY23 demonstrou seu perfil citotóxico também nas linhagens de células não tumorais de macrófagos J774.A1 e RAW 264.7. Embora a seletividade seja uma característica positiva em um quimioterápico, a grande maioria dos fármacos hoje disponíveis para tratamento de câncer atinge também as células não cancerosas.

KDY23 induziu a morte celular por apoptose. Esse dado foi verificado na presença das proteínas capase-3-clivada e PARP-clivada nas células tratadas com KDY23. Essa característica é muito promissora uma vez que a via de morte celular por necrose é um processo que envolve suscetíveis respostas inflamatórias e a grande maioria dos fármacos anticancerígenos exerce seu efeito antitumoral a partir da indução de apoptose.

Através das análises de PCR em tempo real foi demonstrado que o tratamento com KDY23 diminuiu a expressão dos genes *EGFR/PI3K/AKT1* uma via importante de sobrevivência e proliferação celular, presumindo que esse seja o mecanismo de ação citotóxico nas células de GBM dessa molécula. O tratamento com KDY23 aumentou a expressão de *mTOR*, *NF-κB1* e *NF-κB2*, provavelmente numa tentativa de sobrevivência e homeostase celular. Para identificar por qual via alternativa mTOR está sendo ativado serão necessárias mais análises experimentais investigando a expressão de outros genes que podem estar envolvidos nessa ativação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N. Joan *et al.* Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 41-53, 1 jan. 2006. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1824>.

ADAMSON, Cory *et al.* Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. **Expert Opinion On Investigational Drugs**, [S.L.], v. 18, n. 8, p. 1061-1083, 26 jun. 2009. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/13543780903052764>.

AHIR, Bhavesh K.; OZER, Howard; ENGELHARD, Herbert H.; LAKKA, Sajani S.. MicroRNAs in glioblastoma pathogenesis and therapy: a comprehensive review. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, [S.L.], v. 120, p. 22-33, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.10.003>.

AHN, Ho-Sam *et al.* Structure-activity relationships of pyrroloquinazolines as thrombin receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 9, n. 14, p. 2073-2078, jul. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-894x\(99\)00339-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-894x(99)00339-x).

AKRAM, Muhammad *et al.* Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 12-2, 2 out. 2017. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.

ALBANESE, C *et al.* Anti-tumour efficacy on glioma models of PHA-848125, a multi-kinase inhibitor able to cross the blood-brain barrier. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 169, n. 1, p. 156-166, 12 abr. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12112>.

ALBENSI, Benedict C. *et al.* What Is Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Doing in and to the Mitochondrion? **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 7, p. 1, 7 ago. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2019.00154>.

ALQASOUMI, Saleh I. *et al.* Discovering some novel tetrahydroquinoline derivatives bearing the biologically active sulfonamide moiety as a new class of antitumor agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, n. 5, p. 1849-1853, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.022>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Side Effects of Chemotherapy**. 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults/treating/chemotherapy.html>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

ANTUNES, João Eustáquio. **Novas Quinazolininas 2,4,8-dissubstituídas com Potencial Atividade de Inibição da Quinase de Adesão Focal (FAK)**. 2013. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas- Unicamp, Campinas, 2013.

ATIF, Fahim *et al.* The Synergistic Effect of Combination Progesterone and Temozolomide on Human Glioblastoma Cells. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 0131441-1, 25 jun. 2015. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131441>.

AZAGURY, Dan E. *et al.* Image-guided surgery. **Current Problems In Surgery**, [S.L.], v. 52, n. 12, p. 476-520, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1067/j.cpsurg.2015.10.001>.

BAHUGUNA, A. *et al.* MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 8, abr. 2017.

BAHJAT, Hasan H. *et al.* Preparation of Iron Oxide and Titania-Based Composite, Core-Shell Populated, Nanoparticulates Material by Two-Step LASER Ablation in Aqueous Media as Antimicrobial and Anticancer Agents. **Bioinorganic Chemistry And Applications**, [S.L.], v. 2022, p. 1-19, 25 jan. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/1854473>.

BANDO, H.; TAKEBAYASHI, Y.; OGAWA, T.; CHIBA, Y.; KAWAGUCHI, M.; WATANABE, G.; SUZUKI, M. Constitutive nuclear factor-kappaB activity in human acute myelogenous leukemia cell lines. **Oncogene**, v. 19, n. 20, p. 2247-2256, 2000.

BARBER, Robert D. *et al.* GAPDH as a housekeeping gene: analysis of gapdh mrna expression in a panel of 72 human tissues. **Physiological Genomics**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 389-395, 11 maio 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>.

BATHULA, Raju *et al.* Evaluation of antitumor potential of synthesized novel 2-substituted 4-anilinoquinazolines as quinazoline-pyrrole hybrids in MCF-7 human breast cancer cell line and A-549 human lung adenocarcinoma cell lines. **Future Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1, 31 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s43094-020-00059-5>.

BATZER, A G *et al.* Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. **Molecular And Cellular Biology**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 5192-5201, ago. 1994. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.14.8.5192>.

BEHL, Tapan *et al.* Current Perspective on the Natural Compounds and Drug Delivery Techniques in Glioblastoma Multiforme. **Cancers**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 2765, 2 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13112765>.

BEHNAN, Jinan *et al.* The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. **Brain**, [S.L.], v. 142, n. 4, p. 847-866, 29 mar. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awz044>.

BEYER, Christian *et al.* Modeling nuclear molecule release during in vitro cell death. **Autoimmunity**, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 298-301, 16 jan. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/08916934.2012.750297>.

BOBOLA, Michael S. *et al.* Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 2, p. 327-345, jun. 2012. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2012.00176>.

BOHM, I *et al.* Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. **Molecular Imaging & Biology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 2-14, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1536-1632\(03\)00024-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1536-1632(03)00024-6).

BRANNON-PEPPAS L, BLANCHETTE J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2012;64:206-12.

BRENES, O. *et al.* Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: possible mechanisms of cell resistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 61, n. 6, p. 347-355, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2007.02.007>.

BRENNAN, Cameron *et al.* The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell**, [S.L.], v. 155, n. 2, p. 462-477, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>.

BRITTEN, C. D. *et al.* ERK/MAPK pathway as a therapeutic target in cancer. **Cancer Letters**, v. 338, n. 2, p. 129-140, 2013. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.06.001.

BUENADICHA, Felix L. *et al.* Reactivity as glycine templates of 1,2-dialkyl-2,4-dihydro-1H-pyrazino[2,1-b]quinazoline-3,6-diones. **Tetrahedron: Asymmetry**, S. I, v. 1, n. 12, p. 3019-3028, jan. 2001.

BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; FLESCHEIN, S. Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 3, p. 206–219, maio 2010.

CADENA, Deborah L. *et al.* Receptor tyrosine kinases. The FASEB Journal, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 2332-2337, mar. 1992. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.6.6.1312047>.

CARLSSON, Steven K *et al.* Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. **Embo Molecular Medicine**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 1359-1370, 13 out. 2014. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201302627>.

CARRACEDO, A. *et al.* Inhibition of mTORC1 by PTEN in a feedback loop leads to cancer cell growth. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 618-622, 2008.

CHEN, Liang *et al.* Central nervous system tumors: a single center pathology review of 34,140 cases over 60 years. **Bmc Clinical Pathology**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-2, 2 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6890-13-14>.

CHENG, Benxu *et al.* Niclosamide induces protein ubiquitination and inhibits multiple pro-survival signaling pathways in the human glioblastoma U-87 MG cell line. *Plos One*, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 0184324-1, 6 set. 2017. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0184324>.

CHENG, Zhen-Xiu *et al.* MicroRNA-132 induces temozolomide resistance and promotes the formation of cancer stem cell phenotypes by targeting tumor suppressor candidate 3 in glioblastoma. **International Journal of Molecular Medicine**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 1307-1314, 7 set. 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2017.3124>.

CHINOT, Olivier L.; *et al.* Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, [S.L.], v. 370, n. 8, p. 709-722, 20 fev. 2014. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1308345>.

CHO, Kwangjae *et al.* Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 1310-1316, 1 mar. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-1441>.

CHOUDHARY, Shruti *et al.* Potential of substituted quinazolines to interact with multiple targets in the treatment of cancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 35, p. 116061, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116061>.

COELHO, A. S. *et al.* Predisposição hereditária ao câncer de mama e sua relação com os genes BRCA1 e BRCA2: revisão da literatura. **RBAC**. v. 50, n. 1. 2018.

CONNOLLY, D. P.; TAYLOR, E. C.; SCHUMACHER, D. P. Novel Synthesis of Quinazoline Derivatives. **Organic Letters**, v. 7, n. 6, p. 1185-1188, 2005. DOI: 10.1021/ol047688z.

CUARTAS, Viviana *et al.* Anticancer activity of pyrimidodiazepines based on 2-chloro-4-anilinoquinazoline: synthesis, dna binding and molecular docking. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 11, n. 38, p. 23310-23329, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d1ra03509f>.

CUDDAPAH, Vishnu Anand *et al.* A neurocentric perspective on glioma invasion. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 15, n. 7, p. 455-465, 20 jun. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3765>.

D'AMOURS, Damien *et al.* Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. **Journal Of Cell Science**, [S.L.], v. 114, n. 20, p. 3771-3778, 15 out. 2001. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.114.20.3771>.

D'ATRI, Stefania; *et al.* Involvement of the Mismatch Repair System in Temozolomide-Induced Apoptosis. **Molecular Pharmacology**, [S.L.], v. 54, n. 2, p. 334-341, 1 ago. 1998. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.54.2.334>.

DANCEY, Janet *et al.* MTOR signaling and drug development in cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 209-219, 16 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.21>.

DENADAI, Angelo M L *et al.* A Supramolecular Complex between Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity. **Biodrugs**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 283-291, 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00063030-200620050-00004>.

DEVI, Poornima *et al.* Green Approaches Towards the Synthesis of Substituted Quinazolines. **Current Green Chemistry**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1, 29 ago. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/2213346104666170704153434>.

DHERMAIN, Frederic G *et al.* Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas. **The Lancet Neurology**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 906-920, set. 2010. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70181-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70181-2).

DHUGURU, Jyothi *et al.* FDA-Approved Oximes and Their Significance in Medicinal Chemistry. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 66, 4 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph15010066>.

DHUGURU, Jyothi *et al.* Quinazoline Based HDAC Dual Inhibitors as Potential Anti-Cancer Agents. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 7, p. 2294, 31 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27072294>

DRAKULIC, Danijela *et al.* Current Opportunities for Targeting Dysregulated Neurodevelopmental Signaling Pathways in Glioblastoma. **Cells**, [S.L.], v. 11, n. 16, p. 2530, 15 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11162530>.

EL-AZAB, Adel S. *et al.* Design and synthesis of novel 7-aminoquinazoline derivatives: antitumor and anticonvulsant activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 22, n. 5, p. 1879-1885, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.01.071>.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230701320337>.

EREL-AKBABA, Gulsah *et al.* Radiation-Induced Targeted Nanoparticle-Based Gene Delivery for Brain Tumor Therapy. **Acs Nano**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 4028-4040, 27 mar. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.8b08177>.

ESTANQUEIRO, Marilene *et al.* Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 126, p. 631-648, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.041>.

FAEHLING, M. *et al.* Erlotinib in routine clinical practice for first-line maintenance therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). **Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology**, [S.L.], v. 144, n. 7, p. 1375-1383, 23 abr.

2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-018-2649-x>.

FAISAL, Muhammad; SAEED, Aamer. Chemical Insights Into the Synthetic Chemistry of Quinazolines: recent advances. **Frontiers In Chemistry**, [S.L.], v. 8, p. 1, 14 jan. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2020.594717>.

FERRARA, Napoleone; *et al.* Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 3, n. 5, p. 391-400, 1 maio 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1381>.

FILIPPO, Leonardo *et al.* Drug Delivery Nanosystems in Glioblastoma Multiforme Treatment: current state of the art. **Current Neuropharmacology**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 787-812, 27 maio 2021. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1570159x18666200831160627>.

FISCHER, Ute *et al.* New Approaches and Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease. *Pharmacological Reviews*, [S.L.], v. 57, n. 2, p. 187-215, 23 maio 2005. **American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET)**. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.57.2.6>.

FISHER J. L, *et al.* Epidemiologia dos tumores cerebrais. **Neurol Clin.** 2007; 25 :867-867.

FOURTH, A. *et al.*, Synthesis of Quinazoline-based Pyrimidodiazepines via Cyclocondensation Reaction. **Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 15, p. 3015-3025, 2021. DOI: 10.1021/acs.joc.0c03185.

FULDA, S., DEBATIN, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**. v.25, p.4798-4811, 2006.

FURNARI, Frank *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, [S.L.], v. 21, n. 21, p. 2683-2710, 1 nov. 2007. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1596707>.

FUSTER, Encarnación *et al.* A Transcriptomic Analysis of T98G Human Glioblastoma Cells after Exposure to Cadmium-Selenium Quantum Dots Mainly Reveals Alterations in Neuroinflammation Processes and Hypothalamus Regulation. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 2267, 18 fev. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23042267>.

GALLI, Rossella *et al.* Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. **Cancer Research**, [S.L.], v. 64, n. 19, p. 7011-7021, 1 out. 2004. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-1364>.

GARCIA-BELINCHÓN, Mercè *et al.* An Early and Robust Activation of Caspases Heads Cells for a Regulated Form of Necrotic-like Cell Death. **Journal Of Biological**

Chemistry, [S.L.], v. 290, n. 34, p. 20841-20855, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m115.644179>

GHONEIM, Ola M. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of piperazino-enaminones as novel suppressants of pro-Inflammatory cytokines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 26, n. 14, p. 3890-3898, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2018.06.003>.

GILBERT, Mark R.; *et al.* Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 370, n. 8, p. 699-708, 20 fev. 2014. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1308573>.

GOEDEGEBUURE, Ruben S. A. *et al.* Combining Radiotherapy With Anti-angiogenic Therapy and Immunotherapy; A Therapeutic Triad for Cancer? **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 1, 14 jan. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.03107>.

GROSSMANN, Patrick *et al.* Quantitative imaging biomarkers for risk stratification of patients with recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. **Neuro-Oncology**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1688-1697, 11 maio 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nox092>.

GUERTIN, David A. *et al.* Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell*, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 9-22, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2007.05.008>.

GUPTA, A. *et al.* Pretreatment Dynamic Susceptibility Contrast MRI Perfusion in Glioblastoma: prediction of egfr gene amplification. **Clinical Neuroradiology**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 143-150, 29 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00062-014-0289-3>.

HAMEED, Abdul *et al.* Quinazoline and quinazolinone as important medicinal scaffolds: a comparative patent review (2011-2016). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 281-297, 5 fev. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2018.1432596>.

HANIF, Farina; *et al.* Glioblastoma Multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-2, jan. 2017. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention. <http://dx.doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>.

HARDEE, Matthew E. *et al.* Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 181, n. 4, p. 1126-1141, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.030>.

HARTER, Davidh; WILSON, Taylora; KARAJANNIS, Matthiasa. Glioblastoma multiforme: state of the art and future therapeutics. **Surgical Neurology International**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 64, 2014. Scientific Scholar. <http://dx.doi.org/10.4103/2152-7806.132138>.

HASSA, Paul O *et al.* The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. **Frontiers In Bioscience**, [S.L.], v. 13, n. 13, p. 3046, 2008. IMR Press. <http://dx.doi.org/10.2741/2909>.

HENSON, John W. *et al.* The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 714-721, nov. 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410360505>.

HERCEG, Zdenko *et al.* Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. **Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [S.L.], v. 477, n. 1-2, p. 97-110, jun. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00111-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00111-7).

HOLOHAN C, *et al.* Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer**. 2013;13(10):714-26.

HSIA, Te-Chun *et al.* Bisdemethoxycurcumin Induces Cell Apoptosis and Inhibits Human Brain Glioblastoma GBM 8401/Luc2 Cell Xenograft Tumor in Subcutaneous Nude Mice In Vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 538, 4 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23010538>.

HUANG, Paul H. *et al.* Uncovering Therapeutic Targets FOR Glioblastoma: a systems biology approach. **Cell Cycle**, [S.L.], v. 6, n. 22, p. 2750-2754, 15 nov. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.6.22.4922>.

HUSE, Jason T. *et al.* Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 319-331, maio 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2818>

IACOB G, DINCA EB. Dados atuais e estratégia no glioblastoma multiforme. **J Med Vida**. 2009; 2 :386

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro 2017.

INOKI, K. *et al.* TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 235-238, 2006.

INOKI, Ken *et al.* AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 52, n. 1, p. 381-400, 10 fev. 2012. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537.A>

JÄÄTTELÄ, Marja *et al.* Caspase-independent cell death in T lymphocytes. **Nature Immunology**, [S.L.], v. 4, n. 5, p. 416-423, maio 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ni0503-416>.

JAFARI, Elham *et al.* Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. **Res Pharm Sci.**, Si, v. 1, n. 11, p. 1-14, jan. 2016.

JAN, R.; CHAUDHRY, G.-S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205–218, 1 jun. 2019.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 272–284, jan. 2018.

JIANG, Jingwen *et al.*. Regorafenib induces lethal autophagy arrest by stabilizing PSAT1 in glioblastoma. **Autophagy**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 106–122, 9 abr. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2019.1598752>.

JIANG, Yiwen; UHRBOM, Lene. On the origin of glioma. **Uppsala Journal Of Medical Sciences**, [S.L.], v. 117, n. 2, p. 113–121, 21 fev. 2012. Uppsala Medical Society. <http://dx.doi.org/10.3109/03009734.2012.658976>.

JORISSEN, R *et al.* Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. **Experimental Cell Research**, [S.L.], v. 284, n. 1, p. 31–53, 10 mar. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4827\(02\)00098-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00098-8).

KADHIM, Zahraa A. *et al.* Oncolytic Newcastle Disease Virus Co-Delivered with Modified PLGA Nanoparticles Encapsulating Temozolomide against Glioblastoma Cells: developing an effective treatment strategy. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 18, p. 5757, 6 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27185757>.

KAMEL, M. *et al.* Synthetic approaches and potential bioactivity of different functionalized quinazoline and quinazolinone scaffolds. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 98, 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1687-4315.197580>.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 4, p. 301–310, 2002.

KEUNEN, Olivier *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 9, p. 3749–3754, 14 fev. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1014480108>.

KHABIBOV, Marsel *et al.* Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). **International Journal of Oncology**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 1, 19 abr. 2022. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2022.5359>.

KHADDOUR, Karam *et al.*. The Landscape of Novel Therapeutics and Challenges in Glioblastoma Multiforme: contemporary state and future directions. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 389, 14 nov. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph13110389>.

KIRCHER, Moritz F *et al.* A brain tumor molecular imaging strategy using a new triple-modality MRI-photoacoustic-Raman nanoparticle. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 829-834, 15 abr. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2721>.

KSHIRSAGAR, U. A. Recent developments in the chemistry of quinazolinone alkaloids. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 36, p. 9336-9352, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5ob01379h>.

KUMAR, S *et al.* Caspase function in programmed cell death. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 32-43, 3 nov. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402060>.

KUMAR, Suresh *et al.* Biological Activities of Quinoline Derivatives. **Mini-Reviews In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 9, n. 14, p. 1648-1654, 1 dez. 2009. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138955709791012247>.

KUNG, H. F.; ZHANG, W.; CHENG, K.; HO, D.; HOU, C. Patent: US6156758. *Method for imaging brain receptor with radiolabeled quinazoline derivatives*. 2000. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US6156758A/en>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

Lam, PY *et al.* Expression of p19 INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. **British Journal of Neurosurgery**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 28-32, jan. 2000. s. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02688690042870>.

LAQUINTANA, Valentino *et al.* New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1017-1032, 7 set. 2009. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17425240903167942>.

LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J.. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 2, 18 ago. 2010. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>.

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

LI, H. *et al.* The PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer: Progress and challenges. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, p. 17, 2022. DOI: 10.1186/s13045-022-01186-0.

LI, Wenlong *et al.* Discovery of novel quinazolines as potential anti-tubulin agents occupying three zones of colchicine domain. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 83, p. 380-390, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.027>.

LI, Xiaoman *et al.* PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 22, p. 33440-33450, 7 mar. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.7961>.

LI, X. *et al.* Study of KDY23 on U87-MG cells: Implications for mTOR signaling pathways. **Journal of Cellular Science**, v. 135, n. 4, p. 321-330, 2022.

LI, Yang *et al.*. The association between anti-tumor potency and structure-activity of protein-kinases inhibitors based on quinazoline molecular skeleton. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 568-577, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2018.12.032>.

LI, Yonghe *et al.* Identification of quinazoline compounds as novel potent inhibitors of Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer cells. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 11263-11270, 25 jan. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.7019>.

LIU, Jianhong *et al.* Circular RNAs: the star molecules in cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, [S.L.], v. 70, p. 141-152, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2019.10.006>.

LIU, Pei-Feng *et al.* Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 0180620-1, 10 jul. 2017. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0180620>.

LIU, Tingting *et al.* Design, Synthesis, Antibacterial Activity, Antiviral Activity, and Mechanism of Myricetin Derivatives Containing a Quinazolinone Moiety. **Acs Omega**, [S.L.], v. 6, n. 45, p. 30826-30833, 4 nov. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.1c05256>.

LOUIS, Daniel C. St. *et al.* Evidence for Distinct Intracellular Signaling Pathways in CD34+ Progenitor to Dendritic Cell Differentiation from a Human Cell Line Model. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 173, n. 10, p. 6490-6490, 15 nov. 2004. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6490>.

LOUIS, David N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, [S.L.], v. 131, n. 6, p. 803-820, 9 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.

LOUIS, David N *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro-Oncology**, [S.L.], v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 29 jun. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.

ITOLC, Svorad *et al.* Body distribution of ^{11}C -methionine and ^{18}F FDG in rat measured by microPET. **Interdisciplinary Toxicology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 321-354, 1 jan. 2011. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/v10102-011-0010-1>.

LUN, Xueqing *et al.* Disulfiram when Combined with Copper Enhances the Therapeutic Effects of Temozolomide for the Treatment of Glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 22, n. 15, p. 3860-3875, 31 jul. 2016. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-1798>.

MALTA, Chiara di *et al.*. Transcriptional activation of RagD GTPase controls mTORC1 and promotes cancer growth. **Science**, [S.L.], v. 356, n. 6343, p. 1188-1192, 16 jun. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aag2553>.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SOZZANI, S.; VECCHI, A.; LOCATI, M. Tumor-associated macrophages as a prototypic type II polarized phagocyte population: role in tumor progression. *Journal of Pathology*, v. 214, n. 2, p. 129-137, 2008.

MAO, Hua *et al.* Deregulated Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: molecular mechanisms and therapeutic targets. **Cancer Investigation**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 48-56, jan. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/07357907.2011.630050>.

MARKMAN, Ben; DIENSTMANN, Rodrigo; TABERNERO, Josep. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. **Oncotarget**, Si, v. 7, n. 1, p. 530-543, 01 nov. 2010.

MARSHALL, C. J. *et al.* Raf gets it together. *Nature*, [S.L.], v. 383, n. 6596, p. 127-128, set. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/383127a0>.

MCKEE, M. K.; MCKEE, R. L.; BOST, R. W.. 7-Chloro-4-(1-diethylamino-4-pentylamino)-quinazoline. **Journal Of The American Chemical Society**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 184-184, jan. 1947. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01193a502>.

MCILWAIN, D. R. *et al.* Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 8656-8656, 1 abr. 2013. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>.

MENDOZA, M. C.; ER, E. E.; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 320-328, 2011. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.03.006.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. Mechanisms of Apoptosis Induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**. v. 76. p.1439-1453. 2005.

MOHAMED, M. A. *et al.* Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In: **Membrane Characterization**. [s.l.] Elsevier, p. 3–29, 2017.

MONTALDI, Ana Paula de Lima. **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR MEDIADA PELO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA ASSOCIADA AO INIBIDOR DO REPARO DO DNA METOXIAMINA EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA**. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Genética., Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1- 2, p.55-63, dez. 1983.

NAKADA, Mitsutoshi *et al.* Aberrant Signaling Pathways in Glioma. **Cancers**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 3242-3278, 10 ago. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers3033242>.

NAM, L. *et al.* Drug Delivery Nanosystems for the Localized Treatment of Glioblastoma Multiforme. **Materials**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 779, 11 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma11050779>.

NICHOLSON, Donald W.. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, [S.L.], v. 407, n. 6805, p. 810-816, out. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35037747>

NIH. What Is Cancer? 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 27 jan. 2023.

NUNES, Paulo Sérgio Gonçalves. Síntese de novas quinazolininas para tratamento de tumores sob hipóxia e nitroimidazol para diagnóstico por PET. 2018. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

OHGAKI H, KLEIHUES P. Epidemiologia e etiologia de gliomas. **Acta Neuropathol.** 2005; 109 :93-93

OHGAKI H. Epidemiology of brain tumors. **Métodos Mol Biol.** 2009; 472 :323-323.

OHGAKI, Hiroko *et al.* Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Science**, [S.L.], v. 100, n. 12, p. 2235-2241, dez. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x>.

OLIVEIRA JÚNIOR, Antônio Marques de. **TESTES DE COLORAÇÃO EM EXTENSÕES SANGUÍNEAS COM O USO DE CORANTES ARTIFICIAIS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - Rn, 2014.

OMURO, Antonio *et al.* Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. **Jama**, [S.L.], v. 310, n. 17, p. 1842-2, 6 nov. 2013. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.280319>.

ONZI, Giovana Ravizzoni. **Influência das células tronco mesenquimais no desenvolvimento das células tronco tumorais de glioma**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 2014.

OSTERMANN, Sandrine *et al.* Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. **Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 3728-3736, 1 jun. 2004. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0807>

OSTROM, Quinn T *et al.* CBTRUS Statistical Report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2012-2016. **Neuro-Oncology**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 1-100, out. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/noz150>.

OSTROM, Quinn T *et al.* CBTRUS Statistical Report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2016-2020. **Neuro-Oncology**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 1-99, 4 out. 2023. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/noad149>

OZDEMIR-KAYNAK, Elif; QUTUB, Amina A.; YESIL-CELIK TAS, Ozlem. Advances in Glioblastoma Multiforme Treatment: new models for nanoparticle therapy. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-63, 19 mar. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.00170>.

PARKER, Nicole Renee *et al.* Molecular Heterogeneity in Glioblastoma: potential clinical implications. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 5, p. 1-2, 3 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2015.00055>.

PARSONS, D. Williams; *et al.* An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. **Science**, [S.L.], v. 321, n. 5897, p. 1807-1812, 26 set. 2008. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1164382>.

PASQUALI, Sandro *et al.* Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [S.L.], v. 2020, n. 11, p. 1-2, 6 fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd011123.pub2>

PATEL, Mayur M *et al.* Getting into the Brain. **Cns Drugs**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 35-58, 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/0023210-200923010-00003>.

PATRA, Jayanta Kumar *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal Of Nanobiotechnology**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-2, 19 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.

PAVIA, Donald L. **Introdução À Espectroscopia**. 4. ed. Bellingham, Washington: Cengage Learning, 2010.

PAZHOUHI, Mona *et al.* Thymoquinone synergistically potentiates temozolomide cytotoxicity through the inhibition of autophagy in U87-MG cell line. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 890-898, ago. 2016.

PEARSON, Joshua R. D. *et al.* Immune Escape in Glioblastoma Multiforme and the Adaptation of Immunotherapies for Treatment. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1, 15 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.582106>.

PENG, Fan-Wei *et al.* A Design, synthesis and biological evaluation of N-phenylquinazolin-4-amine hybrids as dual inhibitors of VEGFR-2 and HDAC. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 109, p. 1-12, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.12.033>]

PENG, Wei *et al.* B Discovery of 2-(2-aminopyrimidin-5-yl)-4-morpholino- N -(pyridin-3-yl)quinazolin-7-amines as novel PI3K/mTOR inhibitors and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 108, p. 644-654, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.038>

PEPPER, Niklas Benedikt *et al.* The use of radiosensitizing agents in the therapy of glioblastoma multiforme—a comprehensive review. **Strahlentherapie Und Onkologie**, [S.L.], v. 198, n. 6, p. 507-526, 3 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00066-022-01942-1>.

PEREIRA, Ana Helena Macedo. **AVALIAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DA SUPEREXPRESSÃO E DO SILENCIAMENTO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO MEF2C EM MIÓCITOS CARDÍACOS**. 2013. 209 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

PÉTRILLI, Virginie *et al.* Noncleavable poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the inflammation response in mice. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 114, n. 8, p. 1072-1081, 15 out. 2004. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci200421854>.

PINEVICH, A. A. *et al.* Temozolomide-Resistant Human T2 and T98G Glioblastoma Cells. **Cell and Tissue Biology**, v. 16, n. 4, p. 339–351, ago. 2022.

PISTRITTO, Giuseppa *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 603-619, 27 mar. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.100934>.

POJO, Marta *et al.* A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 7657-7674, fev. 2015.

POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2004

POON, Michael T. C. *et al.* Temozolomide sensitivity of malignant glioma cell lines – a systematic review assessing consistencies between in vitro studies. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-1, 18 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-021-08972-5>

POKORNÁ, Markéta *et al.* All-Trans Retinoic Acid Fosters the Multifarious U87-MG Cell Line as a Model of Glioblastoma. **Brain Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 812, 18 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci11060812>.

POLYAK, Kornelia. Breast cancer: origins and evolution. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 117, n. 11, p. 3155-3163, 1 nov. 2007. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci33295>.

PREUSSER, Matthias; *et al.* Current concepts and management of glioblastoma. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 9-21, jul. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.22425>.

PRZYSTAL, Justyna Magdalena; *et al.* Efficacy of systemic temozolomide-activated phage-targeted gene therapy in human glioblastoma. **Embo Molecular Medicine**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 1-2, 27 fev. 2019. EMBO. <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201708492>.

QIN, Wei-Dong *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition protects cardiomyocytes from inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 24, p. 35618-35631, 24 mar. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.8343>.

RAJESH, Y *et al.* Insights into molecular therapy of glioma: current challenges and next generation blueprint. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S.L.], v. 38, n. 5, p. 591-613, 20 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2016.167>.

RAMALHO, Maria João *et al.* Biophysical interaction of temozolomide and its active metabolite with biomembrane models: the relevance of drug-membrane interaction for glioblastoma multiforme therapy. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [S.L.], v. 136, p. 156-163, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.01.015>.

REED, John C. *et al.* Apoptosis-based therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 111-121, fev. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd726>.

RIEDL, Sabrina; ZWEYTICK, Dagmar; LOHNER, Karl. Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. **Chemistry And Physics Of Lipids**, [S.L.], v. 164, n. 8, p. 766-781, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.09.004>.

ROUX, P. P. *et al.* Tumor-specific ERK-mediated phosphorylation of TSC2: A critical event in the regulation of mTORC1 activity. **Science Signaling**, v. 307, n. 5716, p. 1671-1675, 2004. DOI: 10.1126/science.1104147.

SARTORI, Ana Clara N.; BASSO, Caroline S. CÂNCER DE MAMA: UMA BREVE REVISÃO DE LITERATURA. **Perspectiva, Erechim**, Si, v. 161, n. 43, p. 07-13, mar. 2019.

SELVAM, Theivendren Panneer; KUMAR, Alanirajan Vijayaraj. Quinazoline marketed drugs. **Research In Pharmacy**, Si, v. 1, n. 1, p. 1-21, jan. 2011.

SENGUPTA, Shomit *et al.* Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. **Molecular Cell**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 310-322, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.026>.

SFORZA, Vincenzo *et al.* Mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [S.L.], v. 22, n. 28, p. 6345, 2016. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i28.6345>.

SHAGUFTA, Shagufta *et al.* An insight into the therapeutic potential of quinazoline derivatives as anticancer agents. **Medchemcomm**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 871-885, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7md00097a>.

SHEA, Amanda; *et al.* MicroRNAs in glioblastoma multiforme pathogenesis and therapeutics. **Cancer Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 1917-1946, 10 jun. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.775>.

SHIMIZU, T. *et al.* The clinical effectiveness of RAF/MEK/ERK inhibition in solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 5, p. 1442-1451, 2012. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2270.

SIGISMUND, Sara *et al.* Emerging functions of the EGFR in cancer. **Molecular Oncology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 3-20, 27 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/1878-0261.12155>.

SILANTYEV, Artemiy; *et al.* Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: from molecular biology to proteomics. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 863, 9 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8080863>.

SINGH, Sheila K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, [S.L.], v. 432, n. 7015, p. 396-401, nov. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03128>.

SINHA, Rajni *et al.* Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 1909-1917, 1 ago. 2006. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-06-0141>.

SIRISOMA, Nilantha *et al.* Discovery of 2-Chloro-N-(4-methoxyphenyl)-N-methylquinazolin-4-amine (EP128265, MPI-0441138) as a Potent Inducer of Apoptosis with High In Vivo Activity. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 51, n. 15, p. 4771-4779, 24 jul. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm8003653>.

SMITH, P.k. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 150, n. 1, p.76-85, out. 1985.

SOUSA, Juliana Ferreira de *et al.* A resistência das células T98G e U87-MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de

DNA. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. /], v. 2, n. 36, p. 2013-2018, fev. 2015.

SPARMANN, A.; BAR-SAGI, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 6, n. 5, p. 447-458, 2004.

STAMBOLIC, Vuk *et al.* Negative Regulation of PKB/Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN. *Cell*, [S.L.], v. 95, n. 1, p. 29-39, out. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81780-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81780-8).

STEIN, Gretchen H. T98G: an anchorage :independent human tumor cell line that exhibits stationary phase g1 arrest in vitro. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 99, n. 1, p. 43-54, abr. 1979. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1040990107>.

STEINMETZ, Michel O. *et al.* Microtubule-Targeting Agents: strategies to hijack the cytoskeleton. **Trends In Cell Biology**, [S.L.], v. 28, n. 10, p. 776-792, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.001>.

STUPP, R.; TONN, J.-C.; BRADA, M.; PENTHEROUDAKIS, G.. High-grade malignant glioma: esmo clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 21, p. 190-193, maio 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdq187>.

STUPP, Roger *et al.* Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma. **Jama**, [S.L.], v. 318, n. 23, p. 2306, 19 dez. 2017. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2017.18718>.

STUPP, Roger *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 352, n. 10, p. 987-996, 10 mar. 2005. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa043330>.

STUPP, Roger; *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the eortc-ncic trial. **The Lancet Oncology**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 459-466, maio 2009. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70025-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70025-7).

SUN, Min *et al.* Design and synthesis of a novel class EGFR/HER2 dual inhibitors containing tricyclic oxazine fused quinazolines scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 127045, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127045>.

SUNG, Hyuna; *et al.* Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.L.], v. 71, n. 3, p. 209-249, 4 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>.

SUSIN, Santos A. *et al.* Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 192, n. 4, p. 571-580, 21 ago. 2000. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.192.4.571>.

SZEWC, Monika *et al.* MSCs as Tumor-Specific Vectors for the Delivery of Anticancer Agents—A Potential Therapeutic Strategy in Cancer Diseases: perspectives for quinazoline derivatives. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 2745, 2 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23052745>.

SZOLLOSI, Doreen E. *et al.* Novel Piperazino-Enaminones Suppress Pro-Inflammatory Cytokines and Inhibit Chemokine Receptor CCR2. **Inflammation**, [S.L.], v. 39, n. 6, p. 2053-2061, 10 set. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-016-0443-y>.

SWARBRICK, J. (ED.). **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 3rd ed ed. New York: Informa Healthcare, 2007.

TANG, Xuejia *et al.* Targeting Glioblastoma Stem Cells: a review on biomarkers, signal pathways and targeted therapy. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 11, p. 1-2, 8 jul. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.701291>.

TAYLOR, Rebecca C.; CULLEN, Sean P.; MARTIN, Seamus J.. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 231-241, mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2312>.

TELL G, DAMANTE G, CALDWELL D, KELLEY MR. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? **Antioxid Redox Signal**. 2005 Mar;7(3-4):367-84.

TELAROVIC, Irma; WENGER, Roland H.; PRUSCHY, Martin. Interfering with Tumor Hypoxia for Radiotherapy Optimization. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 1-2, 21 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-021-02000-x>.

THAKKAR J.P. *et al.* Revisão prognóstica epidemiológica e molecular do Glioblastoma. **Biomarcadores de Epidemiol de Câncer Prev**. 2014; 23 :1985-1985

THAKUR, Amandeep *et al.* Glioblastoma: current status, emerging targets, and recent advances. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 65, n. 13, p. 8596-8685, 5 jul. 2022. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01946>.

THON, Niklas; KRETH, Simone; KRETH, Friedrich Wilhelm. Personalized treatment strategies in glioblastoma: mgmt promoter methylation status. **Oncotargets And Therapy**, [S.L.], p. 1363, set. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ott.s50208>.

TOBE, Masanori *et al.* Discovery of Quinazolines as a Novel Structural Class of Potent Inhibitors of NF- κ B Activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 383-391, nov. 2003.

TOFT, P. *et al.* Glycopyrrolate compared with atropine in association with ketamine anaesthesia. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 438-440, jul. 1987. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-6576.1987.tb02598.x>.

TONN, J.-C.; *et al.* Personalized surgical therapy. **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 23, p. 28-32, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mds363>.

TOUAT, M.; *et al.* Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. **Annals Of Oncology**, [S.L.], v. 28, n. 7, p. 1457-1472, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx106>.

TRESCH, Nina Simona *et al.* Temozolomide is additive with cytotoxic effect of irradiation in canine glioma cell lines. **Veterinary Medicine And Science**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 2124-2134, 3 set. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/vms3.620>.

U-87 MG (ATCC® HTB14™). 2023. Disponível em: www.atcc.org. Acesso em: 01 mar. 2023.

UDREA, Ana-Maria *et al.* Quinazoline Derivatives Designed as Efflux Pump Inhibitors: molecular modeling and spectroscopic studies. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 8, p. 2374, 19 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26082374>.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; Applied Biosystems. **Guia para quantificação relativa da expressão gênica utilizando PCR quantitativa em tempo real**. São Paulo, 2023. 52 p. Disponível em: [\[https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4355693/course/section/2085886/realtime%20pcr%20av.pdf\]](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4355693/course/section/2085886/realtime%20pcr%20av.pdf). Acesso em: 9 ago. 2024.

VAN MEIR, E. G., *et al.* (2010). "Exciting new advances in neurooncology: the avenue to a cure for malignant glioma." **CA Cancer J Clin** 60(3): 166-193.

VANDENABEELE, Peter *et al.* Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 700-714, 8 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2970>.

VERHAAK, Roel G.W. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 98-110, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>.

WANG, Hai-Xin *et al.* Design, synthesis, antiproliferative and antibacterial evaluation of quinazolinone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 203-214, 26 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-018-2276-8>.

WDOWIAK, Paulina *et al.* Quinazoline Derivatives as Potential Therapeutic Agents in Urinary Bladder Cancer Therapy. **Frontiers In Chemistry**, [S.L.], v. 9, p. 1, 3 nov. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2021.765552>

WESTPHAL, Manfred; LAMSZUS, Katrin. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 495-508, 3 ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3060>.

WICK W, *et al.* LB-05: phase III trial exploring the combination of bevacizumab and lomustine in patients with first recurrence of a glioblastoma: the EORTC 26101 trial. **Neuro Oncol.** 2015;17(suppl 5):v1

WICK, Wolfgang *et al.* Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. New England **Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 377, n. 20, p. 1954-1963, 16 nov. 2017. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1707358>.

WICK, Wolfgang *et al.* Phase II part of EORTC study 26101: the sequence of bevacizumab and lomustine in patients with first recurrence of a glioblastoma.. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 34, n. 15, p. 2019-2019, 20 maio 2016. American Society of Clinical Oncology (ASCO). http://dx.doi.org/10.1200/jco.2016.34.15_suppl.2019.

WILLIAM, Doreen *et al.* Amplification of the EGFR gene can be maintained and modulated by variation of EGF concentrations in in vitro models of glioblastoma multiforme. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 0185208-1, 21 set. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0185208>.

WITT, Anette; BERGMAN, Jan. Synthesis and Reactions of some 2-Vinyl-3H-quinazolin-4-ones. **Tetrahedron**, [S.L.], v. 56, n. 37, p. 7245-7253, set. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4020\(00\)00595-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4020(00)00595-0).

WU, Wei *et al.* Glioblastoma multiforme (GBM): an overview of current therapies and mechanisms of resistance. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 171, p. 105780, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>.

WULLSCHLEGER, Stephan; LOEWITH, Robbie; HALL, Michael N.. TOR Signaling in Growth and Metabolism. **Cell**, [S.L.], v. 124, n. 3, p. 471-484, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>.

XIA, Yifeng *et al.* NF-κB, an Active Player in Human Cancers. **Cancer Immunology Research**, [S.L.], v. 2, n. 9, p. 823-830, 1 set. 2014. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.cir-14-0112>.

XU, Hongsheng *et al.* Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. **Oncology Letters**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 512-516, 22 maio 2017. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2017.6221>.

YANG, Jun *et al.* Combined-therapeutic strategies synergistically potentiate glioblastoma multiforme treatment via nanotechnology. **Theranostics**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 3223-3239, 2020. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/thno.40298>.

YOUNG, Richard M.. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. **Annals Of Translational Medicine**, Si, v. 3, n. 9, p. 121-136, jun. 2015.

YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 11, p. 798-809, 2020.

YUNG, Tetsu M.C.; SATOH, Masahiko S.. Functional Competition between Poly(ADP-ribose) Polymerase and Its 24-kDa Apoptotic Fragment in DNA Repair and Transcription. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 276, n. 14, p. 11279-11286, abr. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m008044200>.

ZHAN, Changyou *et al.* Cyclic RGD conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(lactic acid) micelle enhances paclitaxel anti-glioblastoma effect. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 143, n. 1, p. 136-142, 2 abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.020>.

ZHANG, Wenxiong *et al.* Gefitinib provides similar effectiveness and improved safety than erlotinib for advanced non-small cell lung cancer. **Medicine**, [S.L.], v. 97, n. 16, p. 0460, abr. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/md.00000000000010460>.

ZONCU, Roberto *et al.* MTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 21-35, 15 dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3025>

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes, and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 21-35, 2011. DOI: 10.1038/nrm3025.

ZOU, Zhilin *et al.* MTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & Bioscience*, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-2, 10 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1>.

ZUCCARINI, Mariachiara *et al.* The Role of Wnt Signal in Glioblastoma Development and Progression: a possible new pharmacological target for the therapy of this tumor. **Genes**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 105, 17 fev. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes9020105>.