

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS GOVERNADOR VALADARES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

Ana Clara De Paula Queiroga

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE FAK NA SOBREVIVÊNCIA E NA INTERAÇÃO
FAK/ α B-CRISTALINA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

Governador Valadares - MG

2026

ANA CLARA DE PAULA QUEIROGA

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE FAK NA SOBREVIVÊNCIA E NA INTERAÇÃO
FAK/ α B-CRISTALINA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia, do Instituto Ciências da Vida, da Universidade Federal de Juiz de Fora, *Campus* Governador Valadares, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Farmácia.

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

ANA CLARA DE PAULA QUEIROGA

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE FAK NA SOBREVIVÊNCIA E NA INTERAÇÃO
FAK/ α B-CRISTALINA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Farmácia, do Instituto
Ciências da Vida, da Universidade
Federal de Juiz de Fora, *Campus*
Governador Valadares, como requisito
parcial à obtenção do título de bacharel
em Farmácia.

Aprovado em 15 de abril 2026.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

Prof. Dr. Leonardo Meneghin Mendonça

Profa. Ma. Ana Carolina Menezes Mendonça Valente

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me conceder sabedoria, força e discernimento para superar cada etapa desta longa jornada, tornando possível a realização deste momento tão importante.

Aos meus pais, Girlene e Ronaldo, por serem minha base ao longo de toda essa trajetória, por sempre acreditarem em mim e por me apoiarem incondicionalmente na realização deste sonho. Sou profundamente grata por todas as oportunidades e pelas condições que me proporcionaram para que eu pudesse chegar até aqui. Sem vocês, nada disso seria possível.

À minha irmã, Lara, por se fazer presente ao longo desse caminho, mesmo à distância, por nossas conversas diárias, pelos conselhos e por sempre me transmitir tranquilidade e força para persistir diante das dificuldades, por sempre me ajudar a enxergar o lado bom de cada situação e a presença de Deus em todas as coisas.

Ao meu irmão, Bruno, por todo o apoio e incentivo, pela disposição em me ajudar em todos os momentos que precisei e pelo carinho imenso que sempre me dedica, sendo essencial para a conclusão desse sonho.

Ao meu namorado, Alef, por sempre estar ao meu lado, pelo amor, carinho e compreensão dedicados ao longo desse período, por não medir esforços para tornar meu caminho mais leve e confortável e por acreditar em mim em todos os momentos.

À minha grande amiga, Kênia Guedes, a quem tive o prazer de conhecer no início desta jornada e com quem compartilhei cada momento até o fim, pelos incontáveis momentos de descontração, pelas infinitas risadas e por ser parte dessa história.

A todos os meus amigos, pelo companheirismo, apoio e pelos momentos de descontração, que tornaram meu caminho mais prazeroso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes, por ter me aceitado como orientanda, pela excelência na forma de ensinar, pela paciência, compreensão e pelo cuidado que nos transmite, contribuindo para que a realização deste trabalho se tornasse mais leve e tranquila.

À Ma. Ana Carolina Menezes, pelos valiosos ensinamentos sobre pesquisa, transmitidos com grande dedicação e paciência, pelo incentivo constante, pelos conselhos e pelos momentos de descontração no laboratório.

À Ma. Jullyana Costa, pela forma acolhedora com que me recebeu no grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e por me permitir integrar seu projeto, possibilitando a

realização deste trabalho.

RESUMO

O câncer constitui um dos principais problemas de saúde pública em nível global, simbolizando uma das principais causas de morte e barreira para aumento da expectativa de vida. Entre os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), o Glioblastoma Multiforme (GBM) destaca-se como o subtipo mais agressivo e prevalente, sendo o tumor cerebral maligno primário de maior incidência em adultos e de pior prognóstico, com sobrevida média em torno de 15 meses. O tratamento padrão atual consiste em ressecção cirúrgica ampla seguida por radioterapia e quimioterapia adjuvante com temozolomida (TMZ). Todavia, o GBM é caracterizado por elevada resistência terapêutica, frequentemente associada a mecanismos genéticos e epigenéticos. Diante disso, a busca por novas estratégias terapêuticas mais eficazes e menos danosas torna-se fundamental. Nesse contexto, proteínas como a Quinase de Adesão Focal (FAK) e a α B-Cristalina, envolvidas em processos de sobrevivência, proliferação e migração celular, cuja maior expressão tem sido associada à progressão tumoral e ao prognóstico desfavorável em diferentes tipos de cânceres, emergem como relevantes alvos de estudo. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a interação entre FAK/ α B-cristalina é importante para a sobrevivência de diferentes tipos celulares, como miócitos cardíacos e glioblastoma. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da inibição da fosforilação da FAK sobre a viabilidade de células de glioblastoma, bem como investigar o efeito dessa inibição na interação entre as proteínas FAK/ α B-Cristalina. As células da linhagem de glioblastoma T98G foram cultivadas e tratadas com o inibidor de FAK PF-562.271, sendo posteriormente submetidas aos ensaios de viabilidade celular (MTT), *Western Blotting* e co-imunoprecipitação. Os resultados obtidos demonstraram que após 24 horas de tratamento das células com o inibidor de FAK as concentrações de 200 μ M e 400 μ M reduziram a viabilidade celular em 30% e 58%, respectivamente. Com base nesses dados, a concentração de 200 μ M foi selecionada para os experimentos subsequentes. Os ensaios de *Western Blotting* revelaram que o tratamento diminuiu a fosforilação da FAK em aproximadamente 98%, sem alterações detectáveis na expressão de α B-Cristalina. A interação entre FAK e α B-Cristalina, avaliada por co-imunoprecipitação, ocorreu independentemente do estado de fosforilação da FAK, mas apresentou aumento significativo após o tratamento com PF-562.271. Em conjunto, os achados indicam que a interação FAK/ α B-Cristalina ocorre de maneira mais significativa no estado não fosforilado da FAK e que a inibição da fosforilação de FAK foi capaz de promover a morte de células de glioblastoma. Ensaio adicionais serão necessários para verificar o efeito que a interação FAK/ α B-Cristalina promove nas células tratadas com PF-562.271.

Palavras chaves: Quinase de Adesão Focal (FAK), α B-Cristalina, Glioblastoma Multiforme.

ABSTRACT

Cancer is one of the major public health problems globally, representing one of the leading causes of death and a barrier to increasing life expectancy. Among tumors of the Central Nervous System (CNS), Glioblastoma Multiforme (GBM) stands out as the most aggressive and prevalent subtype, being the most common primary malignant brain tumor in adults and having the worst prognosis, with an average survival of around 15 months. Standard treatment consists of wide surgical resection followed by radiotherapy and adjuvant chemotherapy with temozolomide (TMZ). However, GBM is characterized by high therapeutic resistance, frequently associated with genetic and epigenetic mechanisms. Given this, the search for new, more effective and less harmful therapeutic strategies becomes fundamental. In this context, proteins such as Focal Adhesion Kinase (FAK) and $\alpha\beta$ -Crystallin, involved in cell survival, proliferation and migration processes, whose higher expression has been associated with tumor progression and unfavorable prognosis in different types of cancer, emerge as relevant targets for study. Previous studies by our group have demonstrated that the interaction between FAK/ $\alpha\beta$ -crystalline is important for the survival of different cell types such as cardiac myocytes and glioblastoma. Thus, the present work aimed to evaluate the effects of inhibiting FAK phosphorylation on the viability of glioblastoma cells, as well as to investigate the effect of this inhibition on the interaction between FAK/ $\alpha\beta$ -crystalline proteins. T98G glioblastoma cell lines were cultured and treated with the FAK inhibitor PF-562.271, and subsequently subjected to cell viability assays (MTT), Western blotting, and co-immunoprecipitation. The results showed that after 24 hours of treatment with the FAK inhibitor, concentrations of 200 μM and 400 μM reduced cell viability by 30% and 58%, respectively. Based on these data, the 200 μM concentration was selected for subsequent experiments. Western blotting assays revealed that the treatment decreased FAK phosphorylation by approximately 98%, with no detectable changes in $\alpha\beta$ -crystallin expression. The interaction between FAK and $\alpha\beta$ -crystallin, assessed by co-immunoprecipitation, occurred independently of the FAK phosphorylation status, but showed a significant increase after treatment with PF-562.271. Taken together, the findings indicate that the FAK/ $\alpha\beta$ -Crystallin interaction occurs more significantly in the non-phosphorylated state of FAK and that inhibition of FAK phosphorylation was able to promote the death of glioblastoma cells. Further assays will be needed to verify the effect that the FAK/ $\alpha\beta$ -Crystallin interaction has on cells treated with PF-562.271.

Keywords: Focal Adhesion Kinase (FAK), $\alpha\beta$ -Crystalline, Glioblastoma Multiforme.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Protocolo padrão de *Stupp* para tratamento de GBM após ressecção cirúrgica

Figura 2 - Decomposição da Temozolomida.

Figura 3 - Estrutura esquemática da FAK.

Figura 4 - Mecanismo de ativação da FAK.

Figura 5 - Atuação da FAK sobre vias de sinalização celular.

Figura 6 - Estrutura química 2D do PF-562.271

Figura 7 - Estrutura Esquemática das sHSPs.

Figura 8 - Interação FAK/ α B-cristalina formando complexo FAT-ACD.

Figura 9 - Esquema de ensaio de co-imunoprecipitação

Figura 10 – Análise da resposta dose-dependente ao PF-562.271 em células T98G após 24 horas de tratamento (A); avaliação da redução da densidade celular em cultura por microscopia óptica (B); e determinação da CI_{50} por regressão não linear (C)

Figura 11 - Avaliação da fosforilação de FAK e expressão proteica de α B-cristalina em células T98G tratadas com PF-562.271 por 24 horas (A-C).

Figura 12 - Avaliação da interação FAK/ α B-cristalina em células T98G tratadas com PF-562.271 por 24 horas (A-B).

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Especificação dos anticorpos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD	Domínio α -cristalino
AIC	5-amino-imidazol-4-carboxamida
AKT	Protein Kinase B
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BHE	Barreira Hematoencefálica
BRAF	Proto-oncogene B-Raf, serina/treonina quinase
BSA	Soro Albumina Bovina
CAF	Complexo de Adesão Focal
CDKN2A	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 2A
cDNA	DNA complementar
CI ₅₀	Concentração Inibitória (50%)
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
FAK	Quinase de Adesão Focal
FAT	Alvo de Adesão Focal
FERM	Quatro ponto-um, ezrina, radixina, moesina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase
GBM	Glioblastoma Multiforme
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Statistics</i>
IDH	Isocitrato Desidrogenase
iFAK	Inibidor da FAK
Imuno-PET	Imuno-histoquímica e Tomografia por Emissão de Póstrons
MEC	Matriz Extracelular
MGMT	O ⁶ -metilguanina-DNAmetiltransferase
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	RNA mensageiro
MTD	Metildiazônio
MTIC	5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida

mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5- fenil brometo de tetrazolina)
NES	Sinal de exportação nuclear
NF- κ B	Fator Nuclear κ B
NLS	Sinal de Localização Celular
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PET	Tomografia por Emissão de Póstrons
PF	PF-562.271
PI3K	Fosfatidilinositol-3quinase
PTEN	Fosfatase e análogo de tensina
PYK2	Tirosina quinase rica em prolina 2
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante
SH2	Domínio homólogo SRC 2
SH3	Domínio homólogo SRC 3
sHSP	<i>Small heat shock protein</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tomografia Computadorizada
TEM	Transição Epitelial-Mesenquimal
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador β
TMZ	Temozolomida
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
TP53	Proteína Tumoral p53
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
Y397	Tirosina Y397

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1.Câncer.....	14
2.1.1.Fisiopatologia do câncer.....	14
2.2.Glioblastoma Multiforme.....	14
2.2.1. Dados Epidemiológicos.....	15
2.2.2.Fisiopatologia do GBM.....	17
2.2.3.Apresentação Clínica.....	18
2.2.4.Diagnóstico.....	18
2.2.5.Tratamento.....	19
2.2.5.1.Temozolomida.....	21
2.2.5.2.Desafios do Tratamento.....	22
2.3.Quinase de Adesão Focal (FAK).....	23
2.3.1.Estrutura e Ativação.....	23
2.3.2. Atividade da FAK no câncer.....	25
2.3.2.1.Transição epitélio-mesenquimal.....	27
2.3.2.2.Angiogênese.....	27
2.3.2.3.Microambiente tumoral.....	27
2.3.3.Atividade da FAK no Glioblastoma.....	27
2.3.4.Inibidor da FAK PF-562.271.....	28
2.4.αB-cristalina (HSPB5).....	29
2.4.1. Estrutura e Funções.....	31
2.5.Interação FAK/ αB-cristalina.....	31
3.OBJETIVOS.....	32
3.1.Objetivo geral.....	32
3.2.Objetivos específicos.....	32
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1.Cultura de células.....	33
4.2.Ensaio de viabilidade (MTT).....	33
4.3.Extração de proteínas.....	34
4.4.Co-Imunoprecipitação.....	34
4.5.Western Blotting.....	35
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37

5.1.Avaliação do efeito da inibição da fosforilação da FAK na viabilidade das células de glioblastoma.....	37
5.2.Avaliação do efeito de inibição da fosforilação da FAK e expressão proteica de α B-cristalina.....	39
5.3.Avaliação do efeito de inibição da fosforilação da FAK na interação entre as proteínas FAK e α B-cristalina.....	41
6.CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença crônico-degenerativa, que envolve um conjunto de mais de 100 enfermidades caracterizadas pelo crescimento celular desordenado e pela rápida disseminação, tanto local quanto sistêmica. Devido à complexidade da condição clínica e à dificuldade terapêutica envolvida, trata-se de uma doença amplamente temida, associada à dor, sofrimento e morte (WAKIUCHI, 2020).

A estimativa de incidência de câncer no Brasil para o triênio 2026–2028, publicada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), prevê a ocorrência de cerca de 518 mil novos casos por ano no país (excluindo os tumores de pele não melanoma). Entre os tipos mais incidentes, destacam-se, nos homens, os cânceres de próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral, e nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide. O estudo também indica que o câncer figura como uma das principais causas de morbimortalidade no Brasil, aproximando-se das doenças cardiovasculares como a principal causa de morte (INCA, 2026).

No que se refere aos cânceres que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC), a estimativa para o mesmo triênio é de aproximadamente 12.060 novos casos anuais, sendo cerca de 6.500 em homens e 5.560 em mulheres. Apesar da baixa incidência proporcional, esses tumores apresentam elevada letalidade. No triênio de 2023-2025 em que a estimativa de incidência para tumores do SNC foi de 11.490 casos por ano, em 2023 houve o registro de 10.206 óbitos associados a esses tipos de tumores, demonstrando assim o expressivo impacto dessas neoplasias em termos de mortalidade (INCA, 2026).

Os tumores do SNC são divididos em neuroepiteliais (incluem gliomas), germinativos (incluem os meduloblastomas e os neuroblastomas), de nervos periféricos e meningiomas. Dentre esses, os gliomas destacam-se por representarem cerca de 33% dos tumores primários e 79% dos tumores malignos do SNC (SANTOS, 2021).

No que se refere a sua origem, os gliomas são tumores derivados das células da glia: astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células endimárias, sendo classificados histologicamente em astrocitomas, oligodendromas, gliomas oligoastrocíticos mistos e endimomas (WELLER *et al.*, 2015). Além disso, são categorizados também de acordo com seu grau de malignidade: sendo os graus 1 e 2 considerados menos agressivos, enquanto os graus 3 e 4 apresentam comportamento altamente agressivo e invasivo (HANIF *et al.*, 2017; WELLER *et al.*, 2015). Nesse contexto, o astrocitoma anaplásico (AA) e o Glioblastoma Multiforme (GBM) são os principais gliomas cerebrais de alto grau (SANTOS, 2021).

O GBM é o tipo mais frequente e maligno entre os astrocitomas, com idade média de diagnóstico em torno de 64 anos. Sua incidência é ligeiramente maior em homens do que em mulheres (razão 1,6:1), e mais comum em indivíduos caucasianos. Esses podem ser classificados como primários, quando surgem sem lesão precursora conhecida, ou secundários, quando se desenvolvem a partir da transformação de tumores de baixo grau (POUYAN *et al.*, 2025). Além disso, o mesmo apresenta um grau de malignidade 4, possuindo características muito agressivas, invasivas e destrutivas, com uma sobrevida que permanece em aproximadamente 15 meses (POUYAN *et al.*, 2025; TOUAT *et al.*, 2017).

Historicamente, o tratamento do GBM tem se baseado na ressecção cirúrgica ampla, seguida de radioterapia adjuvante ou radioterapia primária, em casos inoperáveis, e quimioterapia (POUYAN *et al.*, 2025; DAVIS, 2016). A temozolomida (TMZ) é o fármaco de primeira escolha no tratamento farmacológico, porém apresenta limitações devido à resistência tumoral, frequentemente associada a fatores genéticos e epigenéticos, além dos efeitos adversos provocados quando combinada à radioterapia (SINGH *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2020).

Nesta perspectiva, a complexidade do tumor, sua resistência ao tratamento e a baixa sobrevida dos pacientes reforçam a necessidade da busca por novas estratégias e alvos terapêuticos que possam aumentar a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Entre os alvos terapêuticos de interesse, destaca-se a Quinase de Adesão Focal (FAK), uma proteína reguladora de vias de sinalização essenciais à sobrevivência e migração celular. Estudos já evidenciaram a superexpressão dessa proteína em diversos tipos de câncer, como de mama, próstata e GBM, e sua associação à progressão e metástase tumoral (HU *et al.*, 2017; NATARAJAN; HECKER; GLADSON, 2003; SLACK-DAVIS *et al.*, 2009; VAN NIMWEGEN; VAN DE WATER, 2007).

Outra proteína de extrema relevância nesse estudo é a α B-cristalina, a qual está associada tanto a cânceres quanto a doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer. Ela exerce funções de chaperona, inibindo a agregação de proteínas mal dobradas, e citoprotetoras, modulando a atividade de proteínas sinalizadoras essenciais ao ciclo celular (PEREIRA *et al.*, 2014). O aumento de sua expressão está intimamente relacionado ao pior prognóstico em câncer de mama e GBM (BHAT *et al.*, 1999; GOPLEN *et al.*, 2010; MOYANO *et al.*, 2006). Estudos realizados por Pereira *et al.* (2014) demonstraram que a interação entre FAK e α B-cristalina desempenha papel crucial na viabilidade celular de miócitos cardíacos submetidos a estresse mecânico. O mesmo foi observado em células de GBM em pesquisa realizada por Folly *et al.* (2024). Sendo assim, tais resultados sugerem a

interação entre essas proteínas como um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos tratamentos para o GBM.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.Câncer

2.1.1. Fisiopatologia do câncer

O câncer se caracteriza como uma disfunção celular decorrente do processo biológico denominado carcinogênese, o qual compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que ocorrem em níveis genéticos e epigenéticos. A carcinogênese é dividida em três etapas principais: iniciação, promoção e progressão (KOYA; IBRAHIM, 2024).

A iniciação corresponde ao surgimento e acúmulo de mutações genéticas ou alterações epigenéticas, conferindo às células a capacidade de proliferação acelerada e de escape dos mecanismos regulatórios normais. A fase de promoção envolve a expansão clonal dessas células iniciadas, favorecendo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas. Por fim, a progressão tumoral é marcada pela aquisição de novas alterações genéticas que aumentam o potencial invasivo e metastático, permitindo a disseminação das células neoplásicas para tecidos e órgãos distantes do local de origem (KOYA; IBRAHIM, 2024).

2.2.Glioblastoma Multiforme

O GBM representa o subtipo mais maligno e disseminado dos gliomas, sendo o tumor cerebral primário maligno de maior incidência em adultos e com a menor taxa de sobrevivência, aproximadamente 15 meses. Ele é responsável por mais da metade dos casos de neoplasias malignas no SNC, sendo o tumor astrocítico com maior grau de malignidade, correspondendo ao grau 4 da atual classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS). Tal classificação reflete sua natureza altamente agressiva, crescimento acelerado e intensa capacidade de invasão difusa dos tecidos cerebrais adjacentes, características que o tornam a forma mais letal de tumor cerebral (KANDERI; MUNAKOMI; GUPTA, 2024; LAN; LI; ZHANG, 2024; LI; FENG; LU, 2022; LUCENA *et al.*, 2006).

O GBM é também classificado de acordo com suas características clínicas em primário (ou de novo) e secundário. O tipo primário surge sem um precursor tumoral identificado, correspondendo a aproximadamente 94,7% dos casos com idade média de ocorrência entre 59 e 62 anos e apresentando pior prognóstico. Enquanto o secundário resulta

da progressão de um glioma de baixo grau, sendo mais raro e acometendo pacientes relativamente jovens. Ambos os tipos de GBM se originam de células progenitoras gliais, contudo, o GBM secundário deriva da transformação de um astrocitoma pré-existente (DAVIS, 2016; KANDERI; MUNAKOMI; GUPTA, 2024; TAMIMI; JUWEID, 2017).

Embora essa classificação ainda seja utilizada no contexto clínico, em 2016 o GBM passou a receber uma classificação molecular baseada no *status* da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) do tumor. De acordo com essa abordagem, o GBM foi subdividido em glioblastoma IDH-mutante e glioblastoma IDH-selvagem (IDH-wild type). O GBM do tipo selvagem é o mais comum, representando cerca de 90% dos casos, e ocorre predominantemente em pacientes com idade superior a 55 anos. Por outro lado, o GBM IDH-mutante, que corresponde a aproximadamente 10% dos casos, é mais frequente em indivíduos jovens, geralmente decorrente da transformação de um glioma de baixo grau. Esse último está associado a uma maior sobrevida mediana e a um prognóstico mais favorável (GILARD *et al.*, 2021).

Em uma atualização realizada em 2021, a OMS estabeleceu que o GBM corresponde estritamente a tumores sem mutações em IDH, passando a ser denominado glioblastoma IDH do tipo selvagem. Já os tumores que apresentam mutação em IDH passaram a ser classificados como astrocitoma IDH-mutante (TORP; SOLHEIM; SKJULSVIK, 2022).

Por fim, o GBM se caracteriza pela presença de astrócitos neoplásicos pouco diferenciados, apresentando áreas de proliferação vascular e/ou focos de necrose. Macroscopicamente, o tumor tem origem predominante na substância branca cerebral, manifestando-se como uma grande massa hemisférica composta por regiões sólidas, císticas, necróticas e hemorrágicas. Entre os achados microscópicos mais relevantes, destacam-se a hiper celularidade, o caráter infiltrativo, os pleomorfismos celulares e nucleares, a atividade mitótica acentuada, a necrose de coagulação e a proliferação endotelial capilar (COLAPI *et al.*, 2023; LUCENA *et al.*, 2006).

2.2.1. Dados Epidemiológicos

Os tumores cerebrais representam cerca de 85–90% de todos os tumores primários do SNC. Em 2020, foi estimado que em todo o mundo, 3,08 em cada 100.000 pessoas foram diagnosticadas com um tumor primário no cérebro ou na medula espinhal. Nesse cenário, o GBM figura como o tumor cerebral primário maligno mais comum, representando 54% de todos os gliomas e 16% de todos os tumores cerebrais primários (COLAPI *et al.*,

2023; TAMIMI; JUWEID, 2017).

A incidência anual do GBM é variável, situando-se entre 3,19 e 4,17 casos por 100.000 pessoas. Observa-se que essa incidência aumenta progressivamente com a idade, atingindo seu pico entre 75 e 84 anos, com redução após os 85 anos. O diagnóstico ocorre predominantemente em faixas etárias mais avançadas, com média de 64 anos. Além disso, tende a ocorrer mais tardiamente no GBM primário (idade média entre 55 e 64 anos) do que no GBM secundário (idade média de aproximadamente 40 anos). Já em crianças, a ocorrência é incomum, correspondendo a cerca de 0,85 casos por 100.000 indivíduos (JEZIERZAŃSKI *et al.*, 2024; TAMIMI; JUWEID, 2017; SABOURI *et al.*, 2024).

Pesquisas também demonstram que a ocorrência do GBM é aproximadamente 1,6 vezes maior em homens do que em mulheres, além de ser cerca de 2,0 vezes mais frequente em indivíduos caucasianos quando comparados a africanos e afro-americanos. Ademais, observa-se menor incidência entre asiáticos e indígenas americanos (JEZIERZAŃSKI *et al.*, 2024; TAMIMI; JUWEID, 2017; WU *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços na pesquisa terapêutica, a taxa de sobrevida dos pacientes diagnosticados com GBM permanece limitada. A sobrevida global mediana situa-se entre 15 a 23 meses, enquanto a taxa de sobrevida em 5 anos é inferior a 6%, configurando o menor índice de sobrevida a longo prazo entre os tumores cerebrais malignos. A idade é um fator importante na predição da sobrevida do tumor, geralmente apresentando uma relação inversamente proporcional. Ademais, outros fatores prognósticos que afetam a sobrevivência de pacientes incluem a ressecabilidade do tumor, sua localização, tamanho, multifocalidade, comorbidades e condição geral do paciente (SABOURI *et al.*, 2024; SHERGALIS *et al.*, 2018).

Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento do GBM, a exposição a altas doses de radiação ionizante é o aspecto mais frequentemente associado. Desde a década de 1960, mais de 116 casos de GBM relacionados à exposição radioterápica ou ambiental foram documentados. De forma contrária, pacientes com asma e outros quadros alérgicos apresentam menor risco de desenvolver GBM, de forma que genótipos relacionados ao aumento do risco de asma estão associados a um risco reduzido a esse tipo de tumor. Cabe ressaltar ainda que, não foram encontradas associações entre fatores ambientais como tabagismo, fatores de risco nutricionais, campos eletromagnéticos de telefones celulares, ferimentos graves na cabeça, fatores de risco ocupacionais e exposição a pesticidas ao desenvolvimento do GBM (KHABIBOV *et al.*, 2022; YALAMARTY *et al.*, 2023).

Ainda hoje, o prognóstico do GBM simboliza um grande desafio. O manejo clínico e

os resultados do tratamento têm se mantido praticamente inalterados nas últimas quatro décadas. Entretanto, avanços recentes na pesquisa genética e molecular têm elevado as expectativas para o futuro manejo e prognóstico deste tumor devastador (SABOURI *et al.*, 2024).

2.2.2.Fisiopatologia do GBM

A fisiopatologia do GBM é composta por uma série de alterações genéticas e epigenéticas que conduzem a um crescimento tumoral agressivo e invasivo. Nesse sentido, torna-se essencial compreender que a iniciação e progressão desse tumor não se restringe a um único oncogene ou gene supressor de tumor, mas resultam de diferentes modificações associadas (POUYAN *et al.*, 2025).

Nessa perspectiva, acredita-se que alterações e/ou a ativação exacerbada de vias de sinalização essenciais - como Wnt, TGF- β , VEGF, EGFR, CDKN2A, NF- κ B e PI3K/AKT/mTORxw - atuam como protagonistas na fisiopatologia do GBM, favorecendo seu comportamento altamente agressivo. De modo geral, tanto o GBM primário quanto o secundário apresentam alterações nessas vias, o que resulta em proliferação celular desregulada e maior capacidade de sobrevivência das células tumorais, ao mesmo tempo em que possibilita o escape dos pontos de controle do ciclo celular, da senescência e dos mecanismos apoptóticos (POUYAN *et al.*, 2025; DAVIS, 2016).

A superexpressão de fatores de crescimento confere às células de glioblastoma uma vantagem competitiva, uma vez que essas células passam a produzir tanto os fatores quanto seus respectivos receptores, estabelecendo um mecanismo de sinalização autócrina contínua (NAKADA *et al.*, 2011). O EGFR, uma proteína transmembrana, apresenta superexpressão ou mutações em até 50% dos casos de GBM, associando-se a um comportamento mais agressivo ao estimular a proliferação e migração celular (KHABIBOV *et al.*, 2022; NAKADA *et al.*, 2011; TOUAT *et al.*, 2017).

Além do crescimento desregulado, a angiogênese possui participação essencial na progressão tumoral. A intensa vascularização caracteriza o GBM, sendo iniciada pela degradação de vasos sanguíneos e da matriz extracelular, seguida pela migração das células tumorais e pela formação de novos vasos (COSTA, 2025).

Outrossim, o gene *TP53*, responsável por codificar a proteína supressora tumoral p53, simboliza um dos genes mais frequentemente alterados em diversos tipos de câncer. No GBM, trata-se da segunda mutação mais prevalente, ocorrendo em cerca de 28,3% dos casos.

Essas alterações contribuem diretamente para a agressividade e o prognóstico desfavorável da doença. Além das mutações no próprio gene, também podem ocorrer metilação do seu promotor, redução da estabilidade da proteína p53, amplificação de genes inibidores e mutações ou deleções em componentes da via de sinalização associada ao p53, mecanismos que, em conjunto, comprometem sua função de controle do ciclo celular e indução a apoptose (GOUSIAS; THEOCHAROUS; SIMON, 2022; POUYAN et al., 2025). Ademais, o GBM ainda possui mecanismos de escape imunológico e alta heterogeneidade tumoral, dessa forma, o meio relativamente favorecido devido ao déficit imunológico no SNC associado as demais alterações descritas, colaboram para o prognóstico desfavorável observado na doença (KANDERI; MUNAKOMI; GUPTA, 2024).

2.2.3. Apresentação Clínica

A história clínica do GBM é geralmente curta, ocorrendo em menos de três meses em mais de 50% dos casos. Nesse contexto, os pacientes apresentam sinais e sintomas que podem ser focais ou gerais, dependendo do tamanho, da localização e da taxa de crescimento do tumor. A apresentação clínica mais frequente no momento do diagnóstico inclui cefaleia, náusea e déficits neurológicos focais ou progressivos, geralmente associados a tumores de grande porte ou a edema significativo (DAVIS, 2016; GILARD, *et al.*, 2021; LUCENA *et al.*, 2006).

Entre os sintomas mais comuns, destacam-se os relacionados à hipertensão intracraniana, que representam aproximadamente 30% dos casos, seguidos por déficit motor (20%), perda de peso e alterações na condição corporal (17%), confusão (15%) e déficit visual ou de linguagem (13%). Esses sintomas costumam surgir de forma associada, levando ao diagnóstico nas semanas ou meses subsequentes ao seu início (GILARD *et al.*, 2021).

2.2.4. Diagnóstico

Os métodos empregados para o diagnóstico do GBM englobam técnicas invasivas e não invasivas. Inicialmente, é realizada uma avaliação clínica que envolve exame físico e neurológico detalhado, aliado a exames de neuroimagem. Entre as modalidades de imagem, a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM) são as mais comumente utilizadas (LI; FENG; LU, 2022; LUCENA *et al.*, 2006; BRASIL, 2020).

Na prática clínica, a ressonância magnética se destaca como a técnica não invasiva

mais aplicada, devido à sua elevada sensibilidade e à capacidade de caracterizar o tumor em seus três planos ortogonais (axial, coronal e sagital). Por meio dessa tecnologia, é possível observar o tumor como uma massa de contorno irregular, geralmente com um anel de realce intenso e um centro hipointenso de necrose. Adicionalmente, podem ser identificados edema vasogênico circundante, hemorragia e deslocamento ou distorção ventricular (DAVIS, 2016; LI; FENG; LU, 2022; LUCENA *et al.*, 2006).

Para a confirmação diagnóstica definitiva, são aplicados exames histopatológicos, os quais requerem a ressecção do tumor (LI; FENG; LU, 2022). Em pacientes candidatos à cirurgia, recomenda-se que esse diagnóstico seja obtido durante o procedimento cirúrgico definitivo. Já em pacientes que não podem ser submetidos à cirurgia inicial, seja por condições clínicas desfavoráveis ou pela localização do tumor em áreas críticas, o diagnóstico pode ser realizado por meio de biópsia estereotáxica ou biópsia a céu aberto. Em casos de suspeita de GBM metastático, a citologia por aspiração com agulha fina mostra-se relativamente mais confiável, especialmente na análise de metástases extracranianas (BRASIL, 2020).

Além disso, para prever a invasividade e o prognóstico do GBM, é essencial avaliar o *status* de mutação de biomarcadores. Entre os principais, destacam-se as IDHs, utilizadas na classificação molecular do tumor e na previsão do prognóstico. Outros biomarcadores relevantes incluem a codeleção cromossômica 1p e 19q, mutações em *ATRX*, no promotor da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*), na proteína tumoral p53 (*TP53*), no proto-oncogene B-raf, e a mutação V600E da quinase serina/treonina BRAF (LI; FENG; LU, 2022).

2.2.5. Tratamento

Após o diagnóstico de GBM, o início imediato do tratamento é crítico para o controle da doença e a melhora do prognóstico. Para isso, o paciente deve ser submetido a uma avaliação clínica criteriosa, seguida da elaboração de um plano terapêutico individualizado. Esse plano deve ser definido por uma equipe multidisciplinar especializada, composta por neurocirurgião, oncologista clínico, radioterapeuta, patologista e neuroradiologista, garantindo uma abordagem integrada e baseada em evidências (BRASIL, 2020).

Atualmente, o tratamento padrão consiste em ressecção cirúrgica máxima segura, seguida de radioterapia (RT) concomitante à quimioterapia com TMZ e posteriormente ciclos de quimioterapia com TMZ (DAVIS, 2016).

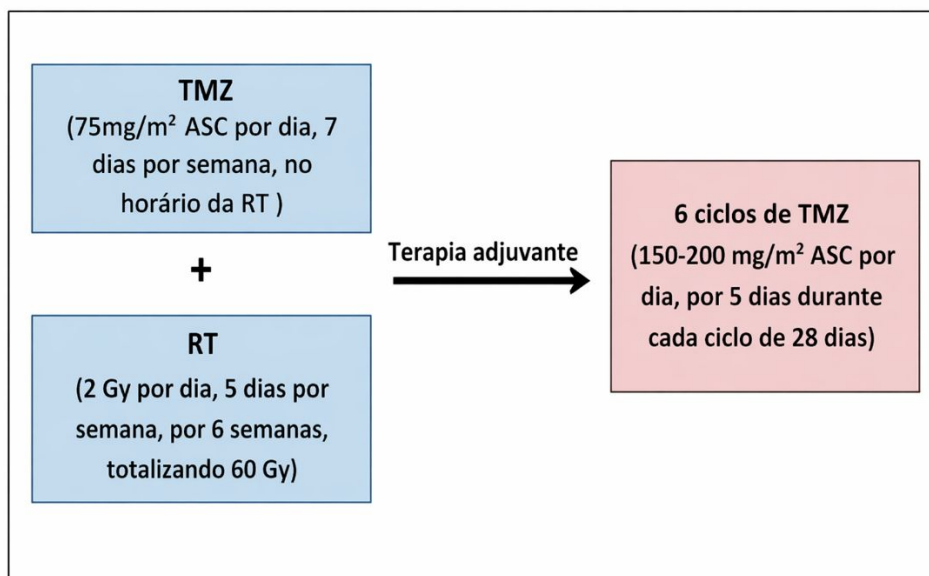
Nesse contexto, a cirurgia permanece como a abordagem terapêutica de primeira

escolha, sendo recomendada sempre que tecnicamente possível. Diversos estudos comprovam que a ampla ressecção tumoral está diretamente associada a melhores desfechos clínicos e maior sobrevida global. Todavia, essa intervenção nem sempre é viável, uma vez que o GBM apresenta comportamento altamente invasivo e, frequentemente, está localizado em áreas sensíveis do cérebro, responsáveis por funções motoras, sensoriais e da fala (DAVIS, 2016; LI; FENG; LU, 2022).

A RT adjuvante assumiu papel fundamental no manejo do GBM. Até 2005, a RT pós-operatória isolada era considerada o tratamento padrão, contudo, um estudo de fase III conduzido por Stupp *et al.* (2005) modificou significativamente essa abordagem. O estudo demonstrou que a combinação de RT com TMZ concomitante (conhecida como *regime de Stupp*) resultou em maior sobrevida mediana (14,6 meses) em comparação à RT isolada (12,1 meses) (DAVIS, 2016).

Dessa forma, a RT passou ser administrada ao longo de seis semanas, totalizando uma dose de 60 Gy, sendo associada a TMZ, a qual é administrada diariamente durante o período de RT e, posteriormente, por seis ciclos adjuvantes de cinco dias consecutivos a cada mês, um mês após o término da RT (Figura 1) (GILARD *et al.*; 2021).

Figura 1 - Protocolo padrão de *Stupp* para tratamento de GBM após ressecção cirúrgica.



Fonte: Adaptado de Jezierzański et al. (2024).

Os esforços para o desenvolvimento de um protocolo terapêutico eficaz no tratamento do GBM remetem à década de 1920. No entanto, mesmo após cerca de um século de pesquisas e avanços tecnológicos, ainda há limitações significativas quanto à eficácia dessas modalidades terapêuticas disponíveis, refletindo a natureza altamente agressiva e

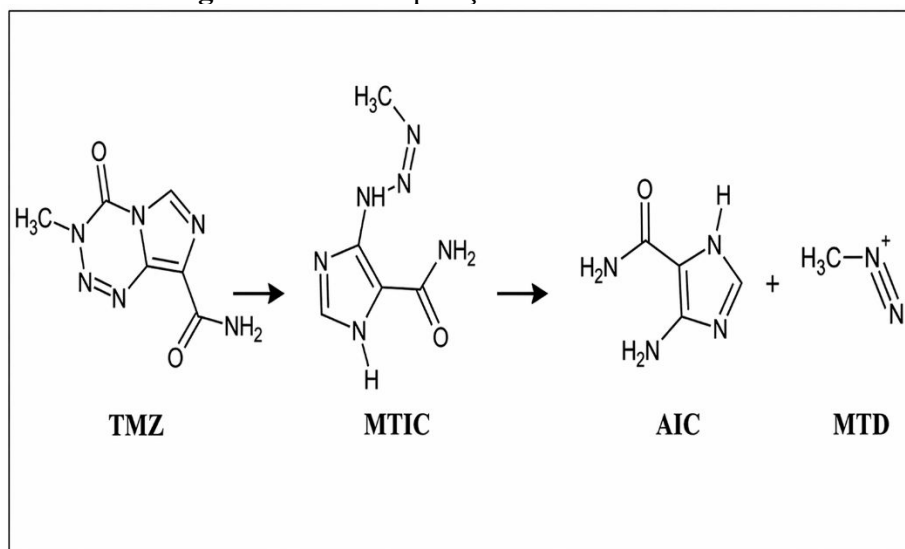
complexa dessa neoplasia (COSTA, 2025).

2.2.5.1. Temozolomida

A TMZ, quimicamente denominada 3-metil-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazina-8-carboxamida, é um análogo da dacarbazina que exerce ação citotóxica por meio da alquilação do DNA. O composto foi desenvolvido no final da década de 1980 pelo professor Malcolm Stevens e recebeu licença de uso pela primeira vez em 1999, sendo inicialmente indicado como terapia de segunda linha para o GBM (ORTIZ *et al.*, 2021). A substância é caracterizada por baixo peso molecular (194,154 g/mol) e caráter lipofílico, sendo rapidamente absorvida por via oral, com alta biodisponibilidade (96% a 100%). Devido à sua lipofilicidade, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), o que permite que atinja de forma eficiente os tumores localizados no cérebro (CONITEC, 2014).

Trata-se de um pró-fármaco que apresenta alta estabilidade química em pH inferior a 5, porém em pH fisiológico é rapidamente convertido em um composto ativo de curta duração denominado 5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida (MTIC). O MTIC é instável e se transforma em um íon metildiazônio (MTD), altamente eletrofílico, que reage com porções nucleofílicas do DNA, exercendo a ação alquilante. Além disso, é formado o produto final de degradação, 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AIC), o qual é eliminado pelo organismo (Figura 2) (CONITEC, 2014; LEE, 2016; FRESNAIS *et al.*, 2021).

Figura 2 - Decomposição da Temozolomida.



Fonte: Costa, 2025.

A citotoxicidade da TMZ resulta da capacidade alquilante de seu metabólito (MTD), que promove metilações predominantemente nos sítios N⁷ da guanina (≈70%), N³ da adenina (≈9%) e O⁶ da guanina (≈6%). Entre esses, a metilação em O⁶ guanina é considerada o principal evento citotóxico. Durante a replicação, a presença de O⁶-MeG leva ao pareamento incorreto da guanina com timina em vez de citosina, ativando o sistema de reparo por incompatibilidade (MMR). A tentativa repetida de correção pelo MMR desencadeia sinalização de dano ao DNA, resultando em bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, acúmulo de quebras simples e duplas na molécula de DNA e, conseqüentemente, indução de apoptose (FRESNAIS *et al.*, 2021; KHABIBOV *et al.*, 2022;).

2.2.5.2. Desafios do Tratamento

Apesar da TMZ continuar sendo o principal agente quimioterápico para o GBM, mais de 50% dos pacientes apresentam resistência ao tratamento, representando um enorme desafio. O mecanismo mais conhecido de resistência é o efeito da atividade da enzima MGMT. A MGMT é uma enzima endógena de reparo do DNA que ajuda a manter a estabilidade genômica por meio do reparo de erros de pareamento. Sob condições de tratamento com TMZ, a MGMT pode remover o grupo metil da O⁶-metilguanina, neutralizando assim o dano ao DNA induzido pelo fármaco e inibindo o efeito da TMZ. Nesse sentido, determinar a expressão de MGMT é um fator relevante na resposta ao tratamento, sendo que a hipermetilação do promotor dessa enzima está associada com uma redução de sua expressão e conseqüentemente com uma sobrevida prolongada dos pacientes com GBM (JEZIERZAŃSKI *et al.*, 2024; SINGH *et al.*, 2021).

Entretanto, os desafios no tratamento não se resumem ao mecanismo de resistência à TMZ citada. Estudos já relataram a existência de uma população única de células-tronco cancerosas (CTCs) indiferenciadas e altamente tumorigênicas, conhecidas como células-tronco de glioma, as quais possuem resistência ao tratamento com TMZ e ainda atuam como células iniciadoras de tumores recorrentes, responsáveis pela reincidência de tumores após o tratamento inicial. Além disso, a simples localização anatômica do GBM contribui com a resistência ao tratamento, uma vez que sua localização dificulta o acesso de fármacos, devido a proteção exercida pela BHE. A capacidade angiogênica do tumor é apontada como outro fator crítico, onde a formação de novos vasos sanguíneos contribui para a manutenção das células cancerosas. As alterações genéticas, como mutações no gene *TP53* e a desregulação de vias de sinalização, como PI3K/Akt/mTOR, também favorecem a resistência ao tratamento

(ERASIMUS *et al.*, 2016; LOUIS *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2021; ORTIZ *et al.*, 2021).

Por fim, a heterogeneidade intratumoral e intertumoral, é também considerado um grande desafio, dificultando o desenvolvimento de tratamentos eficazes que visem todas as células do tumor (YALAMARTY *et al.*, 2023).

Nesse sentido, a natureza invasiva e agressiva do GBM, combinada com a complexidade e desafios das abordagens terapêuticas são fatores que evidenciam a urgência e a necessidade da busca por novas estratégias terapêuticas (MALLICK *et al.*, 2016).

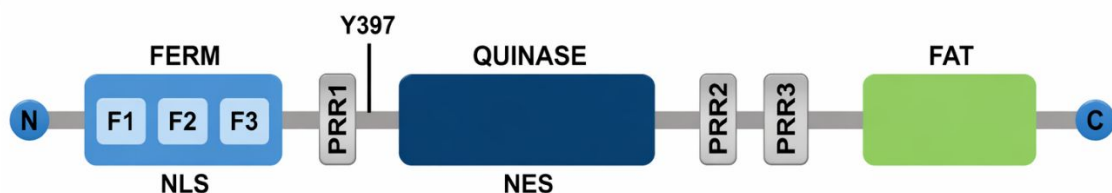
2.3. Quinase de Adesão Focal (FAK)

2.3.1. Estrutura e Ativação

A FAK é uma tirosina quinase não receptora que foi descoberta há aproximadamente trinta anos. A mesma é composta por 1052 aminoácidos apresentando peso molecular de 125 kDa. A codificação da FAK é realizada pelo gene da proteína tirosina quinase 2 (*PTK2*) localizado na região cromossômica 8q24.3 e sua expressão é ativada transcricionalmente pelo fator nuclear κ B (NF- κ B), bem com, pelo nanog (CHUANG *et al.*, 2022; TAN *et al.*, 2023).

A estrutura da FAK é constituída por três domínios, sendo: um domínio amino-terminal 4.1–ezrina–radixina–moesina, conhecido como domínio FERM, um domínio quinase e um domínio carboxi-terminal (FAT). Por sua vez, o domínio FERM é ainda dividido em subdomínios F1, F2 e F3, os quais possuem sequências particulares que culminam em funções distintas (Figura 3) (CHUANG *et al.*, 2022; HU *et al.*, 2024; TAN *et al.*, 2023).

Figura 3 - Estrutura esquemática da FAK.

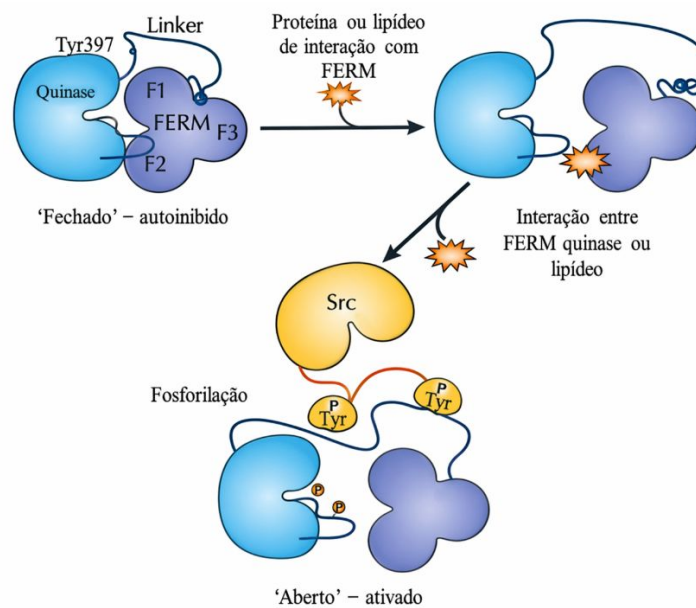


Fonte: Elaborado pela autora (2026) de acordo com Tan et al., 2023.

A ativação da FAK é modulada por diferentes fatores, os quais podem ser internos ou externos à célula, como: integrinas e receptores de fatores de crescimento. O principal ponto de regulação é o domínio FERM, que, em condições basais, se encontra associado ao domínio quinase, mantendo a proteína em um estado auto-inibitório. Uma vez estimulado, o domínio

FERM sofre alterações conformacionais, aliviando essa estrutura (TAN *et al.*, 2023). No momento em que a associação FERM-quinase é desfeita, o resíduo tirosina 397 (Y397) torna-se passível de autofosforilação, culminando em posterior recrutamento da proteína Src quinase, que interage com os domínios homólogos SRC2 (SH2) e 3 (SH3), iniciando à cascata de sinalização. Dessa forma, a proteína Src fosforila os resíduos tirosina 576 e 577, gerando um loop de ativação da FAK, o que impede que a proteína retorne para sua conformação auto-inibida (Figura 4) (COSTA, 2025; DAWSON *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2024).

Figura 4 - Mecanismo de ativação da FAK.



Fonte: Costa, 2025.

A princípio, a FAK foi associada como um componente do eixo de sinalização mediado por integrinas e receptores de fatores de crescimento (CHUANG *et al.*, 2022; HU *et al.*, 2024). Atualmente, estudos demonstram que essa proteína regula processos celulares críticos, dentre os quais incluem: sinalização de fatores de crescimento, progressão do ciclo celular, proliferação e sobrevivência celular, motilidade celular, angiogênese e estabelecimento de microambiente tumoral imunossupressor (TME) (CHUANG *et al.*, 2022; MURPHY *et al.*, 2020).

Quanto à sua localização, a FAK encontra-se associada no complexo de adesão focal (CAF), sendo esse constituído por três regiões: proximal, intermediária e regulatória. A região proximal é o local onde a FAK se encontra, sendo também composta de integrinas e é a área responsável pela sinalização; a região intermediária é a região de transdução de força e a

região regulatória é formada por actina (COSTA, 2025).

Inicialmente, pensava-se que a FAK se encontrava limitada ao citoplasma e à membrana plasmática, entretanto, essa ideia foi desconstruída através da descoberta de uma sequência de localização nuclear funcional (NLS) dentro do domínio FERM e uma sequência de exportação nuclear (NES) no domínio quinase. Nesse sentido, tais sequências permitem que a FAK circule entre o citoplasma e o núcleo, ampliando seu escopo de sinalização para a regulação de proteínas nucleares e expressão gênica (MURPHY *et al.*, 2020). As evidências ainda demonstram que essa translocação ocorre em resposta a condições específicas, como o desprendimento das células da matriz extracelular, a ativação de sinais de estresse e inibição da atividade da quinase (POMELLA *et al.*, 2022).

2.3.2. Atividade da FAK no câncer

A FAK demonstrou possuir papel essencial na patogênese do câncer (HU *et al.*, 2024). Nessa ótica, vários estudos evidenciam a sua superexpressão em uma diversidade de tumores, incluindo câncer de colorretal, de pulmão, de ovário, de pescoço, de bexiga, de mama e de esôfago (TAN *et al.*, 2023). Nesses tumores, a FAK atua promovendo o desenvolvimento de características fundamentais para a progressão da patologia - angiogênese tumoral, transformação epitélio-mesenquimal (TEM), capacidade de autorrenovação das células-tronco cancerosas e capacidade imunomoduladora (MURPHY *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a FAK participa da regulação de múltiplas vias de sinalização envolvidas na tumorigênese. Entre elas, destaca-se a via PI3K/AKT, um dos principais eixos modulados pela FAK, por regular processos essenciais à progressão tumoral, como: proliferação, sobrevivência, migração, invasão, metástase, remodelamento do microambiente tumoral, angiogênese e recrutamento de células inflamatórias. Após sua ativação, a FAK interage diretamente com a PI3K, promovendo a amplificação da ativação de AKT e desencadeando cascatas de sinalização subsequentes. Assim, ao atuar como reguladora a montante da via PI3K/AKT, a FAK favorece a ativação de efetores como mTOR, β -catenina e MDM2, contribuindo para a manutenção e progressão do fenótipo maligno (Figura 5) (HE *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2024).

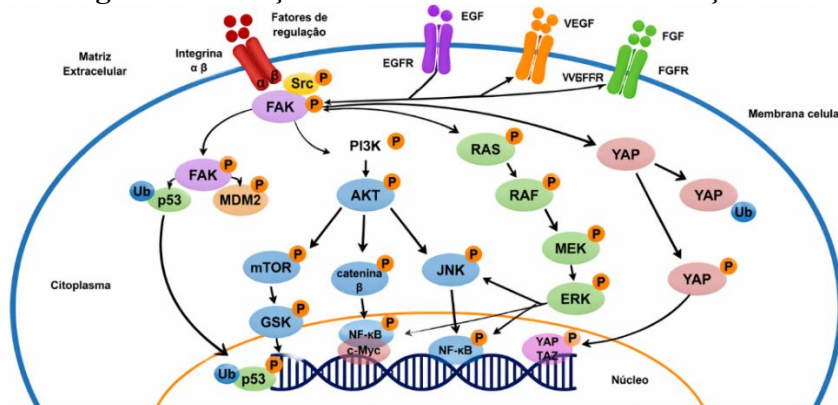
Outro alvo de destaque na regulação mediada pela FAK é a proteína supressora de tumor p53, codificada pelo gene *TP53*. A p53 é reconhecida como um regulador central do controle do ciclo celular e na prevenção da tumorigênese. Diante de seu papel antitumoral, essa proteína atua em vias que reduzem direta ou indiretamente a expressão da FAK,

modulando negativamente sua atividade e de vias associadas. Entretanto, em condições de desequilíbrio celular, a FAK pode translocar-se para o núcleo e promover a ubiquitinação de p53 e sua degradação proteossomal. Esse processo resulta na diminuição dos níveis funcionais de p53 e favorece um microambiente propício ao desenvolvimento e à progressão do câncer (Figura 5) (HU *et al.*, 2024).

Ademais, a via de sinalização RAS/RAF/MEK apresenta-se também como fator crucial para a sobrevivência e invasão tumoral, estabelecendo uma relação íntima com a expressão de FAK. Estudos sugerem que componentes dessa via são capazes de regular positivamente a expressão de FAK e ativar sua sinalização, favorecendo a capacidade de migração celular (Figura 5) (HU *et al.*, 2024).

Adicionalmente, vale ressaltar o papel da via da YAP na progressão tumoral. Estudos demonstraram que a YAP interage com os componentes da cromatina promovendo aceleração da metilação de histonas e a transcrição dos genes-alvo. Dessa forma, a célula adquire propriedades características de CTCs, como multiplicação anormal, quimiorresistência e metástase (ORTEGA *et al.*, 2021).

Figura 5 - Atuação da FAK sobre vias de sinalização celular.



Fonte: Adaptado de Hu *et al.* (2024).

2.3.2.1. Transição epitélio-mesenquimal

Por meio da regulação das vias de sinalização mencionadas e de outros mecanismos, a FAK controla processos essenciais à progressão tumoral. A TEM é um fenômeno fisiológico fundamental durante o desenvolvimento embrionário e a regeneração tecidual. No entanto, sua reativação em células neoplásicas está associada a características malignas, como migração e invasividade aumentadas, maior capacidade de autorrenovação tumoral e

resistência à quimioterapia e imunoterapia (TAN *et al.*, 2023).

Sendo assim, para que a TEM ocorra de forma eficaz, é necessário a redução de marcadores epiteliais, o aumento de marcadores mesenquimais e a presença de metaloproteinases da matriz (MMPs) — enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular. A FAK contribui diretamente para esses processos por meio da ativação de Src, modulando a expressão de E-caderina, um marcador epitelial, e TGF- β . Dessa forma, a FAK é considerada um dos principais reguladores da TEM (COSTA, 2025).

2.3.2.2. *Angiogênese*

Pesquisas evidenciam que os VEGFs, bem como, seus VEGFRs são os fatores pró-angiogênicos mais fundamentais no processo de angiogênese tumoral. As células neoplásicas desenvolvem um mecanismo autócrino, onde essas secretam VEGF e ativam o VEGFR em sua superfície, promovendo um circuito que estimula continuamente o crescimento celular (SHIAU *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a FAK participa desse mecanismo através da regulação nuclear da transcrição do VEGFR2. Ademais, estudos realizados em células de câncer de mama demonstrou que a inibição FAK se associa a menor expressão de VEGF e angiogênese, e sua deleção resulta na diminuição de VEGF, redução de permeabilidade vascular, menor proliferação de células endoteliais e morte por apoptose, reforçando seu papel nesse processo (COSTA, 2025).

2.3.2.3. *Microambiente tumoral*

O TME corresponde ao conjunto de componentes celulares e acelulares que circundam e interagem com o tumor. Esse ambiente inclui vasos sanguíneos e linfáticos, células imunes (como linfócitos T e B, células *natural killer* e macrófagos), células estromais (fibroblastos, células mesenquimais, pericitos e adipócitos), além de fatores solúveis e da MEC (MURPHY *et al.*, 2020). Assim, a FAK exerce papel central na organização do TME ao modular a dinâmica da MEC, coordenar a atividade de diferentes populações celulares e regular vias de sinalização associadas à imunossupressão, contribuindo para o estabelecimento e manutenção de um TME imunossupressor (HU *et al.*, 2024).

2.3.3. **Atividade da FAK no Glioblastoma**

Um grande número de estudos tem demonstrado que o aumento da expressão e da atividade da FAK está diretamente associado ao desenvolvimento do GBM. Evidências provenientes de modelos *in vitro* e *in vivo* indicam que a ativação dessa proteína desempenha papel central na proliferação, sobrevivência e migração das células deste tumor, sustentando processos que favorecem a progressão e agressividade tumoral (FOLLY *et al.*, 2024).

Especificamente, já foi demonstrado que a FAK desempenha um papel central na proliferação de células de glioma. Em um estudo realizado por Nuñez *et al.* (2021) em modelos murinos com xenoinxertos de glioma, verificou-se que a inibição simultânea de PYK2 (tirosina quinase 2 rica em prolina) e FAK promove um aumento significativo na sobrevivência dos animais. Além disso, os resultados indicaram que ambas as quinases atuam como mediadoras essenciais dos processos de migração e invasão celular estimulados pela interação das células tumorais com a microglia, evidenciando sua contribuição direta para a progressão tumoral.

No mesmo sentido, um estudo *in vivo* conduzido por Ortiz-Rivera *et al.* (2023) utilizando um modelo murino de GBM e o inibidor PF-562.271 para bloquear a atividade de FAK e PYK2 demonstrou redução significativa na expressão de ciclina D1, além de uma diminuição de aproximadamente 43% no volume tumoral e aumento de cerca de 33% na sobrevivência mediana dos animais tratados.

Esses achados reforçam o papel crítico das tirosinas quinases na fisiopatologia do glioblastoma e destacam a FAK como alvo molecular promissor.

2.3.4. Inibidor da FAK PF-562.271

A busca por estratégias terapêuticas para o tratamento de tumores, voltadas para proteínas quinases, tem ganhado destaque desde a década de 1980. Dentro desse cenário, os inibidores de quinase constituem atualmente a classe de fármacos mais ampla e mais aprovada, totalizando em mais de 120 moléculas aprovadas em nível global (LI *et al.*, 2024).

Nesse contexto, os inibidores da FAK (iFAK) têm sido reconhecidos como potenciais agentes terapêuticos no tratamento do câncer, uma vez que já foi demonstrada sua capacidade de reduzir a migração e sobrevivência de células tumorais (KATOH, 2024).

Os iFAK são classificados em quatro grupos: inibidores do sítio de ligação do ATP (inibidores competitivos do ATP), inibidores do domínio FAK-FERM, inibidores do domínio FAK-FAT e inibidores alostéricos (inibidores não competitivos do ATP), todavia, os iFAK mais potentes identificados até o momento se enquadram na categoria de inibidores

competitivos de ATP (SPALLAROSSA *et al.*, 2022). Esse grupo é marcado pela presença de um núcleo de pirimidina 2,4-dissubstituído, o que os tornam capazes de compartilhar uma orientação de ligação comum com o bolso de ligação de nucleotídeos do domínio quinase, impedindo assim a fosforilação da FAK (COSTA, 2025; SPALLAROSSA *et al.*, 2022).

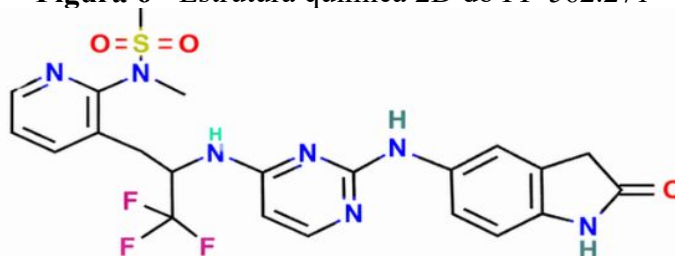
Nesse sentido, o PF-562.271, uma diaminopirimidina, se apresenta como um potente inibidor reversível e competitivo de ATP, possuindo um IC₅₀ de 1,5 nmol/L (COSTA, 2025; ROBERTS *et al.*, 2008). Além disso, o mesmo se encontra atualmente na Fase I de desenvolvimento clínico (Figura 6) (COSTA, 2025).

Diversas pesquisas têm investigado a atividade do PF-562.271 em células tumorais, incluindo modelos de GBM. Hu *et al.* (2017) demonstraram que o PF-562.271 suprime de forma significativa a proliferação e a formação de colônias em linhagens de osteossarcoma humano. De forma semelhante, Pan *et al.* (2023) observaram que o composto inibe a adesão, migração e proliferação em células de carcinoma seroso de alto grau (HGSO).

No contexto do GBM, Ortiz-Rivera *et al.* (2023) relataram que a associação do PF-562.271 com a TMZ reduziu de maneira significativa a viabilidade celular, a progressão do ciclo celular, a invasão e a formação de invadopódios em modelo murino, quando comparado ao uso isolado da TMZ. Além disso, Rolon-Reyes *et al.* (2015) demonstraram que a inibição farmacológica combinada de FAK e PYK2 pelo PF-562.271 foi capaz de reverter o efeito pró-migratório exercido pela microglia sobre células de glioma em linhagens de roedores (C6 e GL261) e humanas (U-87MG, A172 e HS683).

Assim, diante dos resultados positivos encontrados, os iFAK, incluindo o PF-562.271, têm se destacado como potenciais agentes terapêuticos no tratamento de tumores sólidos, particularmente no glioblastoma.

Figura 6 - Estrutura química 2D do PF-562.271



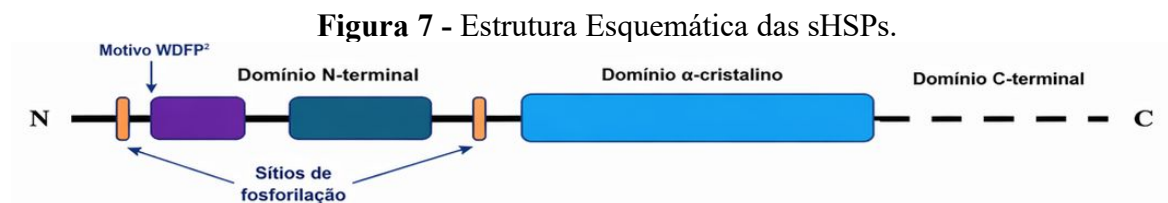
Fonte: PubChem.

2.4.αB-cristalina (HSPB5)

2.4.1. Estrutura e Funções

As *small heat shock proteins* (sHSPs) constituem uma classe da superfamília das HSPs caracterizadas por baixo peso molecular (12–43 kDa). Sua principal função é atuar como chaperonas moleculares, mediando o transporte de proteínas entre compartimentos celulares, auxiliando no dobramento e redobramento de proteínas recém-sintetizadas ou danificadas, prevenindo a agregação proteica, direcionando proteínas para vias de degradação e promovendo a dissolução de complexos proteicos (SOUZA, 2009).

Estruturalmente, as sHSPs compartilham uma organização conservada composta por um domínio α -cristalino (ACD) de aproximadamente 80–100 aminoácidos, localizado entre uma região amino-terminal (NTR) altamente variável e uma região carboxi-terminal (CTR) flexível, que contribui para a dinâmica de oligomerização (figura 7) (ZOUBEIDI; GLEAVE, 2012).



Fonte: Costa, 2025.

Dentre as dez sHSPs humanas, destaca-se a α B-cristalina (HspB5), amplamente distribuída e altamente abundante, apresentando massa monomérica de ~20 kDa. Ela constitui uma das principais proteínas do cristalino, mas também pode ser encontrada em outros tecidos, como cérebro, ovários, ossos e coração (COSTA, 2025; HAYASHI; CARVER, 2020).

A α B-cristalina desempenha papel relevante na regulação da apoptose. Estudos demonstram que ela interage com proteínas pró-apoptóticas como Bax, Bcl-xS e p53, impedindo sua translocação para as mitocôndrias, além de inibir a ativação da pró-caspase-3 na via mitocondrial, promovendo resistência à morte celular. Dessa forma, a disfunção da α B-cristalina está associada a diversas doenças humanas (HAYASHI; CARVER, 2020).

Nos últimos anos, sua participação na carcinogênese tem recebido destaque. A α B-cristalina tem sido identificada como uma nova oncoproteína e como biomarcador prognóstico em diferentes tumores sólidos, incluindo câncer de mama, colorretal, renal, tireoidiano e carcinomas de células escamosas da cabeça, pescoço e boca (HAYASHI;

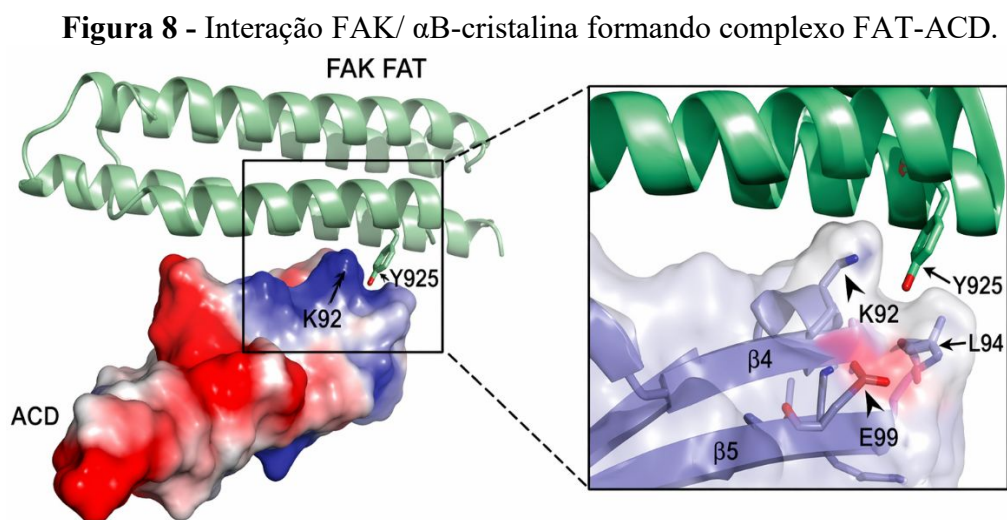
CARVER, 2020; LI *et al.*, 2017).

No SNC, sua expressão constitutiva foi detectada em gliomas (ARRIGO *et al.*, 2007). Estudos adicionais em GBM realizados por Goplen *et al.* (2010) e Wisniewski e Goldman (1998) confirmam sua associação com fenótipo invasivo e resistente à apoptose.

2.5. Interação FAK/ α B-cristalina

A interação entre FAK e α B-cristalina foi descrita pela primeira vez por Pereira *et al.* (2014). No estudo, cardiomiócitos submetidos a estresse mecânico apresentaram uma interação funcionalmente relevante entre essas proteínas. Os autores demonstraram que a α B-cristalina protege a FAK da degradação mediada pela calpaína, reduzindo assim a susceptibilidade dos cardiomiócitos à apoptose. Além disso, determinaram que essa interação ocorre por meio da formação de um complexo entre o domínio FAT da FAK e o domínio α -cristalino (ACD) da α B-cristalina (Figura 8).

Mais recentemente, Folly *et al.* (2024) identificaram a mesma interação em células de GBM. O estudo mostrou que a inibição dessa interação, por meio de um peptídeo bloqueador, reduz a viabilidade celular, induz apoptose e promove alterações morfológicas, indicando papel funcional da interação FAK/ α B-cristalina na sobrevivência desse tipo de tumor.



Fonte: Pereira *et al.*, 2014

3.OBJETIVOS

3.1.Objetivo geral

Avaliar os efeitos da inibição da fosforilação da FAK pelo PF 562.271 sobre a viabilidade da linhagem celular de glioblastoma T98G *in vitro* e na interação entre as proteínas FAK/ α B-Cristalina.

3.2.Objetivos específicos

1. Avaliar a viabilidade das células de glioblastoma T98G após tratamento com o inibidor de FAK PF-562.271;
2. Avaliar a fosforilação de FAK e a expressão proteica de α B-Cristalina em células de glioblastoma T98G após o tratamento com inibidor de FAK PF-562.271;
3. Avaliar a interação entre as proteínas FAK/ α B-Cristalina em células de glioblastoma T98G após o tratamento com inibidor de FAK PF-562.271.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.Cultura de células

Para a realização do estudo foi utilizada a linhagem celular T98G. As células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) provenientes de um paciente homem, caucasiano, de 61 anos (T98G ATCC® CRL-1690). A cultura foi realizada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Vitrocell Embriolife, D0069) contendo 1% de Penicilina/Estreptomicina (LONZA, 21F095302), 1% de piruvato (LONZA, 13-115E), 1% de aminoácidos (LONZA, BE13-114E) e 10% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia, 10-BIO500) previamente inativado por aquecimento em banho-maria a 56°C por 30 minutos.

As células foram acondicionadas em garrafas de cultura de 25cm³ e 75cm³ em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C até atingirem 90% de confluência, quando foram destacadas utilizando solução de tripsina 0,25% (Sigma Aldrich T4049) e centrifugadas a 4°C, 1500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi homogeneizado em meio de cultura; as células foram contadas em câmara de Neubauer (Hausser Scientific 3100) com corante azul de tripan 0,4% (Sigma Aldrich, 15250-061) para o cálculo de viabilidade. Posteriormente, as células foram plaqueadas conforme ensaio em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina.

4.2.Ensaio de viabilidade (MTT)

A avaliação da viabilidade das células foi realizada pela técnica de MTT conforme Mosmann, 1983. A técnica consiste na redução do sal tetrazólico [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolbrometo] pelas enzimas mitocondriais de células ativas, convertendo-o em formazan e transformando a coloração do meio de amarelo para púrpura, sendo a quantidade de formazan gerada proporcional à concentração de células viáveis (Mosmann, 1983). As células foram incubadas por 24 horas em placas de 96 poços contendo 2x10⁴ células por poço. A incubação foi feita nas mesmas condições da cultura. O tratamento com PF-562.271 foi realizado nas concentrações 50µM, 75µM, 100µM, 200µM e 400µM. Como controle negativo, foi utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, D8418), diluente do PF. A concentração de DMSO foi inferior a 0,5% no grupo tratado e controle.

Decorrido o tratamento, o meio foi retirado, acrescentado 180 µL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina e foram

adicionados 20µL de solução de MTT (SigmaAldrich, M5655) 5mg/mL seguido de incubação a 37°C em 5% de CO₂ por 4 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas à temperatura ambiente por três minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi retirado para a adição de 200 µL de DMSO, com incubação posterior das placas por 30 minutos nas mesmas condições anteriores. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de microplaca (ThermoFisher Multiskan FC51119000) a 570 nm, a partir da qual as médias para cada tratamento foram calculadas e subtraídas do branco. O controle DMSO foi considerado como 100% de viabilidade. A partir dos cálculos, foi determinada a melhor concentração de ação do PF, que foi utilizada nos ensaios posteriores.

4.3.Extração de proteínas

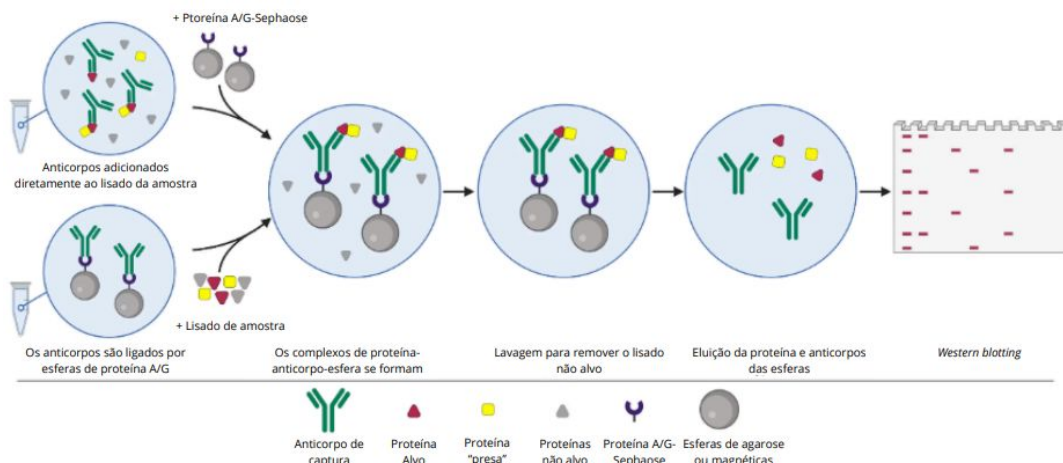
Foram plaqueadas 1×10^6 células em placas de 90 mm e incubadas por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Após o plaqueamento, as células foram tratadas com a melhor concentração de PF-562.271 observada no ensaio de MTT (200µM) por 24 horas. Em seguida, as placas foram acondicionadas em gelo, o meio foi retirado e foi adicionado PBS em quantidade suficiente para lavagem. Adicionou-se 200 µL/ 1×10^6 células de tampão de extração RIPA (50mM Tris-HCl pH7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP40; 0,25% Deoxicolato de Sódio; ,5mM Fluoreto de Sódio; 2mM Ortovanadato de Sódio; 100µg/ml PMSF; 0,1mg mg/ml aprotinina) e as células foram removidas com auxílio de *scrapers*. Os lisados celulares foram submetidos à passagem por seringa de insulina 10 vezes para otimizar a eficiência da extração proteica. Em seguida os mesmos foram incubados em gelo por 30 minutos antes de serem centrifugados a 11000 rpm por 20 minutos a 4°C. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) consoante Smith *et al.*, 1985. Após quantificação, as amostras foram acrescidas de Laemily 5x (0,0625M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) e aquecidas a 95°C por cinco minutos, permanecendo armazenada em freezer -20°C até utilização.

4.4.Co-Imunoprecipitação

Os extratos proteicos (aproximadamente 500 µg de proteína total) foram incubados com 10 µl de anticorpo anti-αB-cristalina, e aproximadamente 40 µl de Proteína A/G-Sepharose

6MB (PROTGA-RO Roche) foram adicionadas a cada amostra, mantendo-as sob agitação leve a 4°C durante 16 horas. Após centrifugação por 1 minuto a 800 rpm a 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o precipitado submetido a 5 lavagens com tampão de lavagem para imunoprecipitado (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA 0,5% TritonX-100, 2mM Ortovanadato de Sódio). Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se ao precipitado aproximadamente 40 µl de tampão da amostra 1x. O precipitado foi submetido a eletroforese e o ensaio de *Western Blotting* foi realizado com anticorpos anti-FAK e anti- α Bcrystalina, figura 9.

Figura 9 - Esquema de ensaio de co-imunoprecipitação



Fonte: Adaptado de Hamnett (2024)

4.5. Western Blotting

As amostras foram submetidas à eletroforese desnaturante em gel 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para a corrida, foi utilizado o tampão de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,4) e a corrente aplicada foi de 30 V por 30 minutos, 100 V por 90 minutos e 120 V até a saída das proteínas do gel em cuba Digel (DGV10). A transferência foi feita em membrana de PVDF (Amersham Hybond P0.45). Posteriormente, foi realizada a transferência por 150 minutos a 300 mA utilizando cuba de transferência da BIORAD. A fonte usada para corrida e para transferência também foi da BIORAD.

A membrana foi bloqueada por 2 horas com solução de bloqueio de soro albumina bovina (BSA) 5% em tampão TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6) seguida de incubação com anticorpo primário *overnight* a 4°C e anticorpo secundário *anti-mouse* (GE Amersham NA934 V) ou *anti-rabbit* (GE Amersham NA931V) por 45 minutos.

Após cada incubação, foram realizadas três lavagens com TBS-T de 10 minutos sob agitação.

Os anticorpos e suas diluições estão especificados no quadro 1. A detecção foi realizada por meio de kit ECL Prime da Amersham (GE Health Care RPN2232) conforme instruções do fabricante e utilizando-se filme fotográfico CL-Xposure™ Film (Thermo Scientific 34089) para o *blotting* de actina e o filme Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Health Care 28-9068-36) para os demais *blottings*. O tempo de exposição foi ajustado conforme necessidade. A revelação foi feita com revelador e fixador radiográficos da Carestream®. A quantificação das bandas foi feita por densitometria óptica como *software* Image J após tratamento das imagens em programa de edição de imagens.

Quadro 1 - Especificação dos anticorpos

Anticorpo	Espécie	Marca. Código	Solução de bloqueio	Diluição do primário	Diluição do secundário
Anti-FAK	<i>Rabbit</i>	Santa Cruz, SC1688	BSA 5%	1:1000/BSA 5%	1:5000/BSA 5%
Anti-pFAK	<i>Rabbit</i>	Cell Signaling, #3283	BSA 5%	1:1000/BSA 5%	1:5000/BSA 5%
Anti- α B-Cristalina	<i>Mouse</i>	BIORAD, MCA26978	BSA 5%	1:10000/BSA 5%	1:5000/BSA 5%
Anti-Actina	<i>Mouse</i>	BIORAD, VMA00078	BSA 5%	1:1000/BSA 5%	1:5000/BSA 5%

Fonte: Costa, 2025.

4.6. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 8 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Foram usados regressão linear e ANOVA com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para os ensaios de viabilidade, o teste de Dunnett foi utilizado como *post hoc* para ANOVA. Para determinação da concentração inibitória de 50% (CI_{50}) foi utilizado a regressão não linear, e os dados referentes ao Western Blotting foram processados através do software ImageJ. Os resultados correspondem à média de três experimentos independentes.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.Avaliação do efeito da inibição da fosforilação da FAK na viabilidade das células de glioblastoma

A avaliação do efeito da inibição da fosforilação da FAK sobre a viabilidade de células de glioblastoma foi realizada pelo ensaio de MTT. Os resultados demonstraram que, após 24 horas de tratamento, houve redução significativa da sobrevivência celular nas concentrações de

200 μM e 400 μM , correspondendo a aproximadamente uma redução de 30% e 58%, respectivamente, em comparação ao controle negativo (DMSO). Em contrapartida, não foram observadas alterações expressivas para as concentrações de 50 μM , 75 μM e 100 μM (Figura 9A). Através dos resultados provenientes do ensaio de MTT, a dose de 200 μM de PF foi selecionada para a realização dos ensaios posteriores, considerando o melhor efeito dose-resposta observado.

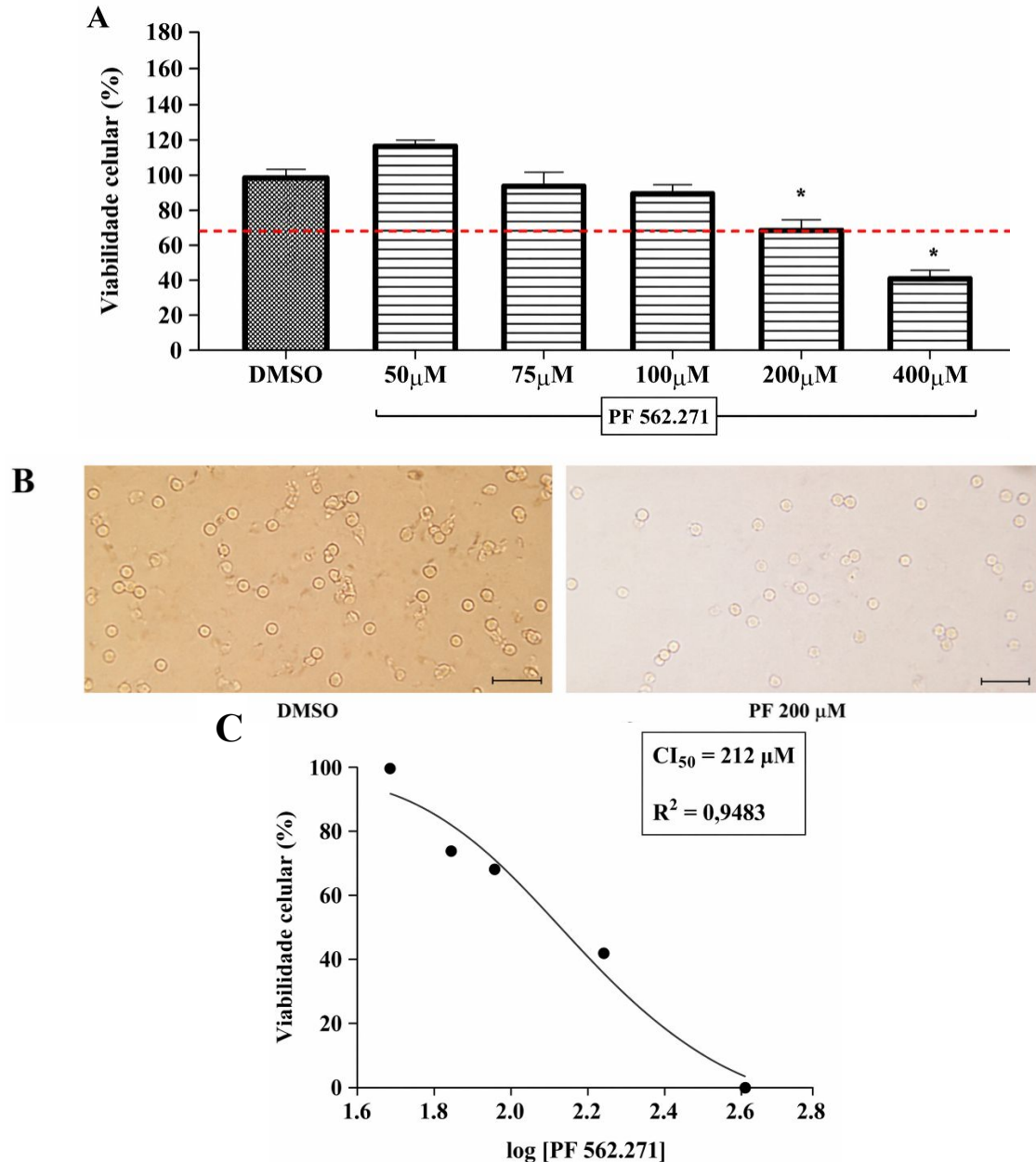
Ademais, a influência do composto sobre a densidade celular foi avaliada também através da microscopia óptica. Para essa análise, as células foram tratadas com PF-562.271 por 24 horas na concentração de 200 μM . Ao término do tratamento, a observação microscópica revelou redução marcante no número de células, quando comparadas ao controle negativo (DMSO) (Figura 9B).

Adicionalmente, a CI_{50} do PF-562,271 determinada nas condições experimentais foi de 212 μM (Figura 9C).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem a necessidade da utilização de concentrações elevadas de PF-562.271 para a indução de efeito citotóxico significativo em células de glioblastoma da linhagem T98G. Esse comportamento demonstra diferença expressiva em comparação com o observado em outros trabalhos dispostos na literatura, os quais empregaram o mesmo composto, em diferentes linhagens tumorais, por período de tratamento de 72 horas. Hu *et al.* (2017), por exemplo, demonstraram que linhagens de osteossarcoma apresentam elevada sensibilidade ao PF-562,271, com valores de CI_{50} variando entre 1,76 e 3,83 μM . De forma semelhante, Valente *et al.* (2023) observaram redução significativa da viabilidade das linhagens hematológicas HEL e SET-2 nas concentrações de 5 μM e 10 μM , com CI_{50} de 3,90 e 3,11 μM , respectivamente. Além disso, Tang *et al.* (2016)

relataram que linhagens de câncer de pulmão com mutações em *KRAS* apresentaram CI_{50} entre 2 e 4 μM , enquanto linhagens com *KRAS* selvagem exibiram menor sensibilidade, com $IC_{50} \geq 8 \mu\text{M}$.

Figura 10 – Análise da resposta dose-dependente ao PF-562.271 em células T98G após 24 horas de tratamento (A); avaliação da redução da densidade celular em cultura por microscopia óptica (B); e determinação da CI_{50} por regressão não linear (C)



Legenda: DMSO: controle negativo; PF 562.271: inibidor de FAK; Linha vermelha: ponto de redução da viabilidade em $\geq 30\%$; *: diferença significativa em relação ao controle negativo (DMSO; $p < 0,05$) (A). Avaliação da densidade celular por microscopia óptica após tratamento com DMSO e PF-562.271 (200 μM) (B). Curva de regressão não linear utilizada para determinação de CI_{50} (C).

Esses achados evidenciam que, o PF-562.271 é capaz de reduzir a viabilidade celular em diferentes tipos tumorais, comprovando a relevante participação da p-FAK nos processos

de sobrevivência celular. Entretanto, as células de GBM T98G demonstram menor sensibilidade ao composto. Isso sugere a presença de mecanismos de resistência intrínsecos, possivelmente relacionados a vias de sobrevivência altamente ativas características desse subtipo tumoral.

5.2. Avaliação do efeito de inibição da fosforilação da FAK e expressão proteica de α B-cristalina

Para avaliar o efeito do PF-562.271 sobre a fosforilação da FAK e a expressão proteica de α B-cristalina, foi realizado o ensaio de *Western Blotting*. Os resultados obtidos demonstraram que após o tratamento com o composto houve uma redução de aproximadamente 98% na fosforilação do resíduo Y397 da FAK em comparação com o tratamento controle negativo (DMSO). Por outro lado, não foram observadas qualquer relação entre a inibição da FAK e a expressão proteica de α B-cristalina (Figura 11A-C).

A literatura reporta amplamente que a FAK se encontra superexpressa em diversas linhagens tumorais, estando essa superexpressão associada a características invasivas e metastáticas, além de se correlacionar com prognóstico clínico desfavorável em diferentes tipos de cânceres (HU *et al.*, 2017; MURPHY *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2018).

No estudo realizado por Ren *et al.* (2015), que investigou a expressão de FAK em pacientes diagnosticados com osteossarcoma, observou-se superexpressão da proteína em 61,95% dos casos (70/113). Além disso, os autores verificaram que os níveis elevados de FAK e p-FAK se correlacionaram significativamente com redução da sobrevida global e menor tempo livre de metástases, reforçando o papel dessa proteína como marcador de agressividade tumoral.

Diante disso, torna-se evidente que a busca por estratégias capazes de inibir a atividade de FAK e mitigar seus efeitos na progressão neoplásica é de grande relevância, destacando o potencial terapêutico de inibidores de quinases.

Nesse contexto, o PF-562.271 tem sido amplamente empregado como inibidor farmacológico de FAK, e sua capacidade de reduzir a fosforilação desta proteína já foi demonstrada em diversos modelos experimentais. No estudo de Stokes *et al.* (2011), conduzido em células de câncer pancreático, a adição de PF-562.271 promoveu redução significativa da fosforilação de FAK nas linhagens MPanc-96 e MAD08-608, sendo observada inibição máxima no resíduo Y397 em concentrações de 0,1 a 0,3 μ M.

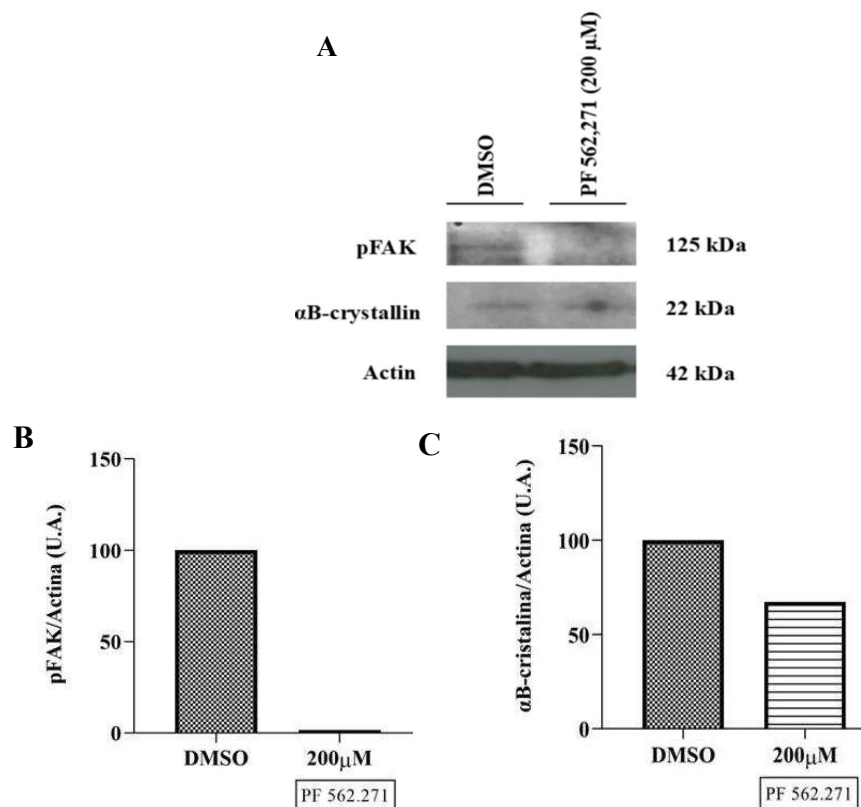
De forma semelhante, Weimer *et al.* (2013) relataram diminuição expressiva da

fosforilação de FAK em células imunes tratadas com o inibidor. Além disso, os autores destacaram que o PF-562.271 também exerceu efeito sobre outros sítios de ativação da FAK, como Y576/577 e Y925, apresentando um padrão de inibição coordenado. Ainda, Ortiz-Rivera *et al.* (2023) demonstraram que o tratamento com PF-562.271 em modelos animais de glioma resultou em redução de aproximadamente 50% da fosforilação de FAK e PYK2, reforçando a atuação desse composto na supressão da sinalização pró-tumoral mediada por quinases.

De forma complementar, a evidência da redução da fosforilação da FAK neste ensaio, reforça a associação direta entre a diminuição da viabilidade celular observada e a inibição dessa proteína.

Quanto a invariabilidade da expressão proteica de α B-cristalina, sugere-se que o PF-562.271 não interfere na ativação dessa chaperona, o que indica que a ação do PF-562.271 é limitada à via de fosforilação da FAK, não promovendo, portanto, mecanismos compensatórios de resposta citoprotetora mediados por α B-cristalina.

Figura 11 - Avaliação da fosforilação de FAK e expressão proteica de α B-cristalina em células T98G tratadas com PF-562.271 por 24 horas (A-C).

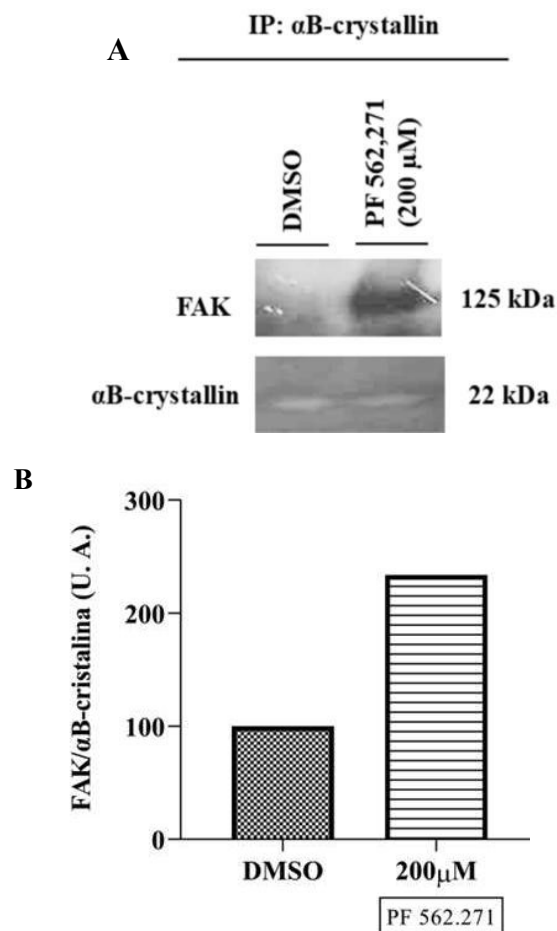


Legenda: *Western blotting* representativo de p-FAK e expressão proteica de α B-cristalina; DMSO: controle negativo; PF-562.271: inibidor de FAK; Actina: normalizador do *Western Blotting* (A). Quantificação densitométrica da expressão de p-FAK normalizada em relação a actina (pFAK/actina) (B); Quantificação densitométrica da expressão de α B-cristalina normalizada em relação a actina (α B-cristalina /actina) (C).

5.3. Avaliação do efeito de inibição da fosforilação da FAK na interação entre as proteínas FAK e α B-cristalina

A interação entre FAK e α B-cristalina foi analisada por meio do ensaio de co-imunoprecipitação. Os resultados demonstraram um aumento significativo da associação entre essas proteínas nas células de glioblastoma após o tratamento com PF-562.271, indicando que essa interação ocorre de forma mais eficaz quando a FAK se encontra em seu estado inativo (Figura 12).

Figura 12 - Avaliação da interação FAK/ α B-cristalina em células T98G tratadas com PF-562.271 por 24 horas (A-B).



Legenda: *Western blotting* representativo da interação FAK/ α B-cristalina; DMSO: controle negativo (A). Quantificação densitométrica da proteína FAK co-imunoprecipitada, normalizada em relação à α B-cristalina (FAK/ α B-cristalina) (B).

Em um estudo anterior, realizado por Pereira *et al.* (2014), foi observado pela primeira vez que a interação FAK/ α B-cristalina é essencial para manter a sobrevivência de miócitos cardíacos submetidos a estresse mecânico. De fato, a depleção de α B-cristalina

resultou em uma redução significativa nos níveis da proteína FAK em miócitos cardíacos submetidos a estiramento e em corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta. Uma vez interrompida a interação, as células morreram por apoptose, devido à redução nos níveis de FAK e consequente ativação da cascata de sinalização de apoptose (PEREIRA *et al.*, 2014).

Recentemente, Folly *et al.* (2024) demonstraram em seu estudo que a interrupção da interação FAK/ α B cristalina culminou na morte de células de GBM, corroborando a relevância desta interação na sobrevivência de diferentes linhagens celulares, incluindo a linhagem celular estudada neste trabalho.

De forma complementar aos dados disponíveis na literatura sobre a interação entre essas proteínas, os resultados deste estudo indicam que a associação entre FAK e α B-cristalina não está restrita ao estado de fosforilação da FAK, uma vez que foi demonstrado o aumento dessa interação quando a FAK encontra-se inativa.

Ademais, considerando a correlação entre os resultados obtidos neste ensaio e no ensaio de viabilidade celular, sugerimos que o aumento da interação entre FAK/ α B - cristalina possivelmente pode ter reduzido o efeito inibitório do PF- 562.271, conferindo a essas células maior resistência a morte celular, uma vez que foram necessárias concentrações elevadas do composto para promover uma redução significativa da viabilidade celular. A associação dos resultados obtidos neste estudo reforça a necessidade de elucidar os mecanismos bioquímicos envolvidos na interação dessas proteínas como potencial alvo no tratamento do GBM.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a proteína FAK desempenha papel essencial em mecanismos críticos associados à sobrevivência das células de glioblastoma multiforme, sendo seu estado de fosforilação um elemento determinante nesse processo, uma vez que o tratamento com inibidor PF-562.271 resultou em redução acentuada da viabilidade das células tratadas. Ademais, os achados apontam que a interação FAK/ α B-Cristalina não se limita ao estado de ativação da FAK, considerando que sua inibição intensificou essa associação, sugerindo assim o papel relevante da interação dessas proteínas em condições de estresse celular, como o tratamento por PF.

Dito isso, os resultados apresentados neste trabalho reforçam que a FAK e sua interação com a proteína α B-cristalina representam um potencial alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o glioblastoma multiforme. Todavia, são necessários estudos complementares para elucidar o entendimento dos mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

- ANGOM, R. S.; NAKKA, N. M. R.; BHATTACHARYA, S. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. **Brain Sciences**, v. 13, n. 11, 2023.
- ARRIGO, A.P. *et al.* Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. **FEBS letters**, v. 581, n. 19, p. 3665–3674, 2007.
- BHAT, S.P. *et al.* Ectopic expression of α B-crystallin in Chinese hamster ovary cells suggests a nuclear role for this protein. **Europe an Journal of Cell Biology**, v.78, n.2, p.143-150, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. **Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas de Tumor Cerebral no Adulto** [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 222 p. ISBN 978-85-334-2845-4.
- Chuang, H. *et al.* FAK in Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 11, no. 11, p. 1823, 2022.
- COLOPI, A.; FUDA, S.; SANTI, S.; ONORATO, A.; CESARINI, V.; SALVATI, M. Impact of age and gender on glioblastoma onset, progression, and management. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 211, p. 111801, 2023.
- COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS – CONITEC. **Temozolomida para o tratamento adjuvante de pacientes portadores de gliomas de alto grau** [recurso eletrônico]. Brasília: CONITEC, set. 2014.
- COSTA, J.B. **Avaliação da Inibição da FAK e o Efeito na interação entre FAK e α B-cristalina em Células de Glioblastoma**. 2025. Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Governador Valadares - MG, 2025.
- DAVIS, M.E. Glioblastoma: Visão geral da doença e do tratamento. **Clinical journal of oncology nursing**, v. 20, n. 5, p. S2-8, 2016.
- DAWSON, J.C. *et al.* Targeting FAK in anticancer combination therapies. **Nature reviews. Cancer**, v. 21, n. 5, p. 313–324, 2021.
- ERASIMUS, H. *et al.* DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. **Reviews in Mutation Research**, v. 769, p. 19-35, 2016.
- FOLLY, M.L.D.C. *et al.* Interaction between FAK/ α B-crystalline is important for viability of the glioblastoma cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.60, p.23380, 2024.
- FRESNAIS, M. *et al.* Approaching sites of action of temozolomide for pharmacological and clinical studies in glioblastoma. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, p. 1, 2021.
- GILARD, V. *et al.* Diagnosis and management of glioblastoma: a comprehensive perspective. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 4, 2021.

GOPLEN, D. *et al.* α B-Crystallin Is Elevated in Highly Infiltrative Apoptosis-Resistant Glioblastoma Cells. **The American Journal of Pathology**, v.177, n.4, p.1618-1628, 2010.

GOUSIAS, K.; THEOCHAROUS, T.; SIMON, M. Mechanisms of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma. **Biomedicines**, v.10, n.3, p.564, 2022.

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

HAYASHI, J.; CARVER, J.A. The multifaceted nature of α B-crystallin. **Cell stress & chaperones**, v. 25, n. 4, p. 639–654, 2020.

HE, Y. *et al.* Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 425, 2021.

HU, C *et al.* Antitumor effect of focal adhesion kinase inhibitor PF562271 against human osteosarcoma in vitro and in vivo. **Cancer science**, v. 108, n. 7, p. 1347–1356, 2017.

Hu, H.-H. *et al.* Roles and inhibitors of FAK in cancer: current advances and future directions. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 15, 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2026.

JEZIERZAŃSKI, M. *et al.* Temozolomide (TMZ) in the Treatment of Glioblastoma Multiforme - A Literature Review and Clinical Outcomes. **Current Oncology**, v. 31, n. 7, p. 3994-4002, 2024.

KANDERI, T; MUNAKOMI, S; GUPTA, V. Glioblastoma Multiforme. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Última atualização em 6 maio 2024.

KATOH, K. Signal transduction mechanisms of focal adhesions: Src and FAK-mediated cell response. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 29, n. 11, p. 392, 2024.

KHABIBOV, M. *et al.* Signaling pathway sand therapeutic approaches in glioblastoma Multiforme (Review). **International Journal of Oncology**, v.60, n.6, p.69 ,2022.

KOYA, A.I.; IBRAHIM, S. A. *Carcinogenesis*. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Última atualização em 2 out. 2024.

LAN, Z.; LI, X.; ZHANG, X. Glioblastoma: An Update in Pathology, Molecular Mechanisms and Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 5, p. 3040, 2024.

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

Li, J. *et al.* Kinase Inhibitors and Kinase-Targeted Cancer Therapies: Recent Advances and

Future Perspectives. “*International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 10, 2024.

Li, J.; FENG, L.; LU, Y. Glioblastoma multiforme: diagnosis, treatment, and invasion. **Journal of Biomedical Research**, v. 37, n. 1, p. 47-58, 2022.

Li, Q. *et al.* HspB5 correlates with poor prognosis in colorectal cancer and prompts epithelial-mesenchymal transition through ERK signaling. **PLoS one**, v. 12, n. 8, p. e0182588, 2017.

Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro Oncology**, vol. 23, n.8, p.1231-1251, 2021.

LUCENA, R. C. de *et al.* Correlação clínico-topográfica em glioblastomas multiformes nas síndromes motoras: significados fisiopatológicos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 2, p. 441-444, 2006.

MALLICK, S. *et al.* Recurrence patterns in glioblastoma multiforme. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 33, p. 99-104, 2016.

MOYANO, J.V. *et al.* α B-Crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome In breast cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.1, p.261-270, 2006.

MURPHY, J. M. *et al.* Targeting focal adhesion kinase in cancer cells and the tumor microenvironment. **Experimental & molecular medicine**, v. 52, n. 6, p. 877–886, 2020.

NAKADA, M. *et al.* Aberrant Signaling Pathways in Glioma. **Cancers**, v.3, n.3, p.3242-3278, 2011.

NATARAJAN, M.; HECKER, T.P.; GLADSON, C.L. FAK Signaling in Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Tumors: **The Cancer Journal**, v.9, n.2, p.126-133, 2003.

NUÑEZ, R.E. *et al.* Microglial Cytokines Induce Invasiveness and Proliferation of Human Glioblastoma through Pyk2 and FAK Activation. **Cancers**, v.13, n.24, p.6160, 2021.

ORTEGA, A. *et al.* The YAP/TAZ signaling pathway in the tumor microenvironment and carcinogenesis: Current knowledge and therapeutic promises. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 1, p. 430, 2021.

Ortiz, R. *et al.* Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 4, p. 513-537, 2021.

Ortiz-Rivera, J. *et al.* Pyk2/FAK signaling is up-regulated in recurrent glioblastoma tumors in a C57BL/6/GL261 glioma implantation model. **Int. J. Mol. Sci.** v. 24, n.17, p. 13467, 2023.

ORTIZ-RIVERA, J. *et al.* The PYK2 inhibitor PF-562.271 enhances the effect of temozolomide on tumor growth in a C57Bl/6-Gl261 mouse glioma model. **Journal of Neuro-Oncology**, v.161, n.3, p.593-604, 2023.

PAN, *et al.* FAK inhibitor PF-562271 inhibits the migration and proliferation of high-grade

serous ovarian cancer cells through FAK and FAK mediated cell cycle arrest. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, v. 40, n. 8, p. 215, 2023.

PEREIRA, M.B.M. *et al.* α B-crystallin interacts with and prevents stress-activated proteolysis of focal adhesion kinase by calpain in cardiomyocytes. **Nature Communications**, v.5, n.1, p. 5159, 2014.

POMELLA, S. *et al.* New Insights on the Nuclear Functions and Targeting of FAK in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n.4, p.1998, 2022.

POUYAN, A. *et al.* Glioblastoma multiforme: perspectivas sobre a patogênese, principais vias de sinalização e estratégias terapêuticas. **Molecular cancer**, v. 24, n. 1, p. 58, 2025.

REN, K *et al.* Focal adhesion kinase overexpression and its impact on human osteosarcoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 31, p. 31085–31103, 2015.

ROBERTS, W.G. *et al.* Antitumor Activity and Pharmacology of a Selective Focal Adhesion Kinase Inhibitor, PF-562,271. **Cancer Research**, v.68, n.6, p.1935-1944, 2008.

ROLÓN-REYES, K. *et al.* Microglia activate migration of glioma cells through a Pyk2 intracellular pathway. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0131059, 2015.

SABOURI, M. *et al.* Survival rate of patient with glioblastoma: a population-based study. **Egyptian Journal of Neurosurgery**, v. 39, art. 42, 2024.

SANTOS, A.L. GLIOMAS, TUMORES MALIGNOS QUE SURGEM NO SISTEMA NERVOSO. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação, [S. l.]**, v. 7, n. 2, p. 12, 2021.

SHERGALIS, A. *et al.* Current challenges and opportunities in treating glioblastoma. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 3, p. 412–445, 2018.

SHIAU, J.P. *et al.* FAK regulates VEGFR2 expression and promotes angiogenesis in triple-negative breast cancer. **Biomedicines**, v. 9, n. 12, p. 1789, 2021.

SINGH, N. *et al.* Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. **Cancer drug resistance**, v. 4, p. 17–43, 2021.

SLACK-DAVIS, J.K. *et al.* Differential requirement for focal adhesion kinase signaling in cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.8, n.8, p.2470-2477, 2009.

SOUZA, A.P.D. **O papel da proteína HspBP1 em tumores e a resposta imune específica a antígenos não tumorais**. 2009. 133 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 2009.

Spallarossa, A. *et al.* The Development of FAK Inhibitors: A Five-Year Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, art. 6381, 2022.

STOKES, J.B. *et al.* Inhibition of focal adhesion kinase by PF-562,271 inhibits the growth

and metastasis of pancreatic cancer concomitant with altering the tumor microenvironment. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 11, p. 2135–2145, 2011.

TAMIMI, A.F.; JUWEID, M. Epidemiology and outcome of glioblastoma. In: **Glioblastoma**. [S.l.]: Codon Publications, 2017. p. 143–153.

N, X. *et al.* Focal adhesion kinase: from biological functions to therapeutic strategies. **Experimental hematology & oncology**, v. 12, n. 1, p. 83, 2023.

ANG, K.J. *et al.* Focal adhesion kinase regulates the DNA damage response and its inhibition radiosensitizes mutant KRAS lung cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 22, n. 23, p. 5851–5863, 2016.

TORP, S.H.; SOLHEIM, O.; SKJULSVIK, A.J. The WHO 2021 classification of central nervous system tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know – a minireview. **Acta Neurochirurgica (Viena)**, v. 164, n. 9, p. 2453–2464, 2022.

TOUAT, M. *et al.* Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. **Annals of Oncology**, v.28, n.7, p.1457-1472, 2017.

VALENTE, A.C.M; PEREIRA, M.B.M; RIBEIRO, R.T. Avaliação do papel da proteína FAK na viabilidade e apoptose de linhagem celular JAK2V617F positiva, modelo para neoplasias mieloproliferativas crônicas. **Revista de Ciência, Tecnologia e Sociedade**, v. 5, n. 1, 2023.

VAN NIMWEGEN, M.J.; VAN DE WATER, B. Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.73, n.5, p.597-609, 2007.

WELLER, M. *et al.* Glioma. **Nature Reviews Disease Primers**, v.1, n.1, p.15017, 2015.

WIEMER, A.J. *et al.* The focal adhesion kinase inhibitor PF-562.271 impairs primary CD4+ T cell activation. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 770–781, 2013.

WISNIEWSKI, T.; GOLDMAN, J.E. α B-Crystallin is Associated with Intermediate Filaments In Astrocytoma Cells. **Neurochemical Research**, v.23, n.3, p.385-392, 1998.

WU, W. *et al.* Glioblastoma multiforme (GBM): A novel view of current therapies and Mechanisms of resistance. **Pharmacological Research**, v.171, p.105780, 2021.

YALAMARTY, S.S.K *et al.* Mechanisms of resistance and current treatment options for glioblastoma multiforme (GBM). **Cancers**, v. 15, n. 7, p. 2116, 2023.

ZHANG, Qi *et al.* Focal adhesion kinase (FAK) is associated with poor prognosis in urinary bladder carcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 11, n. 2, p. 831–838, 2018.

ZOUBEIDI, A.; GLEAVE, M. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 10, p. 1646–1656, 2012.