



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Nicole Sartori

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-GLIOMA DO MONEPANTEL

Florianópolis

2024

Nicole Sartori

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-GLIOMA DO MONEPANTEL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Sartori, Nicole
Avaliação da atividade anti-glioma do Monepantel /
Nicole Sartori ; orientador, Rodrigo Bainy Leal, 2024.
70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Monepantel. 3. Glioblastoma. 4.
Autofagia. 5. Transição epitélio-mesenquimal. I. Leal,
Rodrigo Bainy. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Nicole Sartori

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-GLIOMA DO MONEPANTEL

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 22 de agosto de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lucia Severo Rodrigues
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Carla Inês Tasca
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal
Orientador

Florianópolis, 2024

AGRADECIMENTOS

Desde o momento em que entrei na faculdade, sempre alimentei o sonho de seguir uma carreira acadêmica, com um foco particular em pesquisa. A paixão por descobrir novas informações e contribuir para o avanço do conhecimento nunca deixou de me motivar. Hoje, quero agradecer a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desse caminho que estou trilhando.

Ao meu orientador, Professor Dr. Rodrigo Bainy Leal pelos ensinamentos e conselhos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu aprendizado dentro da academia e do mundo científico.

Aos amigos que conheci durante o período de mestrado, pelas risadas, ensinamentos, ajudas em momentos de desespero e pelos chás depois do almoço. Um agradecimento especial a Valéria, Carolina, Luísa, Gabrielli, Laura Magnabosco, Laura Borba, João e Rodrigo, vocês tornaram essa jornada mais prazerosa e divertida.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica e de Biologia Celular e desenvolvimento pelas aulas ministradas, reuniões e conselhos que contribuíram para o desenvolvimento dessa defesa.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica pela oportunidade. Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) onde realizei a maioria das análises dos resultados e aprendi a utilizar diferentes equipamentos.

Às minhas amigas, Thaís e Tayná, que estão sempre por perto, seja para confortar em um dia triste ou para compartilhar as alegrias, vocês são fonte constante de força e alegria na minha vida.

A todos os meus familiares (minhas dindas, Márcia, que foi a primeira a me apoiar na escolha de curso, e Simone, dindos, tios, primos) que sempre me recebem com sorriso e torcem pela minha felicidade. Em especial, a minha avó, Anilse e meu avô, Adão que sempre que estão presentes me esperam para jogar canastra e que todos os dias me perguntam como vai o mestrado.

Às minhas irmãs e à minha prima, que mesmo à distância, estão sempre presentes de coração e pensamento.

Ao meu namorado, Jefferson, pela sua paciência e compreensão, por cada palavra de encorajamento e cada sorriso que você me oferece, por estar presente nos momentos mais importantes, celebrando comigo e oferecendo suporte.

Gostaria de dedicar um agradecimento especial aos meus pais, Graciane e Homero. Expresso minha profunda gratidão pelo amor incondicional e pelo apoio constante que me ofereceram em cada passo da minha jornada. Obrigada por celebrarem comigo cada conquista, seja grande ou pequena, com um entusiasmo que ilumina minha trajetória. Vocês são, sem dúvida, o meu maior exemplo e fonte de inspiração, e sou eternamente grata por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim.

RESUMO

O Glioblastoma é um tumor cerebral maligno com alta letalidade, cujo tratamento padrão inclui ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolamida. Apesar de serem amplamente utilizados, esses tratamentos frequentemente apresentam resultados insatisfatórios em termos de eficácia e sobrevida a longo prazo. Assim, se torna fundamental desenvolver alternativas para inibir a progressão do glioblastoma. A autofagia é um processo necessário para a homeostase tecidual e em tumores pode representar uma forma de sobrevivência celular. Porém, quando induzida em excesso, a autofagia pode ocasionar a morte celular. Portanto, moléculas capazes de induzir a autofagia podem ser uma estratégia para a supressão tumoral, especialmente em células resistentes à indução de apoptose. Monepantel é um vermífugo desenvolvido pela Novartis® que mostrou alta atividade antitumoral em câncer de ovário, através da indução de autofagia. Dentro deste contexto, nosso estudo tem como objetivo caracterizar uma atividade antiglioma *in vitro* do Monepantel, avaliando a capacidade de indução de morte celular, processo de autofagia, migração celular e vias de sinalização associadas a estes processos (MAPKs, Akt/mTORC1). Para isso, culturas de linhagens tumorais de glioma de roedores (C6) e de humanos (U87MG) foram incubadas frente a diversas concentrações de Monepantel (1- 50 μ M) e por períodos variados (6-48h). Diversos parâmetros foram avaliados, incluindo: viabilidade celular, através do método do MTT; autofagia, através da avaliação de LC3II por western blot e microscopia com marcação por laranja de acridina; migração celular, através do método de “Scratch”; proteínas de sinalização celular através de western blot. Os principais resultados mostraram que o Monepantel promoveu diminuição na viabilidade, migração celular e proliferação nas concentrações mais elevadas, bem como promoveu autofagia, avaliada pela formação das organelas vesiculares ácidas e aumento dos níveis de LC3-II. Na avaliação das vias de sinalização AKT/mTORC1/p70, ERK1/2 e p38^{MAPK}, os resultados mostraram efeito estatisticamente significativo na diminuição da fosforilação de ERK2. Em conjunto os dados indicam que Monepantel apresentou atividade antitumoral sobre as células de glioma C6 e sugerem a necessidade de aprofundar a avaliação das vias de sinalização, que podem estar envolvidas na modulação da autofagia, viabilidade e migração celular.

Palavras chaves: Glioblastoma; linhagens celulares tumorais; autofagia; Monepantel;

ABSTRACT

Glioblastoma is a malignant brain tumor with high lethality, for which standard treatment includes surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy with temozolomide. Despite their widespread use, these treatments often yield unsatisfactory results regarding efficacy and long-term survival. Therefore, it is crucial to develop alternatives to inhibit glioblastoma progression. Autophagy is a process necessary for tissue homeostasis and is associated with cellular survival mechanism in tumors. However, excessive autophagy can lead to cell death. Thus, molecules capable to induce autophagy could be a strategy for tumor suppression, especially in cells resistant to apoptosis induction. Monepantel, an anthelmintic developed by Novartis®, has shown significant antitumor activity in ovarian cancer through the induction of autophagy. In this context, our study aims to characterize the antiglioma activity of Monepantel in vitro by evaluating its effects on cell death induction, autophagy, cell migration and signaling pathways (MAPKs, Akt/mTORC1) associated with these processes. For this purpose, rodent (C6) and human (U87MG) glioma cell lines were incubated with various concentrations of Monepantel (1-50 μ M) for different time periods (6-48 hours). Parameters assessed included: cell viability using the MTT assay; autophagy through LC3-II evaluation by western blot and acridine orange staining microscopy; cell migration using the Scratch assay; and signaling proteins by western blot. The main results showed that Monepantel reduced cell viability, migration and proliferation at higher concentrations and induced autophagy, as evidenced by the formation of acidic vesicular organelles and increased LC3-II levels. We also evaluated AKT/mTORC1/p70, ERK1/2 and p38^{MAPK} signaling pathways, and the results demonstrated a statistically significant reduction in ERK2 phosphorylation. In summary, the data indicate that Monepantel exhibits antitumor activity against C6 glioma cells and suggest a need for further investigation of signaling pathways modulating autophagy, cell viability, migration and proliferation.

Key words: Glioblastoma; tumor cell lines; autophagy; monepantel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática da via de sinalização das MAPKs	5
Figura 2. Ilustração da via de sinalização da p38 ^{MAPK}	7
Figura 3. Esquema ilustrativo da ativação do receptor tirosina cinase e da via de sinalização de ERK	8
Figura 4. Esquema ilustrativo da via de sinalização da JNK.	10
Figura 5. Desenho esquemático da via de sinalização da PI3K/Akt	12
Figura 6. Esquema ilustrativo da mTOR. a) Complexo mTORC1 e mTORC2. b) Demonstração da ação do Monepantel inibindo o complexo mTORC1 e induzindo autofagia	14
Figura 7. Ilustração da ação anti-helmíntica do Monepantel	15
Figura 8. Desenho ilustrativo da metodologia para formação das tumoresferas	21
Figura 9. Desenho esquemático para representação do ensaio de Scratch.	22
Figura 10. Desenho esquemático da análise realizada por Western Blot.	24
Figura 11. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT. Células de glioma da linhagem C6 foram expostas ao Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50µM ou veículo (DMSO 0,1% em PBS) por 24h. Os experimentos (N=8) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão e representam porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%). ** p < 0,01 e **** p < 0,0001. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.	26
Figura 12. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT em tempos de 6, 12 e 48h. Células de linhagem C6 de glioma foram expostas ao Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50µM ou veículo (PBS + DMSO 0,1%) por tempos de 6, 12 e 48 h. A) Células tratadas por 6h (N=4). B) Células tratadas por 12h (N=2). C) Células tratadas por 48h (N=6). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão; a porcentagem foi realizada em relação ao controle (considerado como 100%). ** p < 0,01. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.	27
Figura 13. Aumento da marcação de organelas vesiculares ácidas (OVA) nas células C6 de glioma pelo tratamento com Monepantel. Células de linhagem C6 de glioma foram expostas ao Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50µM ou veículo (PBS + DMSO 0,125%) por 24 horas. Após o tratamento as células foram coradas com Laranja de Acridina e visualizadas	

através de microscopia de fluorescência. **A)** Representativo da coloração das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm . **B)** Quantificação da formação de OVAs nos grupos tratados comparado ao controle. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão e representam porcentagem em relação ao controle. * $p < 0,1$ e **** $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.28

Figura 14. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a proteína LC3II para avaliação da autofagia. **A)** Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteccção de LC3I/LC3II e β -actina. **B)** Quantificação de LC3II, expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). Os dados foram quantificados utilizando o programa ImageLab utilizando o valor relativo ao controle. Os dados foram comparados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; N=4.29

Figura 15. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a atividade da proteína Akt. **A)** Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteccção de p-Akt, Akt total e β -actina. **B)** Quantificação da fosforilação da Akt expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). Os dados foram quantificados utilizando o programa ImageLab utilizando o valor relativo ao controle. Os dados foram comparados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; N=4.30

Figura 16. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a fosforilação da proteína p70S6K. **A)** Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteccção de p-P70, p70 e de β -actina; **B)** Quantificação da fosforilação de p70 expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). Os dados foram quantificados utilizando o programa ImageLab utilizando o valor relativo ao controle. Os dados foram comparados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; N=3.31

Figura 17. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a atividade da proteína p38. Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteccção de p-P38, p38 e β -actina; **B)** Quantificação da fosforilação de p38 expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageLab, e os dados foram expressos em relação ao controle (considerado 100%). Os

dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; $N=3$32

Figura 18. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a atividade das proteínas ERK1/2. Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteccção de p-ERK1/2, ERK1/2 e β -actina; **B)** Quantificação da fosforilação de ERK1 expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%); **C)** Quantificação da fosforilação de ERK2 expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageLab, e os dados foram expressos em relação ao controle (considerado 100%). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; $N=3$33

Figura 19. Ensaio de Migração celular com células C6 tratadas com Monepantel. Células de glioma da linhagem C6, foram tratadas com Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50 μM ou veículo (PBS + DMSO 0,1%) por 48 horas. No momento que foi adicionado o tratamento, foi realizado o risco com auxílio de uma ponteira de pipeta P200. O acompanhamento do fechamento do risco foi realizado por microscopia nos tempos de 0, 24 e 48h. **A)** Imagem representativa, obtida por microscopia de luz, das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm . **B)** Quantificação da migração expressa em percentual do fechamento total. O fechamento da fenda foi analisado utilizando o programa Image J. * $p < 0,1$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. ($N=3$).34

Figura 20. Ensaio de formação de tumoresferas para avaliação da Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) em células U87-MG tratadas com Monepantel (25 e 50 μM) ou veículo (PBS + DMSO 0,1%) no período de 24 h. **A)** Imagem representativa, obtida por microscopia de luz, das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 200 μm . **B)** Quantificação da área de migração expressa em percentual de deslocamento celular. A área de migração foi analisada utilizando o programa Image J. **** $p < 0,0001$. ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.35

Figura 21. Esquema representativo da conclusão dos experimentos.40

Figura 22. Ensaio de viabilidade celular por redução MTT. Células C6 tratadas com CML nas doses de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h. $N=7$. ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.41

Figura 23. Ensaio de migração celular por Scratch para avaliação da atividade da lectina <i>Centrolobium microchaete</i> (CML). Células C6 tratadas por 24 e 48 h com concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg/mL de CML. N=3. ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey.....	42
Figura 24. Ensaio para avaliação de autofagia pela formação de OVAs. Células tratadas com CML em doses de 10, 30, 50 e 100 µg/mL por 24 h. N=3. Imagens realizadas com auxílio de microscopia de fluorescência.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos principais reagentes utilizados.....	17
Tabela 2. Massa molecular da proteína alvo, fabricante e diluição dos anticorpos utilizados para Western Blotting.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACL	ATP citrato liase
Akt/PKB	Proteína cinase B
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ASK1	cinase reguladora do sinal de apoptose 1
ATF2	Ativador do fator de transcrição 2
Bad	Proteína X associada a Bcl-2
Bag1	Regulador 1 de chaperona molecular da família BAG
BSA	Albumina de soro bovino
Deptor	Domínio DEP contendo proteína que interage com mTOR
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium-low glucose
DMSO	Dimetilsulfóxido de dimetileno
DUSP	Fosfatase de especificidade dupla
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular
FOXO	Forkhead box O
GBM	Glioblastoma Multiforme
GSK-3 β	Glicogênio sintase cinase 3 beta
HBSS	Solução balanceada de Hank
Hsc70	Chaperonas de choque térmico 70
Hsp40	Proteína de choque térmico 40
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
IL-1 β	Interleucina-1 beta
JNK	c-Jun N-terminal cinase
LA	Laranja de Acridina
LAMP-2A	Proteína 2A associada a membrana lisossomal
LAMP1/2	Proteínas associadas a membrana lisossomal
LC3	Proteína microtúbulo-associada 1A/1B-cadeia leve 3
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MAPKK	Proteína cinase cinase ativada por mitógenos
MAPKKK	Proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno
MKP-1	MAPK fosfatase 1
MLK3	Mixed-Lineage Kinase 3
MPL	Monepantel
mTOR	Alvo mecânico da Rapamicina
MTT	Tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazólio
p38 ^{MAPK}	Proteína cinase p38
p70S6K	Proteína cinase S6 ribossômica β -1
PBS	Tampão fosfato-salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
Raptor	Proteína reguladora associada a mTOR
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RTK	Receptor de tirosina cinase
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SER	Estresse do retículo endoplasmático
TAK1	Cinase 1 ativada por TGF- β
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
ULK1	Cinase 1 de Ativação de Autofagia Semelhante a Unc-51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Gliomas	1
1.1.1. Glioblastoma Multiforme	1
1.2. Transição Epitélio-mesenquimal	2
1.3. Autofagia	3
1.4. Sinalização celular	4
1.1.2. Proteínas cinases ativadas por mitógenos	4
1.1.3. Via da fosfatidilinositol-3 cinase/Akt (PI3K/Akt)	10
1.1.4. mTORC	12
1.5. Monepantel	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
4. METODOLOGIA	17
4.1. Cultura de células de glioma	18
4.2. Tratamento das células Monepantel	18
4.3. Determinação de viabilidade celular pelo método de MTT	19
4.4. Ensaio de Microscopia de Fluorescência com Laranja de Acridina (detecção de vesículas ácidas, autofágicas)	19
4.5. Formação de Tumoresferas	20
4.6. Ensaio de Migração “Scratch”	21
4.7. Western Blot (WB)	22
4.8. Análise estatística	25
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gliomas

1.1.1. Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é considerado o tumor cerebral maligno primário mais agressivo em adultos (Dahlmanns; Yakubov; Dahlmanns, 2021; Reifenberger et al., 2017). O tratamento padrão para gliomas é a ressecção cirúrgica do tumor, seguida pela radioterapia isolada ou em combinação com a quimioterapia, principalmente utilizando o quimioterápico temozolamida (TMZ) (Reifenberger et al., 2017; Yool; Ramesh, 2020). Entretanto, as células de GBM apresentam habilidade de auto renovação e características de células indiferenciadas, juntamente com habilidade de ativação de mecanismos de resistência à quimioterapia e radioterapia (Dahlmanns; Yakubov; Dahlmanns, 2021; Reifenberger et al., 2017; Yool; Ramesh, 2020).

Existem diversas alterações moleculares nas células tumorais que incluem mutações, deleções, amplificações gênicas e alterações em fatores de transcrição (Papavassiliou; Papavassiliou, 2022; You et al., 2021), bem como alterações do padrão de glicosilação da superfície celular. Nos gliomas, estas mudanças alteram a sinalização intracelular envolvida na regulação de processos de migração, invasão e proliferação celular (Fahie; Zachara, 2016; Furukawa et al., 2015; Gao et al., 2021; Mereiter et al., 2019; Veillon et al., 2018). Entre as diversas vias de sinalização alteradas nos gliomas podemos destacar a via PI3K/PTEN-Akt-mTORC1 e de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) incluindo p38^{MAPK}, JNK1/2/3 e ERK1/2 (Liu et al., 2018; Pucko; Ostrowski, 2021), para citar algumas. Essas alterações levam a desregulação de mecanismos de proliferação, morte celular, autofagia e podem também estar envolvidas na quimiorresistência adaptativa dos gliomas (Belyaeva et al., 2022; YANG et al., 2015).

Dentro deste contexto, apesar de todos os avanços nas últimas décadas na terapia antitumoral, os pacientes com GBM ainda apresentam uma taxa média de sobrevivência de 12-15 meses após o diagnóstico (Dahlmanns; Yakubov; Dahlmanns, 2021; Yool; Ramesh, 2020). Por essa razão há uma necessidade urgente para estabelecer novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos compostos antiglioma que possam inibir de forma eficiente as respostas de sobrevivência,

bem como atuar sobre a heterogeneidade celular característica dos gliomas (Bhutia et al., 2019; Dahlmanns; Yakubov; Dahlmanns, 2021; Graham-Gurysh et al., 2020; Mazalovska; Kouokam, 2020).

1.2. Transição Epitélio-mesenquimal

A Transição Epitélio-mesenquimal (TEM) é um processo de transição reversível no qual as células epiteliais reduzem suas propriedades e ganham características mesenquimais. Durante esse processo, as células epiteliais perdem as suas proteínas de adesão, como a E-caderina, possibilitando sua separação e adquirindo a capacidade de invasão e morfologia mesenquimal. Adicionalmente, o citoesqueleto celular é reorganizado, formando pseudópodes para o aumento da mobilidade. Esses eventos resultam na perda da polaridade apical-basal, facilitando assim a migração e metástase. Assim, a TEM está associada à diversas características das células tumorais malignas (Huang et al., 2022). Além dos aspectos mencionados, a TEM está associada à reprogramação metabólica, quimiorresistência, metástase e outras características do câncer, sendo observado em tumores com mau prognóstico e de alto grau (Dongre; Weinberg, 2019; Mittal, 2024).

As células mesenquimais, presentes em vários tecidos do corpo, apresentam quimioresistência devido a uma combinação de fatores que fortalecem sua sobrevivência em ambientes adversos, como a capacidade de ativar mecanismos de defesa celular altamente eficazes, dentre eles, a superexpressão do sistema de reparo de DNA e a capacidade de neutralizar toxinas e radicais livres. Essas células são capazes de adaptar seu metabolismo e vias de sinalização para enfrentar estresses externos e frequentemente expressam proteínas de defesa, como a glutathione S-transferase, que ajudam a mitigar os efeitos tóxicos de agentes quimioterápicos. A interação com a matriz extracelular também oferece proteção adicional contra danos diretos. Além disso, a capacidade de auto-renovação e resistência à apoptose permitem que essas células continuem a proliferar mesmo na presença de agentes adversos, o que pode ser tanto uma vantagem para terapias regenerativas quanto um desafio no contexto de tratamento do câncer, contribuindo para a recidiva da doença (Gupta et al., 2022; Xuan et al., 2021)

Um estudo recente indicou que os scores de TEM aumentam com a progressão maligna do glioma e com a diminuição da sobrevida dos pacientes, apontando o papel da TEM na

fisiopatologia dos gliomas, bem como marcador de prognóstico (Lai et al., 2020). Um outro aspecto relevante é que a Transição Epitélio-mesenquimal e a autofagia são processos biológicos associados à ocorrência e desenvolvimento do câncer, onde vias de sinalização relacionadas ao TEM podem desencadear ou suprimir a autofagia ao mesmo tempo que a autofagia também está envolvida na indução ou inibição da TEM (Chen et al., 2019).

1.3. Autofagia

A autofagia é reconhecida como um processo essencial para manter a fisiologia celular e pode ser dividida em três tipos principais, macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Sob condições basais, a autofagia está associada à sobrevivência celular e à saúde tecidual (Dikic; Elazar, 2018). No entanto, sob estresse ou em resposta a determinados sinais intra ou extracelulares, a autofagia pode ser estimulada de forma excessiva, levando à morte celular (Dikic; Elazar, 2018; Jiang et al., 2015; Wolin et al., 2021; Yang; Huang; Li, 2021). Os gliomas são reconhecidos por terem uma capacidade significativa de responder a estímulos estressores através da indução de autofagia, que pode estar associada à sobrevivência das células tumorais (Belyaeva et al., 2022; Hsieh et al., 2021). No entanto, esse mecanismo pode também ser explorado como mecanismo de morte celular, quando estimulado em alto grau, e como alternativa se a maquinaria apoptótica não estiver funcional (Belyaeva et al., 2022; Bhutia et al., 2019; Taylor; Das; Ray, 2018; Trejo-Solís et al., 2018; Wolin et al., 2021; Yao et al., 2021).

A macroautofagia inicia a partir da formação do fagóforo pela ativação de proteínas como AMPK que vão inibir a via da mTOR e do complexo ULK1 (Cinase 1 de Ativação de Autofagia Semelhante a Unc-51) que tem como função iniciar a formação do fagóforo. As proteínas do complexo PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase) classe III e a proteína LC3 (proteína microtúbulo-associada 1A/1B-cadeia leve 3, do inglês “microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) são importantes para a formação do autofagossomo, o fagóforo irá realizar a sua expansão e fechamento numa estrutura de duas membranas chamada de autofagossomo, nessa etapa, a LC3-I é ligada a fosfatidiletanolamina para formar LC3- fosfatidiletanolamina conjugada (LC3-II), a qual é recrutada para a membrana do autofagossomo, sendo utilizada como um marcador importante na formação do autofagossomo. Depois de formado, o autofagossomo irá se fundir com o lisossomo

onde o material capturado é misturado com as enzimas lisossomais para sua degradação e reciclagem (Glick; Barth; Macleod, 2010; Parzych; Klionsky, 2014).

A microautofagia é um processo utilizado para captura de materiais pequenos e solúveis que estão presentes no citoplasma e é caracterizada pela invaginação da membrana do lisossomo que irá envolver diretamente o material citoplasmático a ser degradado sendo mediado por diversas proteínas e complexos envolvidos na dinâmica da membrana lisossomal, dentre eles, os mais importantes são os Hsc70 (chaperonas de choque térmico 70) e Bag1 (Regulador 1 de chaperona molecular da família BAG) que vão ter como função reconhecer e encapsular o material a ser degradado nesse processo e a LAMP1/2 (proteínas associadas a membrana lisossomal) que são proteínas importantes para a estrutura da membrana lisossomal (Wang; Klionsky; Shen, 2023; Wu; Adamopoulos, 2017).

Por fim, a autofagia mediada por chaperonas é um processo que se distingue da macroautofagia e da microautofagia pelo seu mecanismo de reconhecimento e transporte das proteínas para degradação, é utilizado para eliminação de proteínas mal dobradas ou danificadas que apresentam uma sequência específica de peptídeos. Esse processo é caracterizado pelo reconhecimento específico de proteínas que possuem uma sequência padrão de aminoácidos, chamada de sequência KFERQ, que irá sinalizar se essa proteína deve ser degradada por chaperonas. As principais chaperonas envolvidas nesse processo são as Hsc70 (chaperonas de choque térmico 70) e suas proteínas co-chaperonas, como a Hsp40 e a Hsp90, que vão ter como função reconhecer e se ligar as proteínas que apresentam a sequência KFERQ. Após essa ligação, o complexo chaperona-proteína é levado para a membrana lisossomal, sendo a ligação entre a chaperona e a proteína LAMP-2A (proteínas 2A associadas a membrana lisossomal) essencial para ocorrer a translocação da proteína para o interior do lisossomo. Em seguida, a proteína é levada para a cavidade lisossomal, onde será degradada por proteases e outras enzimas hidrolíticas (Bejarano; Cuervo, 2010; Kaushik; Cuervo, 2018).

1.4. Sinalização celular

1.1.2. Proteínas cinases ativadas por mitógenos

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) constituem uma família de proteínas cinases envolvidas na transdução de sinais celulares que controlam diversos processos fisiológicos, como crescimento celular, diferenciação, sobrevivência e resposta ao estresse, sendo assim, uma via essencial para a regulação do ciclo celular, sendo responsável por influenciar a resposta celular a estímulos externos, incluindo mitógenos (Zhang; Liu; Tu, 2002).

Essa via consiste em uma cascata de sinalização que envolve três cinases principais, a Proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno (MAPKKK), responsável por iniciar a cascata de sinalização, sendo ativada por uma variedade de sinais extracelulares; a proteína cinase cinase ativada por mitógenos (MAPKK), também conhecida como MEK; por último a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), quando fosforilada pela MAPKK, resulta na fosforilação de diversas proteínas-alvo no citoplasma e no núcleo (MORRISON, 2012).

As MAPKs apresentam três famílias bem caracterizadas, são elas a ERK (proteína cinase regulada por sinal extracelular), JNK (c-Jun N-terminal cinase) e a p38^{MAPK} (proteína cinase p38) (Cargnello; Roux, 2011; Guo et al., 2020; Morrison, 2012; Zhang; Liu; Tu, 2002).

Figura 1. Ilustração esquemática da via de sinalização das MAPKs

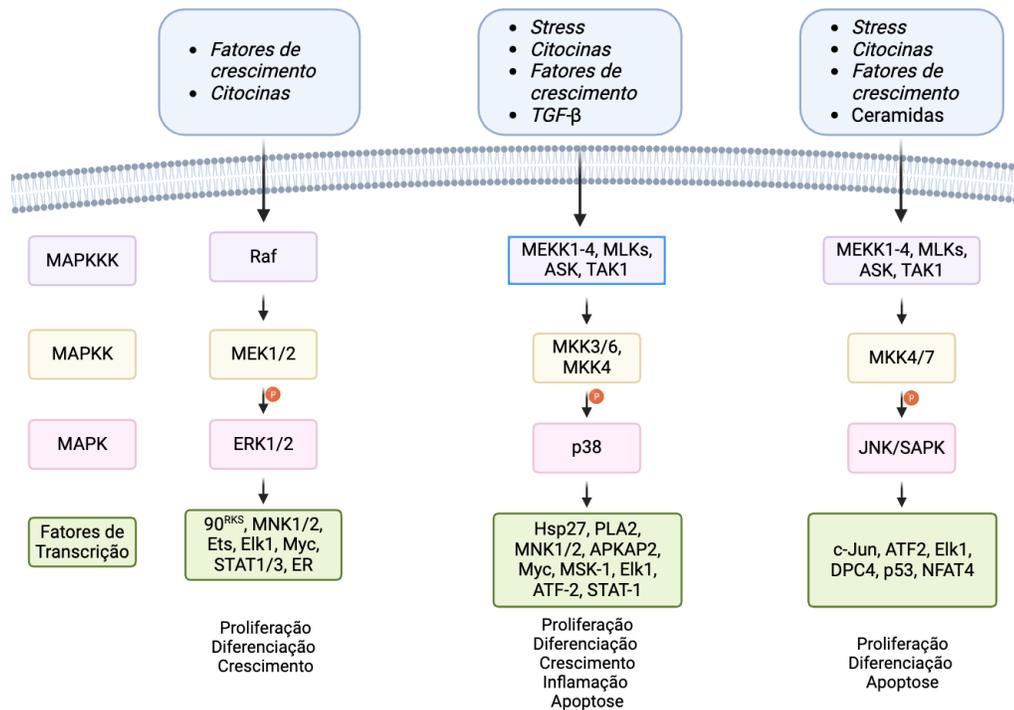


Figura adaptada de Zhang; Liu; Tu, 2002.

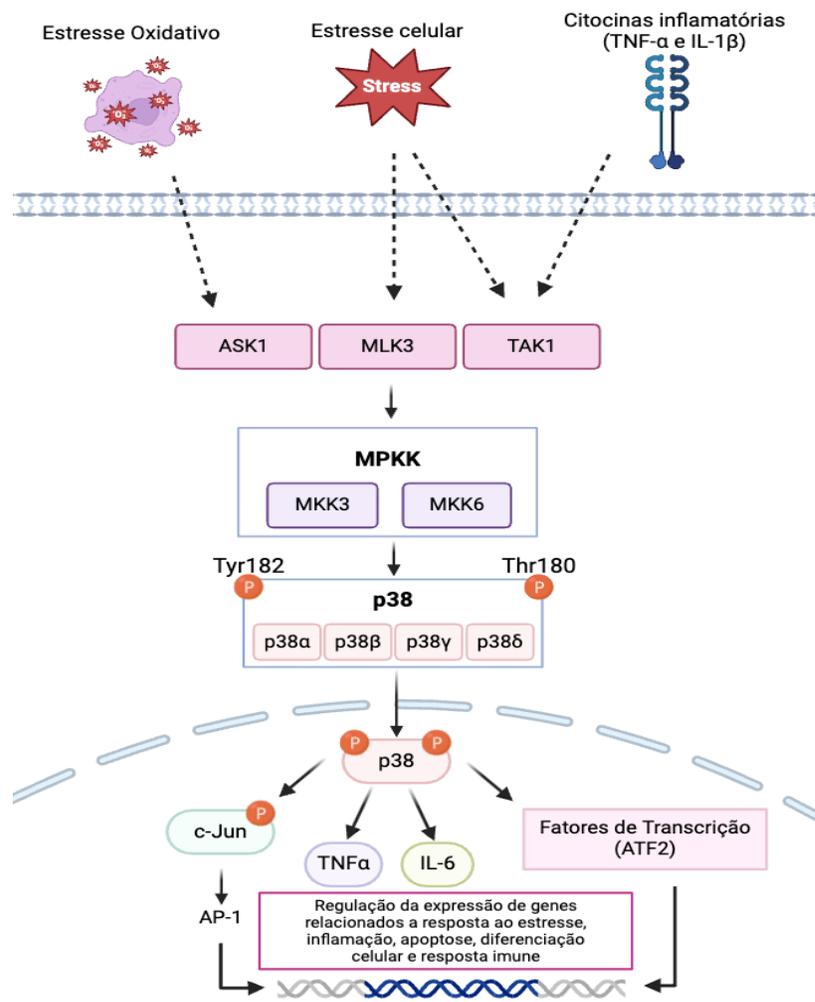
1.1.1.1. p38^{MAPK}

A via de sinalização da p38^{MAPK} está envolvida na resposta ao estresse, inflamação e regulação de processos celulares como apoptose, diferenciação celular e resposta imune. Existem quatro isoformas principais a p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12) e p38 δ (MAPK13), cada uma dessas apresenta funções e padrões de expressões distintos (Han; Wu; Silke, 2020)

A ativação dessa via pode ocorrer a partir de sinais extracelulares como em casos de estresse celular, citocinas inflamatórias, como no caso de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) e IL-1 β (Interleucina-1 beta), que são importantes mediadores na resposta inflamatória, e infecções.

O processo de ativação da p38 inicia-se com a ativação de uma MAP3K, que é a primeira cinase na cascata, dentre as principais associadas à p38, temos a ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) que é ativada quando há estresse oxidativo, MLK3 (Mixed-Lineage Kinase 3) que pode ser ativada por vários tipos de estresse e a TAK1 (TGF- β Activated Kinase 1), envolvida quando há ativação por sinais de citocinas inflamatórias e estresse celular. Essas MAP3K vão fosforilar e ativar as MAP2K específicas da via de sinalização da p38, são elas as MKK3 e MKK6, essas MAP2K irão ativar a p38^{MAPK} a partir de uma dupla fosforilação em resíduos específicos de tirosina (Y182) e treonina (T180). Depois de ativada a p38^{MAPK} poderá atuar no citosol ou ser translocada para o núcleo modulando a atividade de fatores de transcrição como o c-Jun e o ATF2 (Activating Transcription Factor 2) entre outras proteínas reguladoras. A p38^{MAPK} também pode promover o aumento na produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, contribuindo para a resposta inflamatória (Han; Wu; Silke, 2020; Kumar; Boehm; Lee, 2003; Zhang; Liu; Tu, 2002).

Figura 2. Ilustração da via de sinalização da $p38^{MAPK}$.



1.1.1.2. ERK

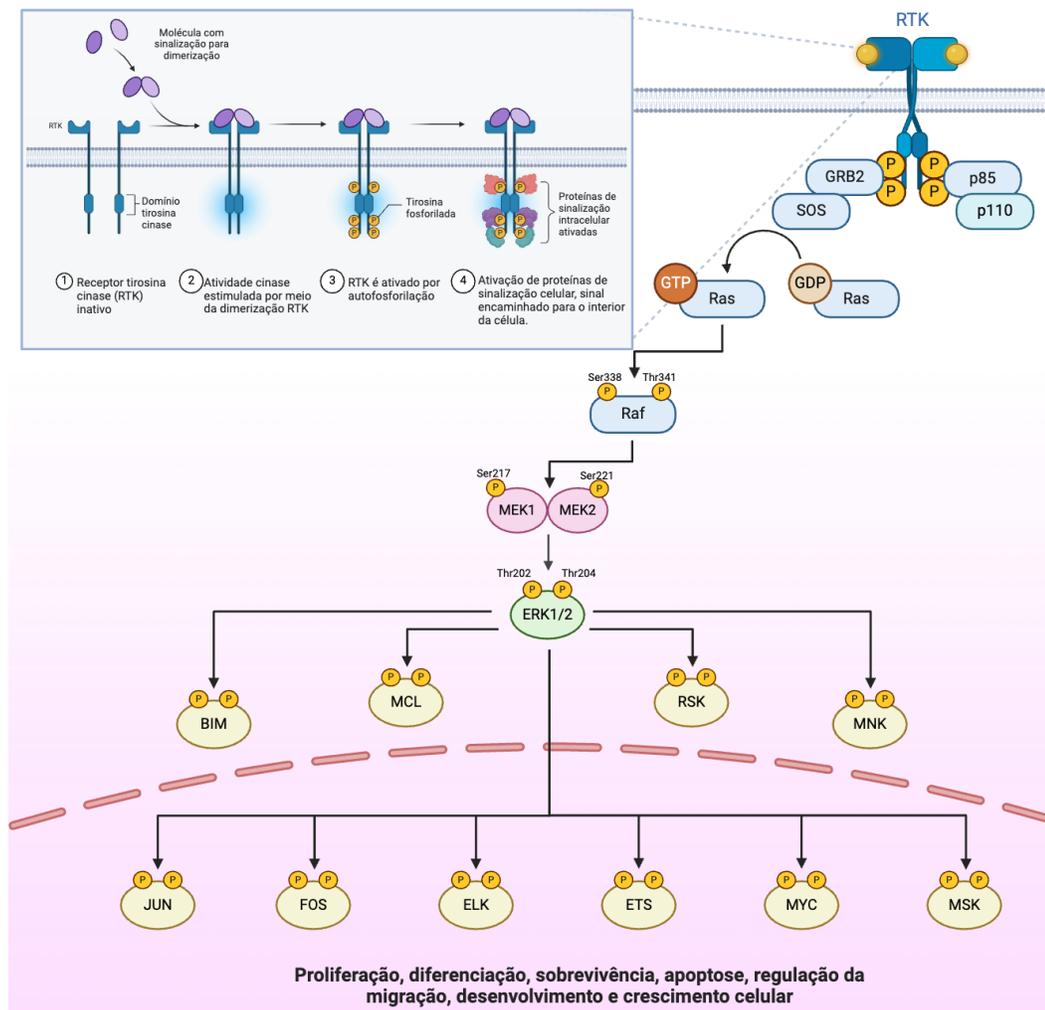
A ERK é uma proteína cinase fundamental na transdução de sinais extracelulares para regulação celular, sendo capaz de influenciar diversos processos biológicos como o crescimento, diferenciação, sobrevivência e adaptação ao ambiente. Essa proteína apresenta duas isoformas bem conhecidas, a ERK1 e a ERK2 (Guo et al., 2020).

O mecanismo de ativação da ERK inicia a partir da ativação de receptores tirosina cinase (RTKs) por ligantes específicos, levando a auto-fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor. Após a ativação, os RTKs irão recrutar e ativar a proteína Ras, uma GTPase que, quando ativada,

consegue se ligar ao GTP. Em seguida, a Ras-GTP irá ativar a Raf (MAP3K) que vai ter como objetivo fosforilar e ativar a MEK1/2 (MAP2K). A MEK1 e MEK2 irão fosforilar ERK1 e ERK2 em resíduos de treonina e tirosina, promovendo sua ativação. ERK1/2 têm papel importante devido a sua capacidade de regular tanto alvos citosólicos quanto fatores de transcrição nucleares (Lavoie; Gagnon; Therrien, 2020; Liu et al., 2018; Zhang; Liu; Tu, 2002).

A desregulação da ativação da via ERK está associada a vários tipos de câncer, a partir de mutações apresentada nas proteínas Ras ou Raf, podendo contribuir com o crescimento tumoral e a resistência celular à apoptose (Timofeev et al., 2024).

Figura 3. Esquema ilustrativo da ativação do receptor tirosina cinase e da via de sinalização de ERK.



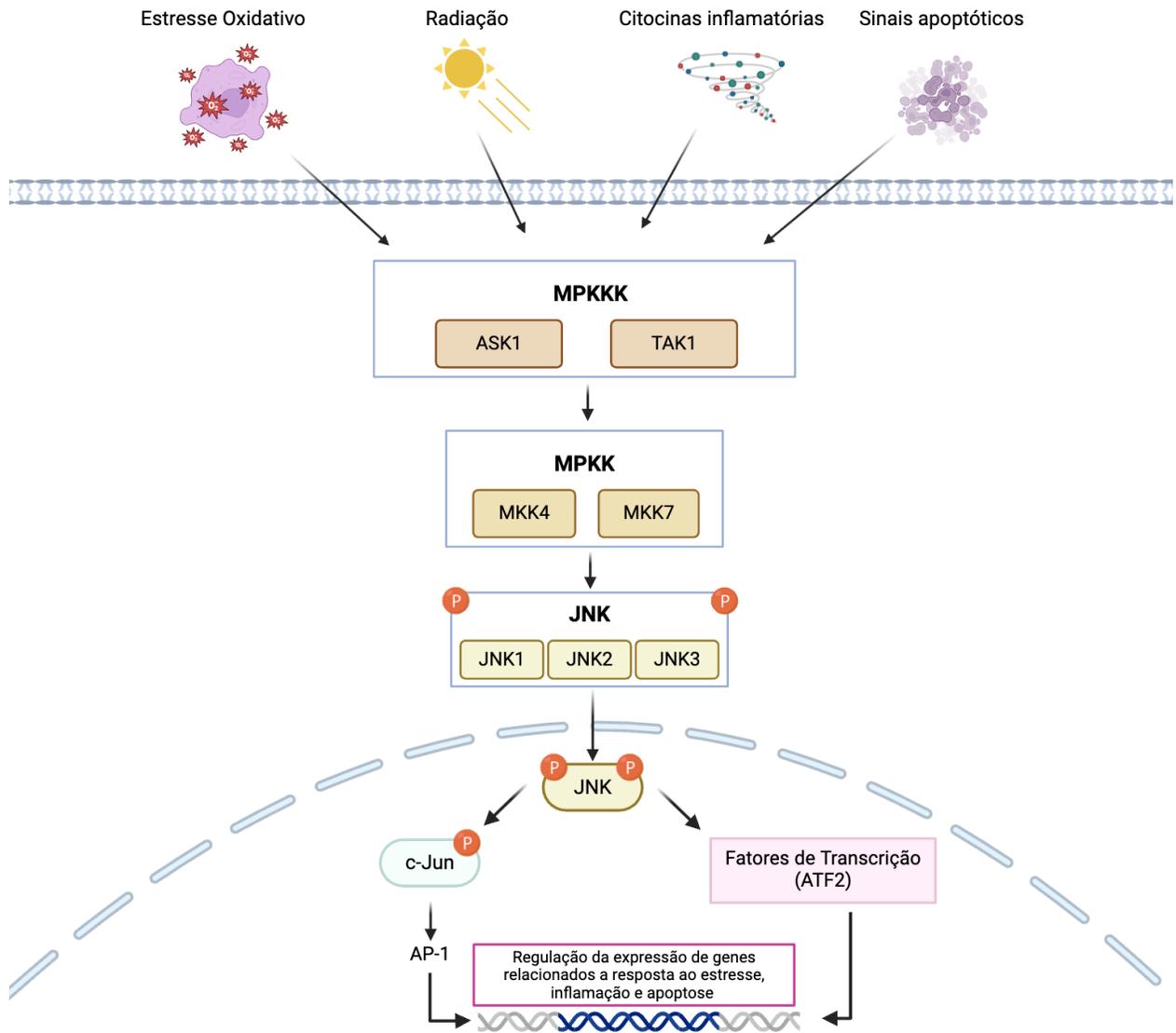
1.1.1.3. JNK

A via da JNK (c-Jun N-terminal Kinase) desempenham um papel importante na regulação da resposta ao estresse, inflamação, apoptose e diferenciação celular. Existem 11 isoformas de JNK produzidas por “splice” alternativo a partir de JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) e JNK3 (MAPK10), sendo que cada uma pode apresentar função específica, dependendo do tipo celular e do contexto fisiológico (Tournier, 2013).

A ativação dessa via ocorre de maneira semelhante a outras MAPK, a partir de estímulos como estresse oxidativo, radiação, citocinas inflamatórias e sinais apoptóticos. Esses estímulos irão ativar MAP3K específicas como a ASK1 (cinase reguladora do sinal de apoptose 1), MEKK1-4 e TAK1 (Cinase 1 ativada por TGF- β), que por sua vez irão fosforilar as MKK4 e MKK7, essas MKKs irão realizar uma dupla fosforilação sobre resíduos críticos de tirosina e treonina na JNK. Após ativada, a JNK poderá regular a atividade de fatores de transcrição, como o c-Jun (um componente importante do complexo AP-1) e ATF2, dessa forma modulando a expressão de genes relacionados à resposta ao estresse, inflamação e apoptose. Dependendo do contexto, a JNK pode promover a apoptose por meio da ativação de fatores de transcrição pró-apoptóticos ou pela modulação de proteínas anti-apoptóticas (Yan et al., 2024; Yarza et al., 2016).

A regulação da via JNK é feita por vários mecanismos que tem como função garantir uma resposta adequada e controlada, neste contexto a regulação de fosfatases como MKP-1 (MAPK fosfatase 1) e DUSP (fosfatase de especificidade dupla) que irão desfosforilar e inativar as JNKs, também se destacam como mecanismo importante do processo regulatório (Cui et al., 2007; Zeke et al., 2016).

Figura 4. Esquema ilustrativo da via de sinalização da JNK.



1.1.3. Via da fosfatidilinositol-3 cinase/Akt (PI3K/Akt)

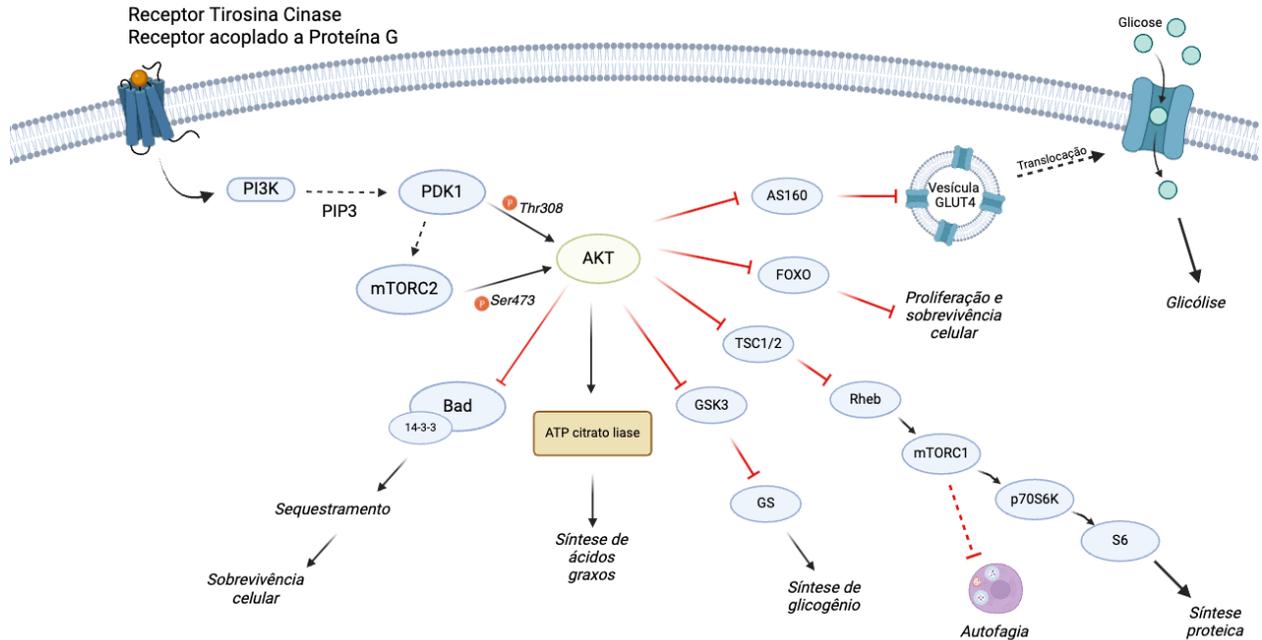
A via da PI3K/Akt é regulada a partir de fatores de crescimento e desempenha um papel importante no crescimento celular, sobrevivência, progressão do ciclo celular, diferenciação, transcrição, tradução e metabolismo da glicose (Barnett; Bilodeau; Lindsley, 2005).

A Akt, também conhecida como proteína cinase B (PKB), é uma serina/treonina cinase que apresenta domínios conservados em sua estrutura, incluindo um domínio N-terminal com

homologia de plestrina (PH), um domínio cinase central e um domínio regulatório C-terminal, que contém o motivo hidrofóbico. Existem três isoformas homólogas conhecidas como Akt1/PKB α , Akt2/PKB β e Akt3/PKB γ e a sua desregulação está associada a diferentes tipos de doenças (Nitulescu et al., 2018).

A iniciação dessa via de sinalização acontece a partir da ativação de receptores presentes na membrana celular como receptores de tirosina cinase ou por receptor acoplado a proteína G. Quando o receptor é ativado, ele consegue recrutar e ativar a fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) que, uma vez ativada, irá converter o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) na membrana celular em fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3). O PIP3 é uma molécula sinalizadora que serve como sítio de recrutamento de proteínas com domínios específicos para PIP3, conhecidos como domínio de homologia de plestrina (PH). Akt e outras enzimas desta via (ex. PDK1 e mTORC2) são recrutadas para a membrana celular através da interação do domínio PH com PIP3. Para ativação da Akt é necessário a fosforilação de dois sítios específicos, o sítio de fosforilação de ativação (T308), mediado pela proteína cinase 1 (PDK1) e o sítio de fosforilação de regulação (S473), na região C-terminal, mediado pela mTORC2. Quando ativada, a Akt tem a capacidade de fosforilar uma ampla variedade de alvos citoplasmáticos e nucleares, que inclui: GSK-3 β (Glicogênio sintase cinase 3 beta) que quando fosforilada pela Akt leva a inibição dessa proteína, promovendo a síntese do glicogênio e a sobrevivência celular; Bad (Bcl-2-antagonist of cell death) quando fosforilada pela Akt é sequestrada no citoplasma, inibindo a sua capacidade de interação com proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 e a Bcl-xL, promovendo a sobrevivência celular; mTORC1, enzima importante para regular o metabolismo celular, que quando ativada irá promover a síntese de proteínas, crescimento celular e a biogênese dos ribossomos; FOXO (Forkhead box O), um fator de transcrição envolvido na apoptose, ciclo celular e metabolismo, quando fosforilado pela Akt é deslocado para o citoplasma e inibido, reduzindo sua capacidade de promover a expressão de genes pró apoptóticos e de controle do ciclo celular; AS160 (RAB GAP TBC1D4) que quando fosforilada por Akt promove a translocação de Glut4 para a membrana celular, induzindo a captação de glicose pelas células e regulação dos níveis de glicose no sangue; a fosforilação da ATP citrato liase (ACL) pela Akt promove a conversão de citrato em acetil-CoA, influenciando a biossíntese de lipídios e o metabolismo energético (Glaviano et al., 2023; He et al., 2021; Liu et al., 2020; Manning; Toker, 2017).

Figura 5. Desenho esquemático da via de sinalização da PI3K/Akt



1.1.4. mTORC

A mTOR é uma serina/treonina cinase presente na família de proteínas cinases relacionadas à fosfatidilinositol 3-kinase e tem como função, a partir dos seus complexos mTORC1 e mTORC2 regular a sobrevivência, crescimento e metabolismo celular, síntese proteica e autofagia, sendo que sua desregulação está associada a diversas doenças humanas (Laplante; Sabatini, 2012; Marafie; Al-Mulla; Abubaker, 2024; Saxton; Sabatini, 2017; Watanabe; Wei; Huang, 2011).

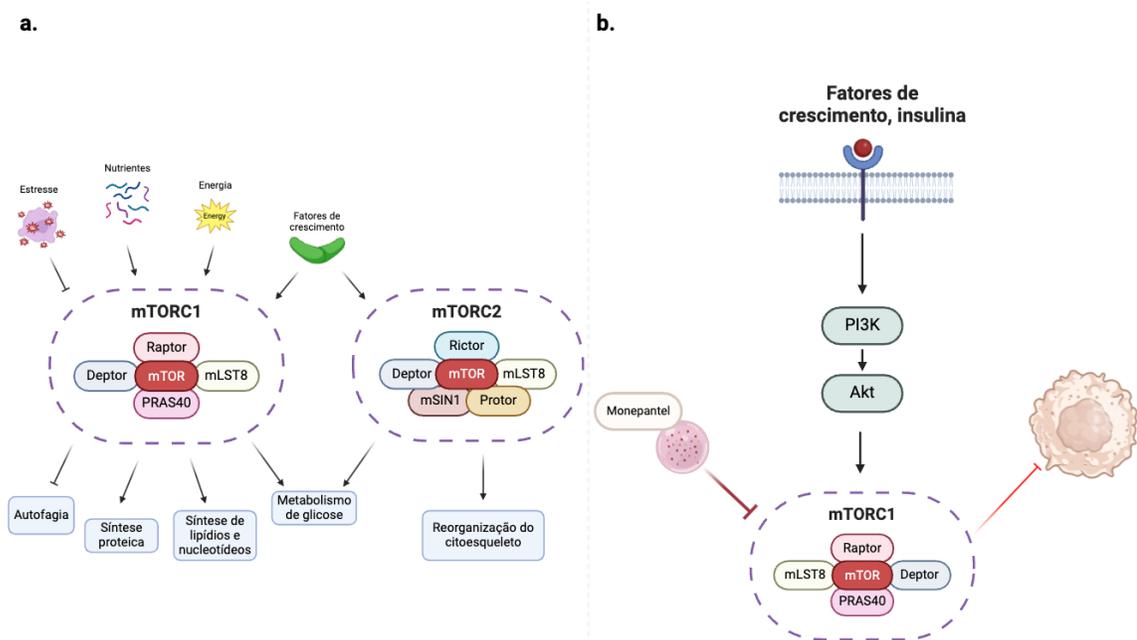
A mTORC1 possui 5 componentes no seu complexo, são eles: mTOR, que é a proteína cinase central do complexo; Raptor (proteína reguladora associada ao mTOR), um adaptador que irá ligar a mTOR ao seu substrato e regular a atividade da mTORC1; mLST8 (mammalian LST8), que auxilia na estabilidade e atividade da mTORC1; PRAS40, que inibe a atividade da mTORC1 na presença de estresse celular ou na baixa disponibilidade de nutrientes; Deptor (domínio DEP contendo proteína que interage com mTOR), um inibidor endógeno da mTOR que regula a atividade da mTORC1. A mTORC1 é ativada por nutrientes, como aminoácidos (principalmente leucina), glicose, bem como por fatores de crescimento como IGF-1 (via ativação da PI3K/Akt).

Notavelmente, mTORC1 pode ser inibida pela rapamicina e seus derivados (Liu; Sabatini, 2020; Panwar et al., 2023; Saxton; Sabatini, 2017).

A mTORC2 também possui 5 componentes no seu complexo, incluindo: mTOR como proteína cinase central do complexo; Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR), um adaptador específico para a mTORC2; mLST8 que assim como na mTORC1, irá auxiliar na estabilidade e atividade da mTORC2; Sin1, um adaptador crucial para formação e função da mTORC2; Protor, que irá participar na regulação e estabilidade da mTORC2. Esse complexo pode ser ativado por fatores de crescimento, podendo estar envolvido na regulação de processos como a organização do citoesqueleto e o metabolismo lipídico. mTORC2 é responsável pela fosforilação de diversas proteínas cinases da família AGC. No caso da Akt, a atividade de mTORC2 é fundamental para sua plena ativação (Liu; Sabatini, 2020; Panwar et al., 2023; Saxton; Sabatini, 2017)

Algumas moléculas proficientes para estimular a autofagia, incluindo os inibidores clássicos de mTORC1, como rapamicina ou seu análogo everolimus [42-O-(2-hydroxyethyl) rapamycin], têm sido avaliados em testes pré-clínicos e clínicos como potenciais drogas antitumorais inclusive em gliomas (Graham-Gurysh et al., 2020; Tian; Li; Zhang, 2019; Yang et al., 2015; Zureick et al., 2019). Além disso, recentemente foi demonstrado o potencial antitumoral do Monepantel a partir da inibição da sinalização de mTORC1 e indução da autofagia, em modelo de câncer de ovário (Ataie-Kachoie et al., 2018; Bahrami et al., 2014a, 2014b, 2021; Mislant et al., 2020). Apesar disso, a avaliação da ação do Monepantel em modelos de glioma ou mesmo outros tipos de câncer tem sido muito limitada (Harris et al., 2023)

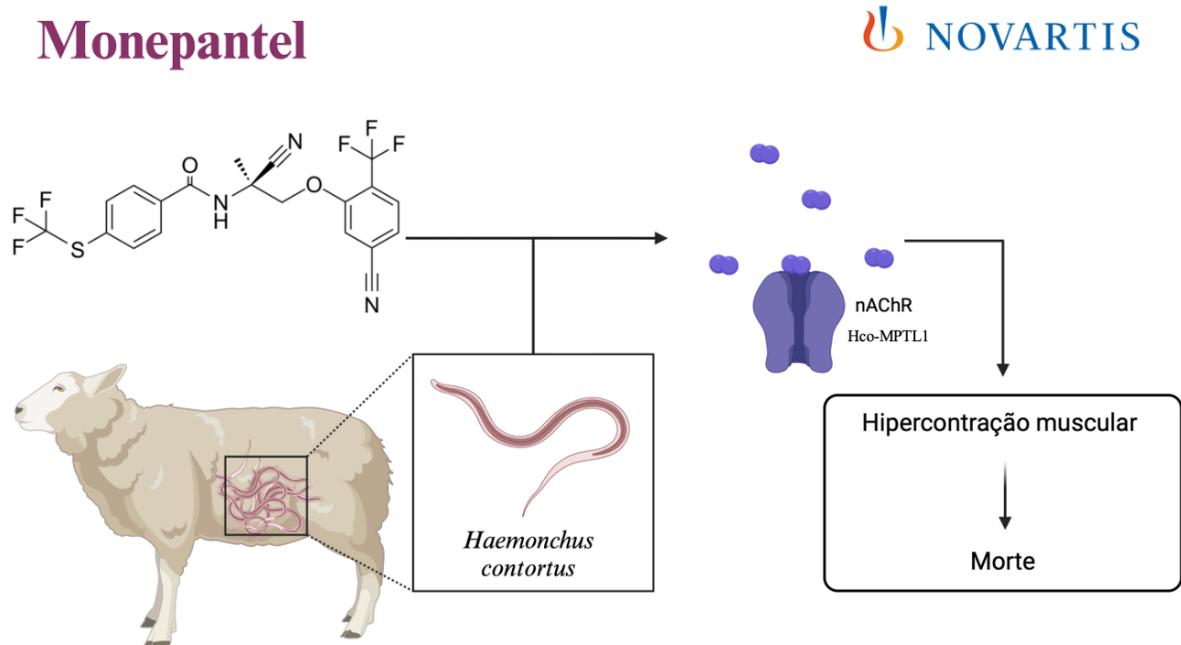
Figura 6. Esquema ilustrativo da mTOR. **a)** Complexo mTORC1 e mTORC2. **b)** Demonstração da ação do Monepantel inibindo o complexo mTORC1 e induzindo autofagia



1.5. Monepantel

O Monepantel, pertencente ao grupo dos derivados de amino-acetonitrila (AAD), sendo um fármaco desenvolvido pela Novartis® para atuar primariamente como anti-helmíntico. Em nematoides, o Monepantel parece atuar sobre receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), principalmente na subunidade Hco-MPTL1, causando uma ação de hipercontração dos músculos seguido de paralisia espástica e morte dos vermes (Lecová et al., 2014), conforme ilustrado na **Figura 7**. Estudos mais detalhados do mecanismo de ação do Monepantel sobre os vermes *H. contortus* e *C. elegans*, demonstraram uma ativação alostérica de receptores DEG-3/DES-2 e/ou ACR-23, pertencentes à família de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), especialmente quando aplicado junto a colina (Rufener et al., 2010) ou betaína (Peden et al., 2013).

Figura 7. Ilustração da ação anti-helmíntica do Monepantel



Após a administração, o Monepantel é absorvido e oxidado a um metabólito sulfonado em aproximadamente 4 horas, apresentando uma meia-vida de aproximadamente 5 dias, atingindo a concentração máxima no sangue após 1 dia (Agência Europeia de Medicamentos, 2009).

O trabalho original da ação de Monepantel sobre células de câncer de ovário, utilizando α -bungarotoxina (antagonista de nAChR $\alpha 1$, $\alpha 7$ e $\alpha 9$) sugeriu que a ação antitumoral era independente dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), sugerindo que nessas células o alvo de Monepantel pode diferir do indicado em nematóides. Nesse estudo, o Monepantel diminuiu a viabilidade celular e a formação de colônias, inibiu a proliferação e ainda realizou a parada do ciclo celular, com a diminuição de ciclinas D1 e A e aumento da ciclina E2 (Bahrami et al., 2014a). Foi demonstrado o potencial antitumoral do Monepantel a partir da inibição da sinalização de mTORC1 e indução da autofagia, em modelo de câncer de ovário (Ataie-Kachoie et al., 2018; Bahrami et al., 2014b, 2014a; Mislant et al., 2020). Apesar disso, a avaliação da ação do Monepantel em modelos de glioma ou mesmo outros tipos de câncer tem sido muito limitada (Harris et al., 2023).

Em modelo *in vivo* utilizando xenoinxertos de linhagem celular OVCAR-3 em camundongos nus, o Monepantel induziu a diminuição do crescimento tumoral com a redução

do volume e peso do tumor, inibição da sinalização de mTOR/P70S6K e 4EBP1, bem como diminuição dos níveis de ciclina D1, juntamente com uma regulação negativa de IGF-1R e c-MYC sem demonstrar efeitos colaterais (Bahrami et al., 2021).

Um estudo recente que avaliou a atividade do Monepantel em diversas linhagens tumorais (melanoma, pulmão, mama, cérebro, colorretal, próstata e ovário) indicou seu potencial anticâncer (Harris et al., 2023). Os principais resultados desse estudo indicaram indução de apoptose e indução de autofagia. No entanto, a interrupção do ciclo celular pareceu ser o principal efeito anticancerígeno. A análise transcriptômica de quatro linhagens celulares tratadas com monepantel revelou a regulação negativa de muitos genes envolvidos no ciclo celular e a regulação positiva de genes ligados às respostas ao estresse do retículo endoplasmático (SER) mediadas por ATF4, especialmente aqueles envolvidos no metabolismo de aminoácidos e na síntese de proteínas (Harris et al., 2023).

A empresa de biotecnologia PharmAust Limited está realizando estudo de ensaio clínico de fase II, sobre a farmacodinâmica do Monepantel para tratamento de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA). Os dados preliminares divulgados pela empresa demonstraram que o Monepantel diminuiu a progressão da doença, a partir da avaliação da alteração da ALSFRS-R, com redução da taxa de progressão de 58% nos pacientes que usaram a dosagem mais alta do fármaco, quando comparadas ao coorte controle externo (banco de dados PRO-ACT). Ainda, os dados preliminares sugerem que o Monepantel consegue atravessar a barreira hematoencefálica, com um aumento proporcional ao aumento da dosagem, a partir da detecção do seu metabólito ativo, Monepantel sulfona, no líquido cefalorraquidiano dos pacientes (PharmAust, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

Um aumento no número de pessoas acometidas por glioblastoma (GBM) está associado a diversos fatores como aumento populacional, aumento da longevidade e exposição a fatores de risco. O GBM é um tumor cerebral primário de alta letalidade, devido sua agressividade aliada à inexistência de tratamento eficiente e específico. O Monepantel é um fármaco que foi desenvolvido originalmente como vermífugo, porém apresentou capacidade de induzir morte de células tumorais de ovário, via indução de autofagia, além de demonstrar capacidade de diminuir a viabilidade em

diversas linhagens celulares de câncer e induzir a ativação do estresse de retículo (SER). Esses estudos em conjunto indicam uma atividade antitumoral do Monepantel em diferentes linhagens celulares, inclusive em gliomas, todavia, vários pontos permanecem sem caracterização.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar a atividade antiglioma *in vitro* de monepantel. Nesse sentido, foi avaliado principalmente a capacidade dos compostos induzirem morte celular, modularem processos de autofagia, apoptose e migração celular, bem como vias de sinalização subjacentes a estes processos (ex. Akt/mTOR, MAPKs), em linhagens de glioma (C6 e U87). Para isso foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Caracterizar a capacidade do Monepantel de alterar a viabilidade celular em células de glioma C6.
- 2) Caracterização da capacidade do monepantel de induzir autofagia.
- 3) Analisar a inibição de migração e adesão das células de glioma C6 e U87 utilizando curvas de tempo e de concentração para este fármaco.
- 4) Caracterizar a capacidade do monepantel modular a sinalização intracelular da via Akt/mTORC1/p70 e de MAPKs (ERK1/2, p38^{MAPK}).

4. METODOLOGIA

Para execução das diversas metodologias foram utilizados materiais de grau analítico, sendo os principais listados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos principais reagentes utilizados.

Reagentes	Sigla	[] de uso	Fabricante	Código
Acridine orange	LA	0,2 µg/ml	Sigma-Aldrich®	M9281
Bovine serum albumin	BSA	2%	INLAB	1870
BROMOPHENOL BLUE	-	40%	USB™	US12370

Dulbecco's modified eagle's medium-low glucose	DMEM	-	Sigma-Aldrich®	D5523
Fetal bovine serum	SFB	10%	Gibco™	00997
Monepantel	MPL	-	MedChem express	HY-14774
PONCEAU S	-	0,01 mg/mL	USB™	33819
Pluronic® f-127	-	2%	Sigma Aldrich®	P2443
Supersignal™ west fTEMo maximum sensitivity substrate	-	-	Thermo Scientific	34094
Tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazólio	MTT	0,5 mg/mL	Sigma Aldrich®	M2128
Trypsin-EDTA	-	0.05%	Gibco™	03729
β-mercaptoethanol	-	8%	VETEC®	V000590

4.1. Cultura de células de glioma

Foram utilizadas linhagens celulares C6 (ATCC/ CCL-107), glioma oriundo de rato (*Rattus norvegicus*) e linhagem U-87 MG (ATCC HTB-14), glioblastoma oriunda de seres humanos. As células foram mantidas em meio de cultivo DMEM, pH 7,4 (do inglês Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. Ao atingir confluência de 80% as células foram repicadas, utilizando tripsina para auxiliar no descolamento celular, seguidas de centrifugação e ressuspensão em meio celular para contagem. As células são utilizadas até a passagem de nº 15. Para a realização dos experimentos, a densidade celular é estabelecida através da contagem em câmara de Neubauer (Nascimento et al., 2018, 2019; Wolin et al., 2021).

4.2. Tratamento das células Monepantel

Para avaliar a ação do Monepantel foi realizado o tratamento do fármaco pelo período de 24 horas, o Monepantel foi ressuspensão em DMSO 100%, ficando com a concentração estoque de 40 mM e diluído para tratamento nas concentrações finais por poço de 1, 5, 12,5, 25 e 50 µM, utilizando PBS + DMSO 0,125% como veículo. Após os tratamentos foi realizada avaliação da morfologia (microscopia por contraste de fase), viabilidade (MTT), autofagia (laranja de acridina e/ou avaliação de LC3-II), migração celular ("Scratch"), avaliação da Transição Epitélio-

mesenquimal (tumoresferas), bem como avaliação dos níveis e fosforilação de enzimas de sinalização (AKT, p70S6K, p38^{MAPK}, ERK1/2).

4.3. Determinação de viabilidade celular pelo método de MTT

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o teste colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) que tem como objetivo avaliar a atividade metabólica (MOSMANN, 1983). Esse método consiste na redução do MTT em cristais de formazan que apresentam coloração roxa nas células metabolicamente viáveis, por meio das enzimas oxidoredutases dependentes de NAD(P)H que irão realizar essa redução. Para isso as células foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo 10.0000 células por poço em linhagem C6 e, sendo mantidas com 200 µL de meio DMEM suplementadas com 10% de SFB. As placas foram incubadas por 24 h em estufa a 37°C numa atmosfera umidificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, após esse período, o meio foi substituído por meio DMEM + BSA 0,2% seguido do tratamento com veículo (controle) ou monepantel, por tempos que variaram de 6 a 48 h (Nascimento et al., 2018, 2019; Wolin et al., 2021).

As células foram tratadas com Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50 µM e incubadas em estufa por 6, 12, 24 ou 48 h. Após o tratamento, foi removido 20 µL do meio e substituído por 20 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL em tampão HBSS). As placas foram incubadas por 1,5 h a 37 °C ao abrigo da luz. As placas foram incubadas por 1,5 h a 37 °C ao abrigo da luz. Em sequência, a solução de MTT foi retirada e adicionou-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, realizando a homogeneização com o auxílio de micropipeta para a dissolução dos cristais de formazan. As absorbâncias foram medidas no comprimento de onda de 540 nm utilizando espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 TECAN), equipamento disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia LAMEB/CCB/UFSC. Os valores de absorbância obtidos foram transformados em porcentagens de viabilidade celular, em relação a média dos controles celulares, considerados 100% viáveis.

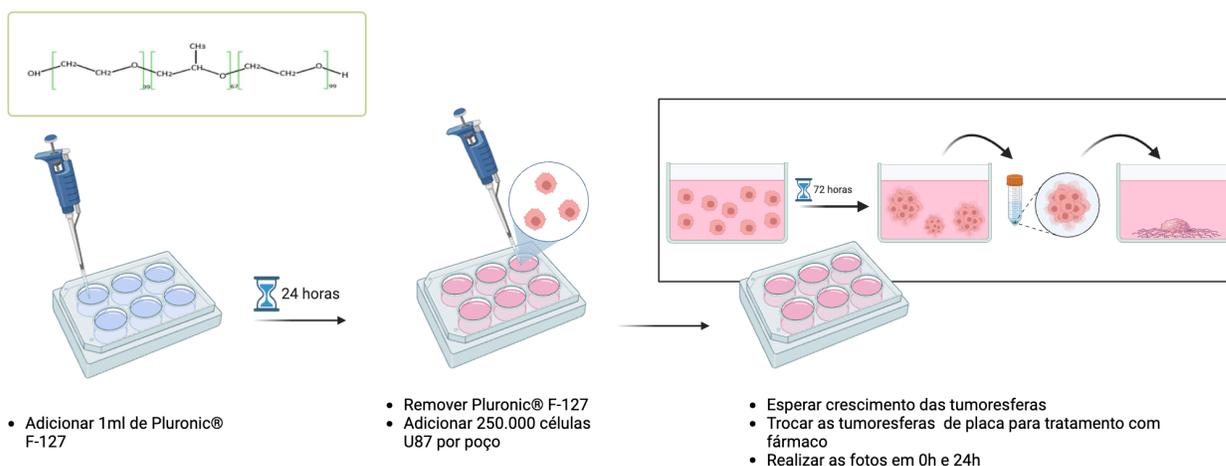
4.4. Ensaio de Microscopia de Fluorescência com Laranja de Acridina (detecção de vesículas ácidas, autofágicas)

O ensaio de laranja de acridina (LA) é utilizado para determinar a formação de organelas vesiculares ácidas (OVA), o que pode surgir como consequência do aumento do processo autofágico. Com o intuito de avaliar se os tratamentos podem modular este evento, as células foram submetidas à coloração com laranja de acridina seguindo o protocolo já descrito anteriormente (Nascimento et al., 2018, 2019; Wolin et al., 2021). As células da linhagem C6 foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de 50.000 células por poço com meio DMEM suplementado com 10% SFB pelo período de 24h, após o meio foi retirado e substituído com meio DMEM + 0,2% BSA. As células foram então tratadas com Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50 μ M por 24h. Após esse período, acrescentou-se 20 μ L de LA (10 μ g/ml; Sigma), concentração final de 0,2 μ g/mL (0,54 μ M); a placa foi incubada a 37 °C por 20min ao abrigo da luz. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência através do aparelho Nikon® Eclipse microscópio invertido T2000-U usando conjuntos de filtros, 470 nm excitação e 525 nm emissão para a análise da cromatina, e 350 nm excitação e 615 nm emissão para a análise da presença de vesículas ácidas.

4.5. Formação de Tumoresferas

Para avaliar a capacidade de diferenciação e adesão em resposta aos tratamentos, foi realizado um ensaio de formação de tumoresferas, com células da linhagem U87MG conforme demonstrado esquematicamente na **Figura 8**. Antes de semear as células, a placa de 6 poços foi tratada com 1 mL de Pluronic F-127 a 2% para inibir a adesão celular. Posteriormente, as células foram semeadas e incubadas por 72 h a 37 °C, seguida da visualização em microscópio para verificar a formação de esferas tumorais. As tumoresferas foram transferidas para placas de 24 poços e tratadas com veículo ou Monepantel. As esferas tumorais foram fotografadas nos tempos 0 e 24h com o auxílio do microscópio invertido NIKON® eclipse T2000-U. As imagens foram analisadas para medir a capacidade inibitória na migração/adesão das esferas tumorais ao substrato do poço. Para mensurar a área de migração das tumoresferas, foi utilizado o software ImageJ®, podendo assim, observar se houve alteração no padrão de migração após o tratamento.

Figura 8. Desenho ilustrativo da metodologia para formação das tumoresferas



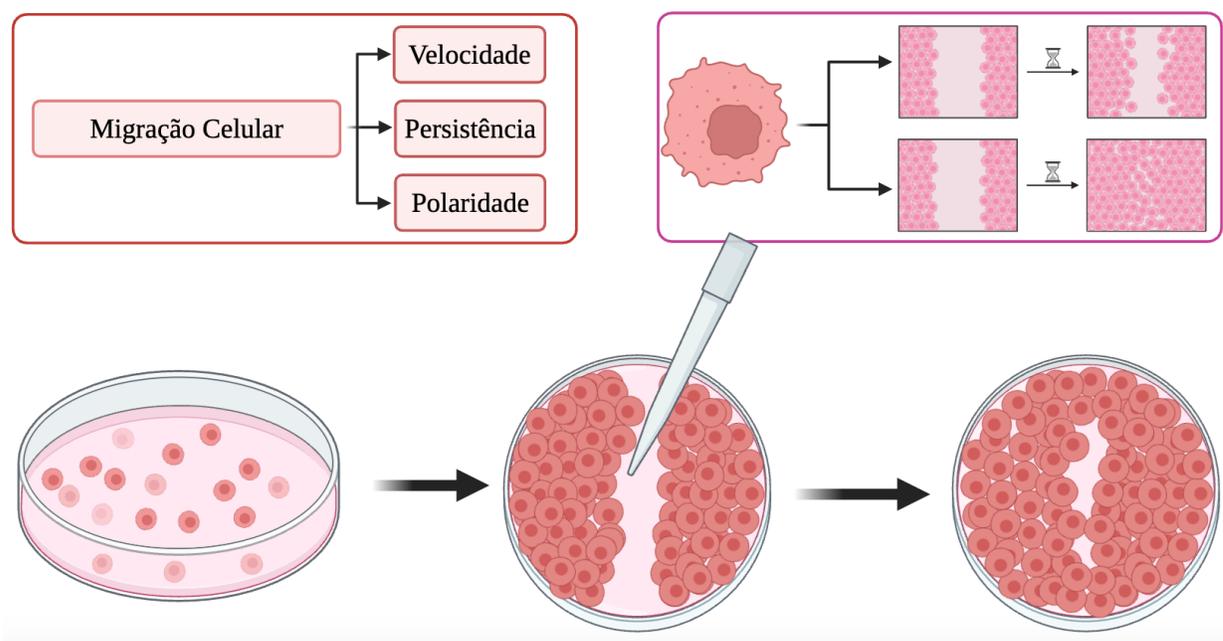
4.6. Ensaio de Migração “Scratch”

Para avaliar a capacidade de migração e de proliferação das linhagens após o tratamento, foi realizado um ensaio de migração, seguindo o protocolo adaptado de Liang et al. (LIANG; PARK; GUAN, 2007), conforme descrito anteriormente (Nascimento et al., 2018, 2019; Wolin et al., 2021).

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 500.000 células por poço, após 24 horas as células foram tratadas com as diferentes doses de Monepantel e realizado um risco com o auxílio de uma ponteira de pipeta P200 no meio da placa. Para análise, foram realizadas fotos imediatamente após a realização do risco (tempo 0h) e depois em 24 e 48 h de tratamento, como demonstrado esquematicamente na **Figura 9**.

As imagens foram analisadas pelo software ImageJ® com o objetivo de avaliar a área de migração celular após o tratamento, e assim determinar a capacidade do monepantel de interferir no fechamento da fenda.

Figura 9. Desenho esquemático para representação do ensaio de Scratch.



4.7. Western Blot (WB)

A técnica de western blot (esquematizada na **Figura 10**) foi realizada para avaliação do conteúdo de proteínas e fosfoproteínas conforme descrito previamente (Leal et al., 2022; Nascimento et al., 2018, 2019), mas com algumas modificações. São plaqueadas 500.000 células por poço em placa de 6 poços por 24 horas para serem então tratadas com as concentrações já indicadas de Monepantel. Após o tratamento, as células foram cuidadosamente removidas com o auxílio de um Cell Scraper e homogeneizadas com 100uL de SDS Stop Solution 4% (Tris 50 mM, EDTA 2 mM, SDS 4%, pH 6,8). Após a retirada de alíquotas do homogeneizado, para dosagem de proteínas pelo método de Lowry modificado (Peterson, 1977), foi adicionado o tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM de Tris e azul de bromofenol) na proporção de 1:4 e por fim, β -mercaptoetanol na concentração final de 8%. As proteínas foram separadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando gel de separação de 10% e 16% e gel de entrada na concentração de 4% (LIANG; PARK; GUAN, 2007) A eletroforese foi utilizada com corrente fixa de 15 mA/placa e voltagem máxima de 180V durante aproximadamente 2,5 h, utilizando os tampões superior (glicina 190 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%)

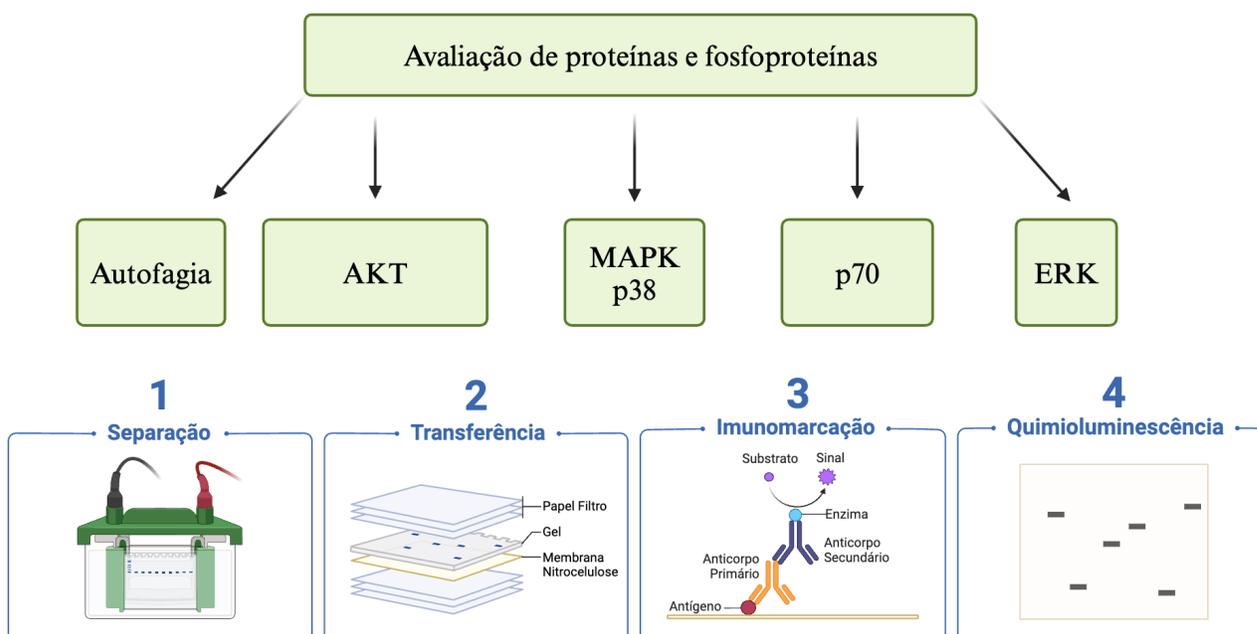
e inferior (Tris 50 mM; pH 8,3). Após a eletroforese, os géis foram submetidos à eletrotransferência usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5 h) como descrito por Bjerrum & Heegaard, 1989. Assim, as membranas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e logo em seguida, coradas com Ponceau (Ponceau 0,5% em ácido acético 1%) (LOPES et al., 2012). Para imunodeteção, as membranas foram lavadas com água Milli Q para depois serem incubadas por 10 minutos com “**Antigen Pretreatment Solution**” (Thermo Scientific, Cat # 46640), logo após, as membranas foram novamente lavadas com água Milli Q e incubadas com “Blocking Buffer” (Thermo Scientific; Cat # 37536) por 1 hora, em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T (Tween-20 0,1%; Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) para serem incubadas com o anticorpo específico contra formas fosforiladas ou totais das proteínas de interesse, listados na **Tabela 2** e exemplificado na **Figura 9**. Os anticorpos primários foram diluídos utilizando “Primary Antibody Diluent” (Thermo Scientific; Cat # 46640), enquanto os anticorpos secundários foram diluídos em **TBS-T + Albumina 2%** e incubados por 30 minutos. Em seguida, as proteínas foram detectadas por quimioluminescência utilizando “SuperSignal™ West FTEMo Maximum Sensitivity Substrate” (Thermo Scientific; Cat # 34095), conforme orientação do fabricante. A análise foi realizada utilizando o aparelho Fotodocumentador ChemiDoc (Bio Rad®), disponível no Laboratório Multiusuário da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB). Os valores densiométricos das bandas foram determinados utilizando o software Image Lab® (Bio-Rad).

Tabela 2. Massa molecular da proteína alvo, fabricante e diluição dos anticorpos utilizados para Western Blotting.

Anticorpo	Massa molecular da proteína alvo	Fabricante (código)	Diluição
Anti-Akt	~60 kDa	Cell signalling (#9272s)	1:1000
Anti-phospho-Akt	~60 kDa	Cell signalling (#9271s)	1:1000
Anti-β-actina	~45 kDa	Santa cruz biotechnology (sc-47778)	1:2000
Anti-LC3	~18 kda (LC3-I) ~16 kda (LC3-II)	Cell signalling (#12741s)	1:1000
Anti-map kinase (ERK1/2)	~42/44 kDa	Sigma (m5670)	1:20000

Anti-phospho-ERK		~44 kDa (ERK1) ~42 kDa (ERK2)	Sigma (m8159)	1:2000
Anti-mTOR		~289 kDa	Cell signalling (#29835s)	1:1000
Anti-phospho-mTOR		~289 kDa	Cell signalling (#2971s)	1:1000
Anti-p38 ^{MAPK}		~40 kDa	Sigma (m0800)	1:10000
Anti-phospho-p38 ^{MAPK}		~40 kDa	Cell signalling (#9215s)	1:1000
Anti-p70		~70 kDa	Cell signalling (#9205s)	1:1000
Anti-phospho-p70		~70 kDa	Cell signalling (#2908s)	1:1000
Goat igG, conjugated secondary antibody	anti-mouse peroxidase	-	Millipore (ap308p)	1:2500
Goat igG, conjugated secondary antibody	anti-rabbit peroxidase	-	MILLIPORE (AP132P)	1:2500

Figura 10. Desenho esquemático da análise realizada por Western Blot.



4.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism versão 5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados com distribuição normal, conforme o teste de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido por teste pos-hoc de Tukey. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

Para caracterizar inicialmente a ação do Monepantel sobre a viabilidade celular, foi realizada uma curva de concentração, através do tratamento, por 24 h, das células de glioma da linhagem C6 com Monepantel 1, 5, 12,5, 25 e 50 μM . Os resultados obtidos mostraram queda significativa da viabilidade celular nas concentrações mais altas, avaliada a partir da medida de redução de MTT. Notavelmente na concentração de 50 μM foi possível observar uma redução de 25% da viabilidade celular (**Figura 11**).

MTT Monepantel 24h

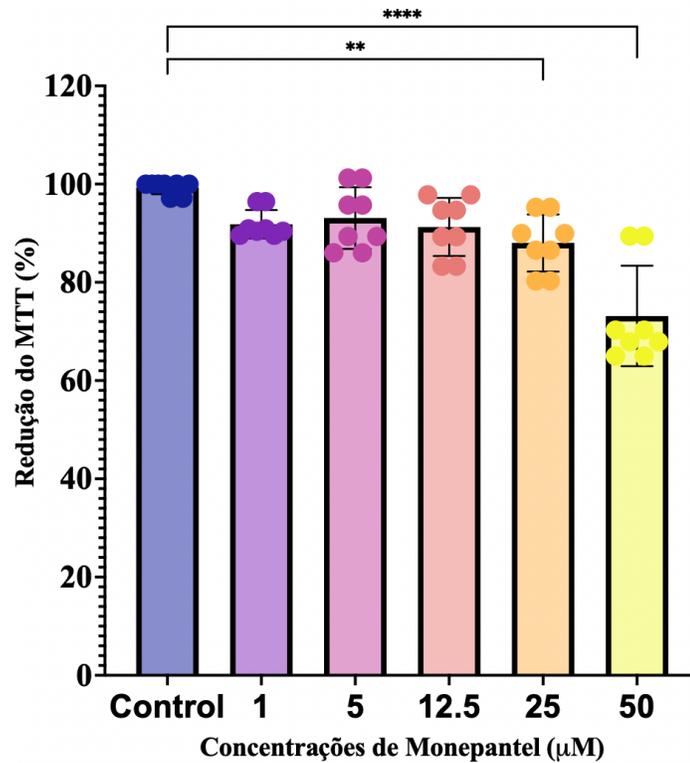


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT. Células de glioma da linhagem C6 foram expostas ao Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50µM ou veículo (DMSO 0,1% em PBS) por 24h. Os experimentos (N=8) foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão e representam porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%). ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

Para avaliar a dependência do tempo de incubação para a resposta ao Monepantel (1-50 µM), as células C6 também foram tratadas por 6, 12 e 48 h com Monepantel. Os tratamentos de 6 e 12 h não causaram diferença significativa da viabilidade celular (**Figura 12 A e B**). Enquanto isso, as células tratadas por 48 h apresentaram uma redução de 20% na viabilidade celular (**Figura 12 C**), mas apenas com a maior concentração (50 µM).

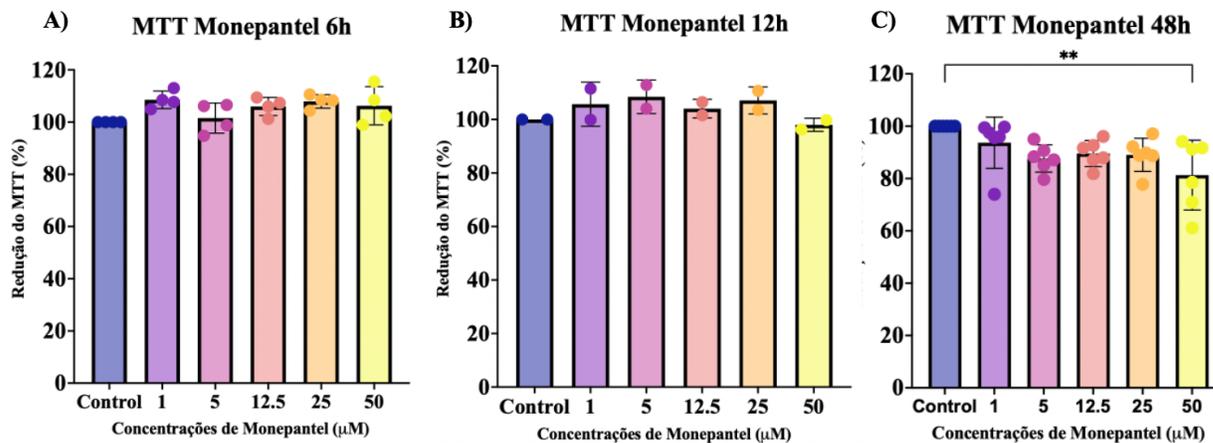


Figura 12. Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT em tempos de 6, 12 e 48h. Células de linhagem C6 de glioma foram expostas ao Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50μM ou veículo (PBS + DMSO 0,1%) por tempos de 6, 12 e 48 h. **A)** Células tratadas por 6h (N=4). **B)** Células tratadas por 12h (N=2). **C)** Células tratadas por 48h (N=6). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão; a porcentagem foi realizada em relação ao controle (considerado como 100%). ** $p < 0,01$. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

Após verificarmos que o Monepantel causava redução de viabilidade celular, especialmente em 24 h, foi realizada análise de autofagia, utilizando marcação com Laranja de Acridina (LA), seguida de microscopia de fluorescência. As células tratadas com Monepantel por 24 h apresentaram aumento considerável de organelas vesiculares ácidas (OVA), a partir da concentração de 12,5 μM foi observado um aumento de 15%, seguido do aumento de aproximadamente 30% na dosagem de 25 μM e por fim, na dosagem de 50 μM foi demonstrado um aumento de aproximadamente 50% (**Figura 13**).

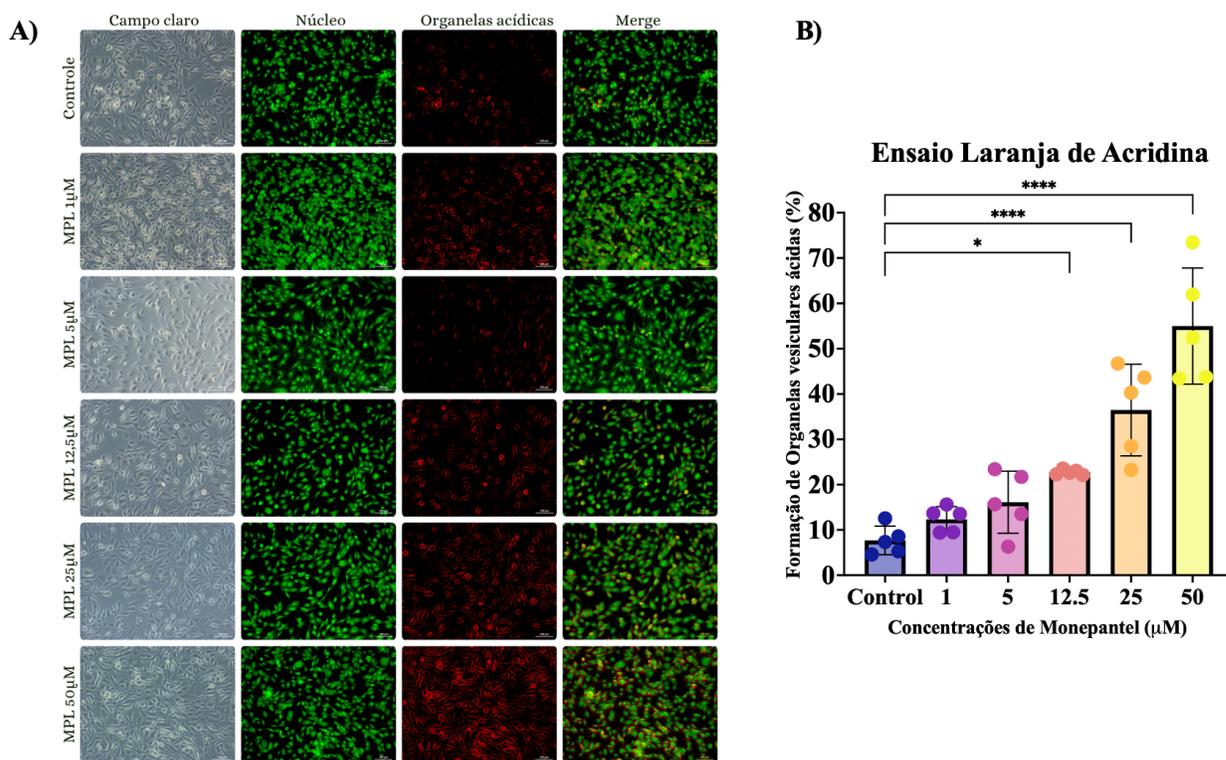


Figura 13. Aumento da marcação de organelas vesiculares ácidas (OVA) nas células C6 de glioma pelo tratamento com Monepantel. Células de linhagem C6 de glioma foram expostas ao Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50 μM ou veículo (PBS + DMSO 0,125%) por 24 horas. Após o tratamento as células foram coradas com Laranja de Acridina e visualizadas através de microscopia de fluorescência. **A)** Representativo da coloração das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 100 μm. **B)** Quantificação da formação de OVAs nos grupos tratados comparado ao controle. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão e representam porcentagem em relação ao controle. * $p < 0,1$ e **** $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

Para comprovar a indução de autofagia pelo Monepantel foi também avaliado os níveis de LC3B-II, através de Western blot. Foi apresentado Western blot representativo e a quantificação dos níveis de LC3B-II (**Figura 14**). O resultado indica que Monepantel aumenta os níveis de LC3B-II comparado ao veículo, especialmente na concentração de 50 μM ($p < 0,05$), corroborando com os dados anteriores, obtidos pela avaliação da produção de OVAs, utilizando o método de microscopia e coloração com LA.

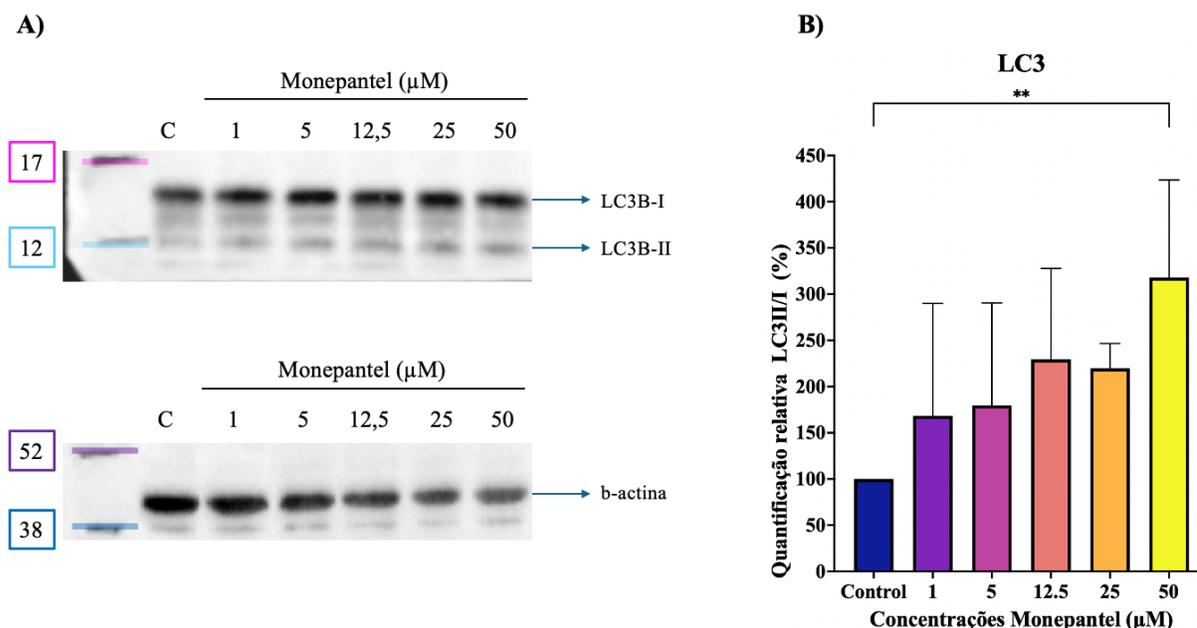


Figura 14. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a proteína LC3II para avaliação da autofagia. **A)** Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteção de LC3I/LC3II e β -actina. **B)** Quantificação de LC3II, expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). Os dados foram quantificados utilizando o programa ImageLab utilizando o valor relativo ao controle. Os dados foram comparados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; $N = 4$.

Akt é uma enzima de sinalização importante para regular a sobrevivência celular e a autofagia. Nesse sentido Akt pode ativar mTORC1 e dessa forma causar inibição da autofagia e promover estímulo da síntese proteica entre outros efeitos. Tem sido apontado que a inibição da atividade de Akt pode levar a uma menor atividade de mTORC1 e dessa forma promover o processo autofágico. Assim, foi feita a análise do conteúdo e fosforilação de Akt via Western Blot. Ao analisar as amostras tratadas com Monepantel, não foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa da fosforilação de Akt nas células tratadas em relação ao controle (**Figura 15**), embora a média de fosforilação tenha se mostrado diminuída na concentração mais elevada do Monepantel.

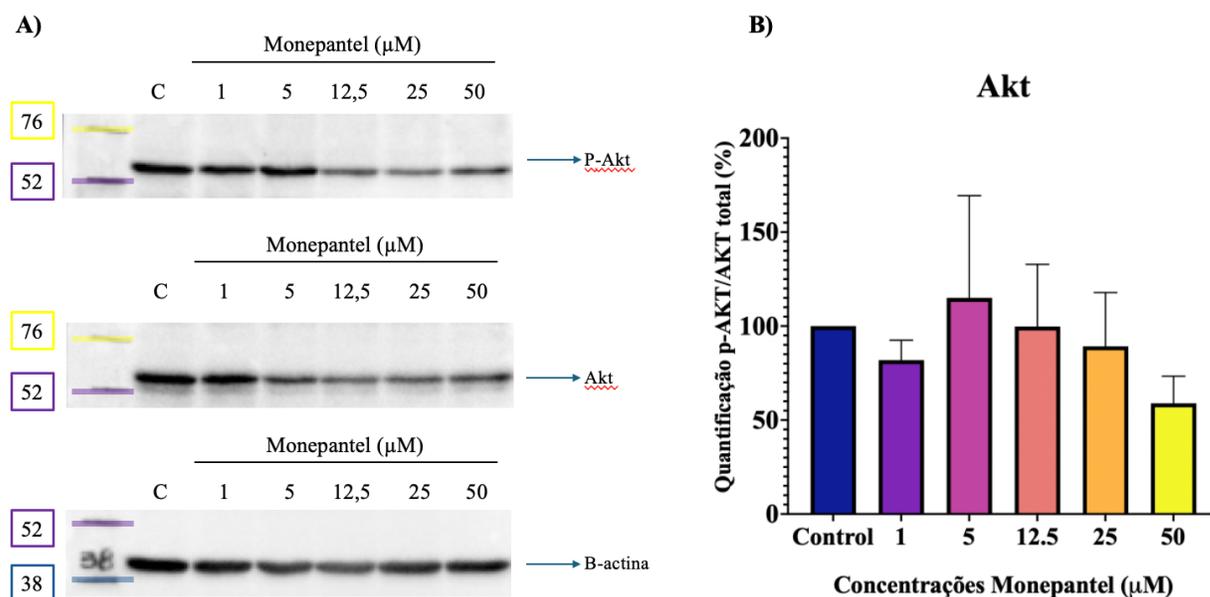


Figura 15. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a atividade da proteína Akt. **A)** Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteccção de p-Akt, Akt total e β -actina. **B)** Quantificação da fosforilação da Akt expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). Os dados foram quantificados utilizando o programa ImageLab utilizando o valor relativo ao controle. Os dados foram comparados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; $N = 4$.

A p70S6K (p70 S6 cinase) é um alvo downstream à mTORC1, cuja fosforilação pode expressar o grau de atividade de mTORC1, que por sua vez foi demonstrada ser inibida pelo Monepantel em modelo de câncer de ovário (BAHRMANI et al., 2014). Para analisar o efeito do fármaco na via downstream da mTOR, foi realizado Western Blot de p70S6K. O resultado, não mostrou uma diferença estatística entre os grupos em relação ao controle (**Figura 16**). Entretanto, similar ao observado na avaliação de Akt, a média da fosforilação de p70 S6 cinase (p-P70) mostrou uma queda. Dessa forma, será importante estender essa análise com mais repetições, para confirmar esse resultado.

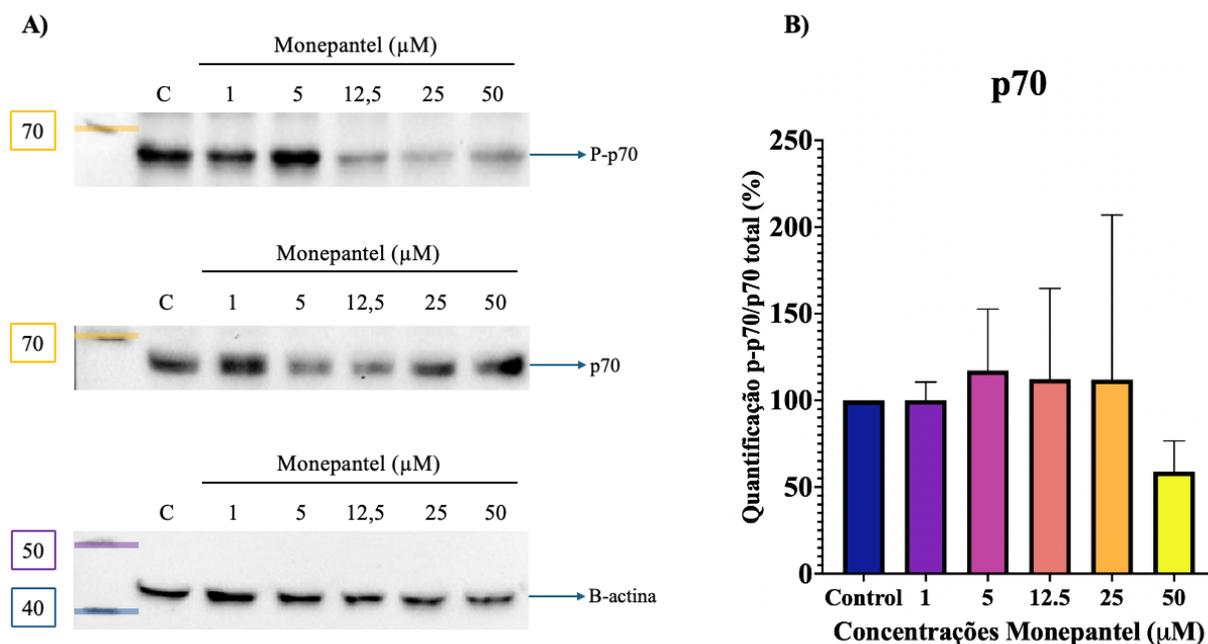


Figura 16. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a fosforilação da proteína p70S6K. **A)** Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteção de p-P70, p70 e de β -actina; **B)** Quantificação da fosforilação de p70 expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). Os dados foram quantificados utilizando o programa ImageLab utilizando o valor relativo ao controle. Os dados foram comparados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; $N = 3$.

$p38^{\text{MAPK}}$, representada por quatro isoformas (α , β , γ , δ), são serina-treonina cinases da família das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Classicamente $p38^{\text{MAPK}}$ pode ser ativada por fosforilação em resposta à estímulos de estresse ou citocinas. $p38^{\text{MAPK}}$ desempenha papel crítico em diversas vias de sinalização que regulam a proliferação celular, diferenciação, apoptose e indução da produção de citocinas. A avaliação da possível modulação de $p38^{\text{MAPK}}$ pelo Monepantel foi realizada por Western blot a partir da quantificação de P- $p38^{\text{MAPK}}$ (forma fosforilada de $p38^{\text{MAPK}}$) em relação a $p38^{\text{MAPK}}$ (imunoc conteúdo total da enzima). Os resultados não indicaram alteração significativa da fosforilação da enzima, sendo que apenas as células tratadas com Monepantel 5 μ M apresentaram uma tendência no aumento ($p = 0,0608$) da fosforilação quando comparada as células controle (**Figura 17**). A confirmação da identidade de P- $p38^{\text{MAPK}}$, foi

realizada utilizando uma amostra tratada durante 1 h com anisomicina, composto que inibe a síntese proteica e promove potente ativação de p38^{MAPK} (aumento de sua fosforilação).

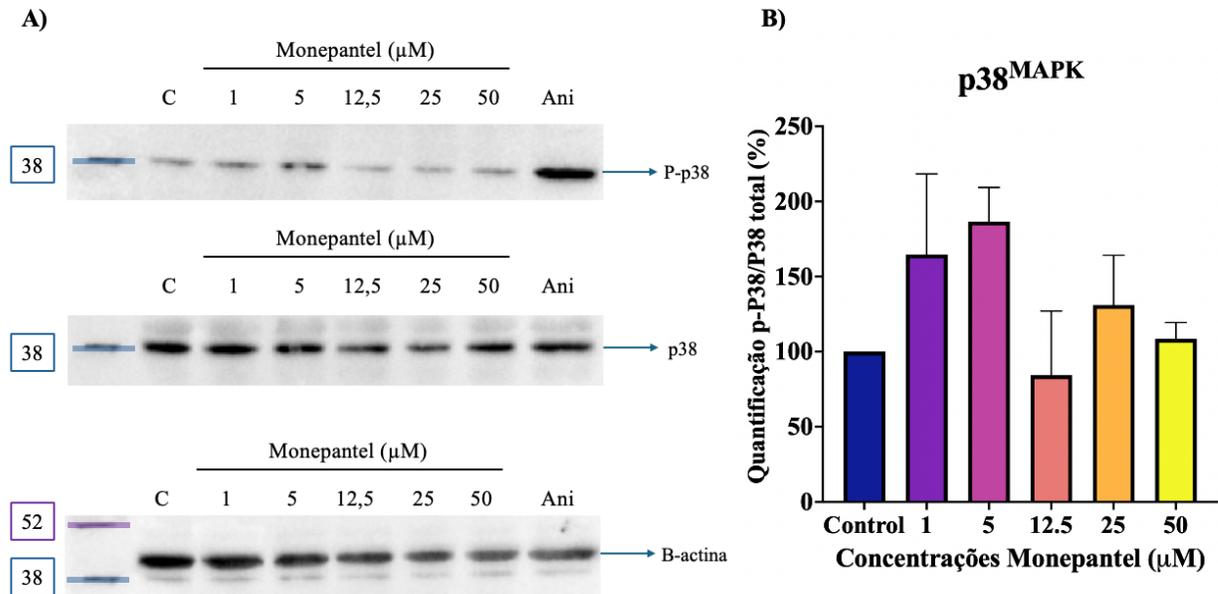


Figura 17. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a atividade da proteína p38. Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteção de p-P38, p38 e β-actina; **B)** Quantificação da fosforilação de p38 expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageLab, e os dados foram expressos em relação ao controle (considerado 100%). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; $N = 3$.

Visto que as proteínas cinases ERK1/2 têm papel fundamental na regulação da proliferação, sobrevivência e resistência tumoral, foi feita uma análise da sua atividade por Western blot. Foi observado uma diminuição da fosforilação da ERK2 (42 kDa) nas concentrações de 5 e 50 μM e uma tendência a diminuição na concentração de 25 μM ($p = 0,0636$). No entanto, não foi observado diminuição da fosforilação da ERK1 (44 kDa) de maneira significativa (**Figura 18**).

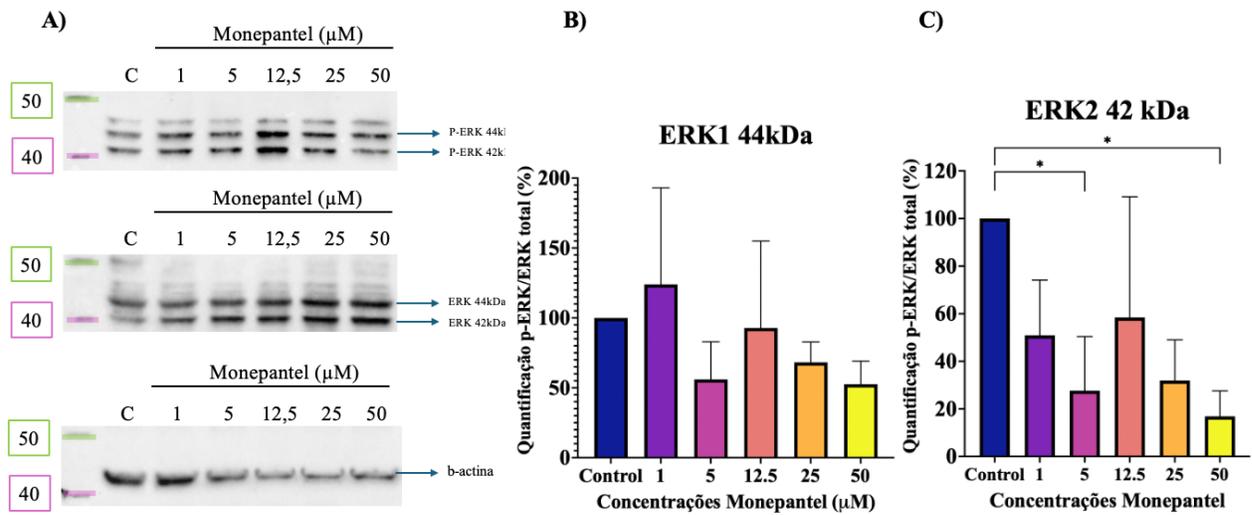


Figura 18. Análise por Western blot das células C6 tratadas com Monepantel por 24 h com o objetivo de quantificar a atividade das proteínas ERK1/2. Imagem representativa da membrana mostrando a imunodeteção de p-ERK1/2, ERK1/2 e β -actina; **B)** Quantificação da fosforilação de ERK1 expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%); **C)** Quantificação da fosforilação de ERK2 expressa em percentual relativo ao controle (considerado 100%). As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageLab, e os dados foram expressos em relação ao controle (considerado 100%). Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$; $N = 3$.

Foram realizados também ensaios de migração celular utilizando células C6 tratadas com Monepantel (1-50 μ M) por 24 e 48 h. As células tratadas com as maiores doses de Monepantel (25 e 50 μ M) demonstraram dificuldade consistente para realização da migração, quando comparadas ao controle (**Figura 19**).

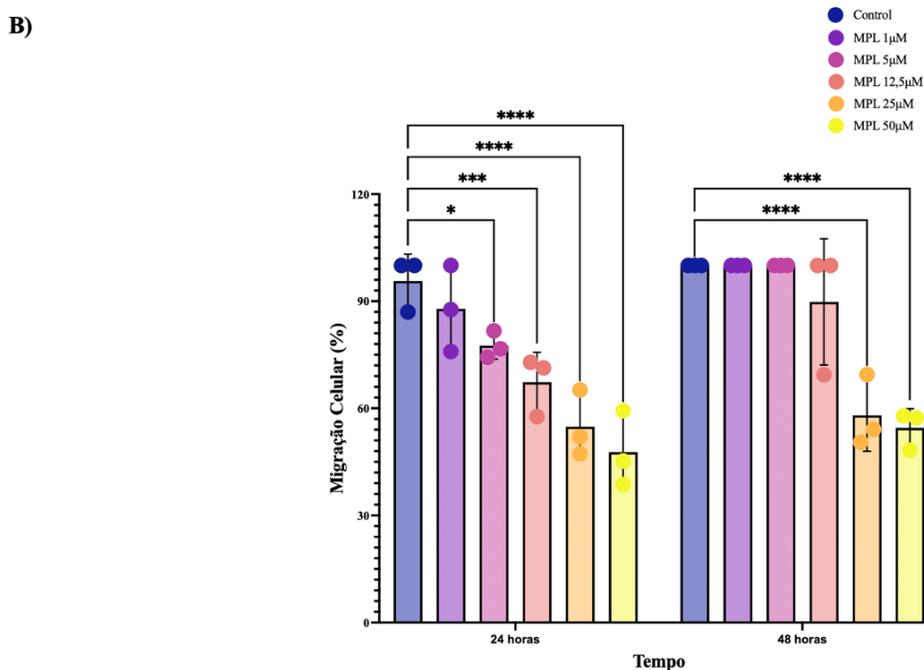
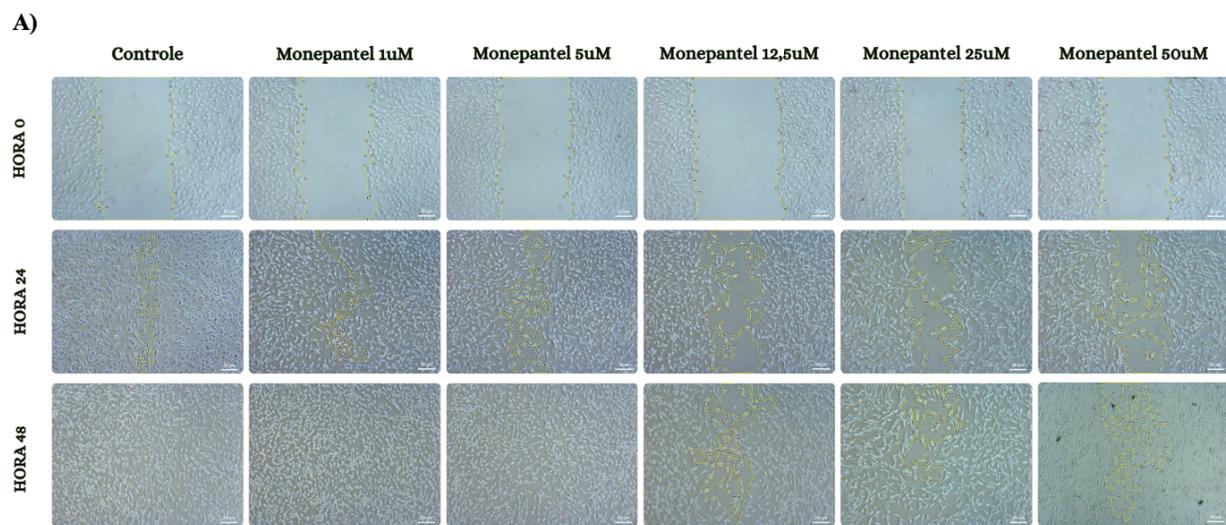


Figura 19. Ensaio de Migração celular com células C6 tratadas com Monepantel. Células de glioma da linhagem C6, foram tratadas com Monepantel nas concentrações de 1, 5, 12,5, 25 e 50 μ M ou veículo (PBS + DMSO 0,1%) por 48 horas. No momento que foi adicionado o tratamento, foi realizado o risco com auxílio de uma ponteira de pipeta P200. O acompanhamento do fechamento do risco foi realizado por microscopia nos tempos de 0, 24 e 48h. A) Imagem representativa, obtida por microscopia de luz, das células expostas aos diferentes tratamentos.

Barra de escala representa 100 μm . **B)** Quantificação da migração expressa em percentual do fechamento total. O fechamento da fenda foi analisado utilizando o programa Image J. * $p < 0,1$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. ($N=3$).

Dado que estruturas celulares 3D se assemelham mais ao ambiente natural dos tumores, foi realizada uma cultura celular com células de glioma humano da linhagem U87-MG para formação de tumoresferas e consequente análise dos efeitos do Monepantel. O ensaio foi feito para avaliar o potencial de transição epitélio-mesenquimal. Os resultados preliminares demonstraram que há um aumento da área de migração celular na concentração de 25 μM . Também, pode se observar um aumento no tamanho e diminuição da quantidade de tumoresferas nos grupos tratados quando comparadas ao controle (**Figura 20**).

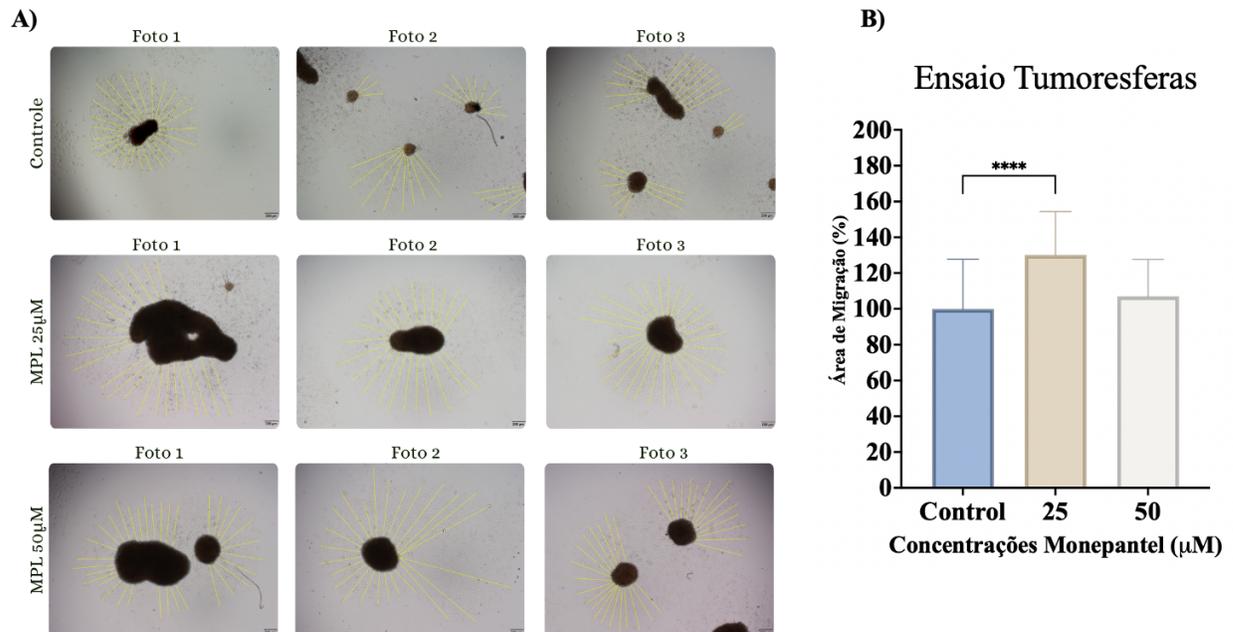


Figura 20. Ensaio de formação de tumoresferas para avaliação da Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) em células U87-MG tratadas com Monepantel (25 e 50 μM) ou veículo (PBS + DMSO 0,1%) no período de 24 h. **A)** Imagem representativa, obtida por microscopia de luz, das células expostas aos diferentes tratamentos. Barra de escala representa 200 μm . **B)** Quantificação da área de migração expressa em percentual de deslocamento celular. A área de migração foi analisada utilizando o programa Image J. **** $p < 0,0001$. ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey.

6. DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostraram uma atividade antitumoral do Monepantel a partir da inibição da sinalização de mTORC1, induzindo a autofagia em câncer de ovário (BAHRAMI et al., 2014a, 2014b, 2021). Adicionalmente, utilizando linhagens celulares de diversos tipos de câncer foi mostrado a capacidade do Monepantel induzir autofagia e apoptose, além de regular negativamente genes envolvidos no ciclo celular e positivamente genes envolvidos na indução do estresse de retículo endoplasmático (HARRIS et al., 2023).

Neste estudo, avaliamos a atividade antitumoral do Monepantel em linhagem celular de glioma C6 utilizando diferentes dosagem e curva de tempo, a fim de elucidar sua maneira de ação. O fármaco demonstrou uma diminuição da viabilidade celular de 10% no período de 24 h nas células tratadas com dose de 25 μM e 25% nas células tratadas com 50 μM quando comparadas ao controle. Quando tratadas por 48 h, o Monepantel causou redução de 20% na viabilidade das células tratadas com 50 μM , apesar da redução menos acentuada do Monepantel após 48 h de tratamento, o tempo de dobra da linhagem celular C6 é de 24-28 horas (Kuduvalli et al., 2020), assim, esse resultado pode sugerir que o Monepantel está influenciando não só na viabilidade como também a proliferação celular. Assim, ensaios futuros para determinar a proliferação celular em resposta ao tratamento com Monepantel serão importantes. Em linhagens de câncer de ovário (OVCAR-3, A2780, SKOV-3 e IGROV-1), o Monepantel apresentou uma redução significativa em todas as doses testadas (5, 10 e 25 μM) após 72 h de tratamento (Bahrami et al., 2014b) ainda em linhagens de câncer de ovário, outro estudo utilizou as linhagens A2780, CAO-3 e OVCAR-3 para realizar uma curva de dose de 0-100 μM no período de 72 h e foi possível observar que o Monepantel já demonstrou redução significativa a partir da dosagem de 5 μM (Ataie-Kachoie et al., 2018). Em linhagens celulares de melanoma (LM-MEL28), mama (MDA-MB-231), ovário (OVCAR-3), pulmão (A549), próstata (PC-3) e cólon (HCT-116) o Monepantel apresentou uma diminuição drástica da viabilidade celular já em 24 h a partir da dosagem de 12,5 μM . Notavelmente, na linhagem celular de câncer cerebral (U87-MG) a viabilidade diminuiu 10% em 24 e 48 h apenas na dosagem de 25 μM , com uma diminuição acentuada (25%) em 72 h nas dosagem de 12,5 e 25 μM , além disso, nesse mesmo estudo, o Monepantel apresentou atividade

anti-proliferativa em linhagens celulares de melanoma (LM-MEL28) e pulmão (A549) (HARRIS et al., 2023).

Acredita-se que a autofagia desempenha um papel essencial na iniciação e desenvolvimento tumoral pela sua capacidade de mitigar o estresse celular e manter a homeostase e sobrevivência celular, apesar disso, quando estimulada de maneira excessiva a autofagia pode promover a morte celular (DEBNATH; GAMMOH; RYAN, 2023). O Monepantel demonstrou a capacidade de promover a morte das células tumorais a partir da inibição mTORC1, que por sua vez, leva a indução da autofagia. Assim, realizamos um ensaio com laranja de acridina para análise da formação das organelas vesiculares acidas (OVAs) e foi visto um aumento das OVAs de maneira dose dependente nas concentrações de 12,5 - 50 μM em 10, 30 e 50%, respectivamente, após 24 h de tratamento, corroborando com os dados encontrados por Barhami et al., 2014b, onde foi observado o aumento da formação das OVAs em células de ovários na concentração de 25 μM quando tratadas por 72h.

No processo de autofagia a proteína LC3B-I passa de uma forma livre (peso molecular aparente 16 kDa) para uma forma ligada à membrana (lipidada, ligada a fosfolípídeos), conhecida como LC3B-II (peso molecular aparente 14 kDa). Dessa forma, a LC3B-II que é alocada para a membrana do autofagossoma e participa do processo autofágico, serve também de marcador deste processo (MIZUSHIMA, 2007). Assim, foi realizado Western Blot para avaliar os níveis de LC3-II (~14 kDa). Os resultados indicaram aumento na lipidação dessa proteína na dose de 50 μM de Monepantel. Estudos anteriores demonstraram uma diminuição da LC3B-I e um aumento da LC3B-II em células de câncer de ovário em resposta ao tratamento com Monepantel 25 μM por 48 e 72 h (BAHRAMI et al., 2014b). Resultados similares foram encontrados em células de câncer de ovário tratadas com Monepantel nas doses de 12,5 e 25 μM por 24, 48 e 72 h (HARRIS et al., 2023)

A ativação da via da PI3K/Akt também é responsável pela regulação da autofagia ao ativar o mTORC1 e assim, inibir a formação e a atividade dos complexos de iniciação da autofagia, resultando na diminuição do processo autofágico. Portanto, sua ativação ou inibição tem impacto direto na atividade autofágica e, conseqüentemente, na homeostase celular e na resposta a diferentes condições fisiológicas e patológicas. Como o Monepantel parece agir pela inibição da mTOR, decidimos avaliar se o Monepantel não estava inibindo algum alvo “upstream”, porém não foi possível verificar alterações significativas na fosforilação da Akt nas condições experimentais

testadas, apesar disso, nós iremos replicar o experimento futuramente, com o objetivo de aumentar o N, visto que, o desvio padrão ficou elevado e, ao analisar a média, parece haver uma diminuição na dose de 50 μ M.

A mTORC1 quando ativada, fosforila diversos alvos, entre estes destaca-se o fator de iniciação eucariótica 4E-binding protein 1 (4E-BP1) e a p70S6 cinase (p70S6K). A redução da sinalização na mTORC1 pode ocasionar aumento da autofagia, processo este que pode ocorrer em casos de hipóxia, redução da disponibilidade de aminoácidos, diminuição da proliferação e crescimento celular, redução da sinalização de IGF e na redução dos níveis de ATP, levando a uma resposta de resistência a estresse, ou alternativamente, em grau muito elevado, causar morte celular. Originalmente Bahrami et al., 2014a demonstraram que Monepantel podia inibir a via de sinalização mTORC1/p70S6K. Dessa forma, considerando esse estudo, e o papel de mTORC1 na modulação da autofagia, decidimos avaliar a fosforilação da proteína p70S6K, substrato de mTORC1, porém não foi observada diferença significativa, apesar disso, deve ser considerado que o N amostral é muito pequeno, assim será necessário aumentar o número de amostras para obter dados mais robustos, que permitam uma análise mais precisa da influência do Monepantel na fosforilação da p70S6K.

Com o propósito de elucidar se o Monepantel influencia a fosforilação da p38^{MAPK}, que é uma via envolvida em diversas respostas celulares, incluindo estresse, inflamação, regulação da apoptose, diferenciação celular e resposta imune, foi realizado o ensaio por western blot onde foi possível observar que há uma tendência de aumento da fosforilação dessa proteína na concentração de 5 μ M, apesar disso, o N amostral é muito pequeno e por isso, o experimento deve ser ampliado para confirmar a significância estatística dos resultados e verificar a robustez da resposta observada em um maior número de amostras. Isso permitirá uma avaliação mais precisa do impacto do Monepantel na modulação da atividade da p38^{MAPK} e ajudará a assegurar a validade dos achados iniciais.

O ensaio de migração celular em células tumorais é uma técnica crucial para compreender a capacidade das células cancerosas de se mover e invadir outros tecidos, ou no caso dos gliomas, dentro do parênquima cerebral, aspectos essenciais do câncer. Avaliar a migração celular ajuda a entender o potencial metastático das células tumorais, fornecendo informações sobre a eficácia de terapias que visam inibir essa migração e a capacidade celular de invasão. Com o objetivo de

analisar como o Monepantel afeta a motilidade celular, foi realizado ensaio de migração por Scratch onde foi possível observar que o fármaco inibe a migração de maneira dose dependente.

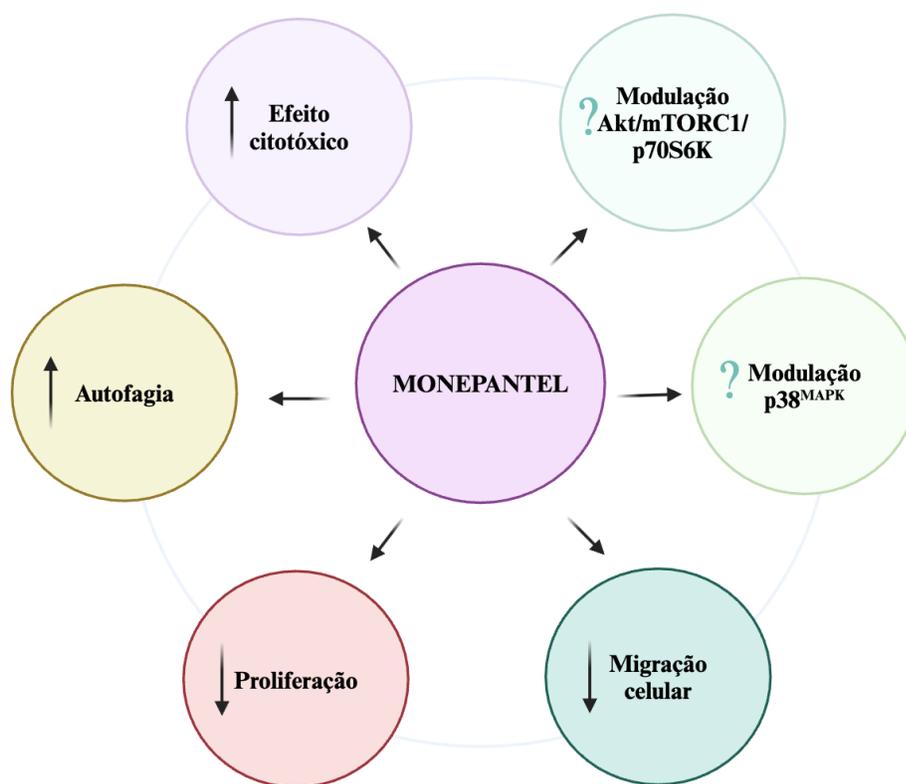
A proteína ERK está envolvida em vários processos celulares, como crescimento, sobrevivência, proliferação e diferenciação. Em células tumorais, essa proteína pode estar ativada de maneira exacerbada podendo promover o crescimento descontrolado, além de contribuir para a proliferação e formação tumoral (BAHAR et al., 2023), assim, foi realizada a análise dessa proteína por Western Blot. Os resultados indicaram uma diminuição significativa na fosforilação de ERK2 nas concentrações de 5 e 50 μM e uma tendência na concentração de 25 μM . Dessa forma, parece possível que parte da ação do Monepantel sobre as células C6, relativo à viabilidade e migração, possa estar associada a inibição de ERK2. Entretanto, estudo adicionais utilizando moduladores de ERK seriam importantes para determinar essa correlação.

A transição epitélio-mesenquimal desempenha um papel essencial na progressão tumoral, esse processo facilita a capacidade dessas células de invadir tecidos adjacentes e realizar metástase, além de promover resistência ao tratamento, pela aquisição de características de células tronco-tumorais. Em conjunto estes fatores contribuem para a plasticidade tumoral, interação com o microambiente tumoral, ativação de vias de sinalização e alteração da expressão de várias moléculas (BRABLETZ et al., 2018; ROCHE et al., 2018; RIBATTI et al., 2020). Para analisar a transição epitélio-mesenquimal, realizamos a formação de tumoresferas com o objetivo de desenvolver um ambiente semelhante ao ambiente natural do tumor e analisar a migração celular. Apesar dos resultados demonstrarem um aumento na área de migração na concentração de 25 μM , é possível notar que as tumoresferas do grupo controle são menores que as tratadas, isso pode sugerir que, devido a citotoxicidade do Monepantel, as tumoresferas do grupo tratado, para se protegerem, acabem se unindo uma as outras. Os resultados encontrados por Harris et al., 2023, que fizeram cultura celular 3D com células de melanoma (LM-MEL-28) e pulmão (A549), observaram uma resposta parecida com aquela observada na cultura celular 2D, na qual as células tiveram uma diminuição na proliferação, apresentando uma mínima taxa de apoptose, sugerindo uma inibição da proliferação pelo Monepantel.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo foi evidenciado uma atividade antiglioma do Monepantel no modelo de glioma da linhagem C6. Neste sentido Monepantel promoveu efeito citotóxico, demonstrou a capacidade de induzir o processo de autofagia e apresentou evidências de ação anti-proliferativa. Além disso, Monepantel provou a capacidade de reduzir a migração celular. Em relação a modulação de vias de sinalização celular ficou evidente a ação inibitória do Monepantel sobre a via de ERK2. Entretanto, nas condições experimentais utilizadas não foi possível detectar modulação da via Akt/mTORC1/p70S6K nem de p38^{MAPK} (**Figura 21**). Em conjunto, os resultados indicam que o Monepantel é capaz de promover uma ação contra a progressão do glioma e indicam a importância de estudos adicionais para melhor caracterizar essa atividade.

Figura 21. Esquema representativo da conclusão dos experimentos.



ANEXOS

Em paralelo, foi realizado estudos em colaboração com o Prof. Dr. Benildo utilizando a lectina purificada de *Centrolobium microchaete* (CML) para análise de viabilidade celular (**Figura 22**), ensaio de migração (**Figura 23**) e autofagia por laranja de acridina (**Figura 24**).

Adicionalmente, houve a participação como co-autora na publicação de um artigo intitulado “Xc- system as a possible target for ConBr lectin interaction in glioma cells” doi: 10.3390/neuroglia5030015.

Figura 22. Ensaio de viabilidade celular por redução MTT. Células C6 tratadas com CML nas doses de 10, 30, 50 e 100 µg/mL por 24 h. N=7. ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey.

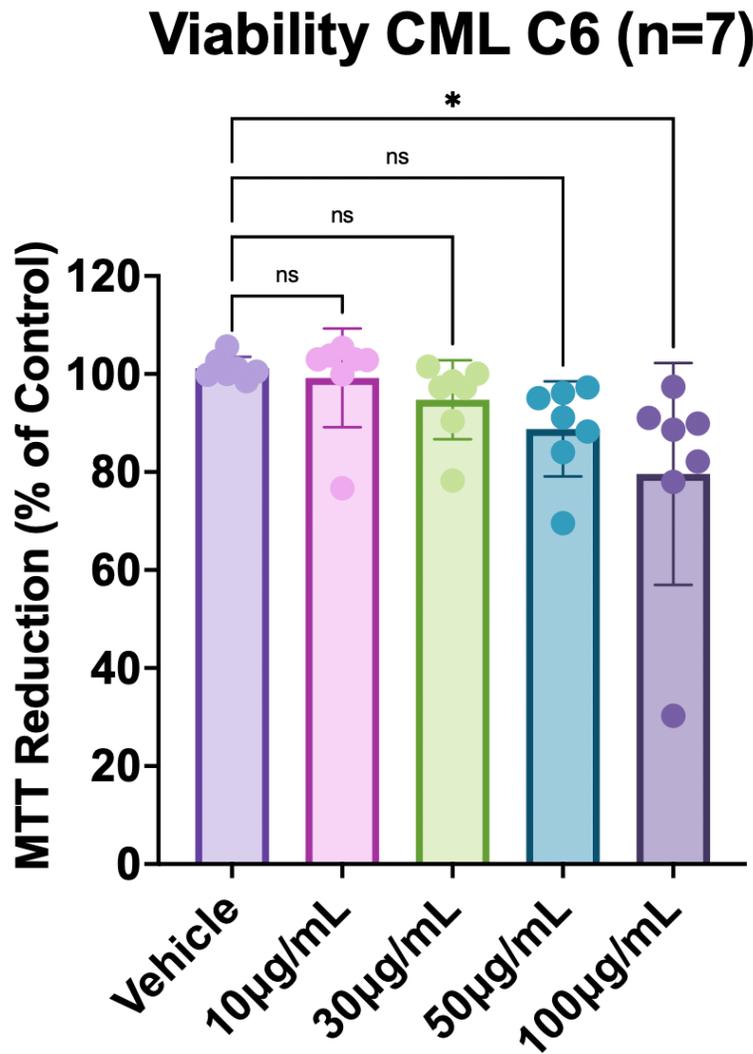


Figura 23. Ensaio de migração celular por Scratch para avaliação da atividade da lectina *Centrolobium microchaete* (CML). Células C6 tratadas por 24 e 48 h com concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CML. $N=3$. ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey.

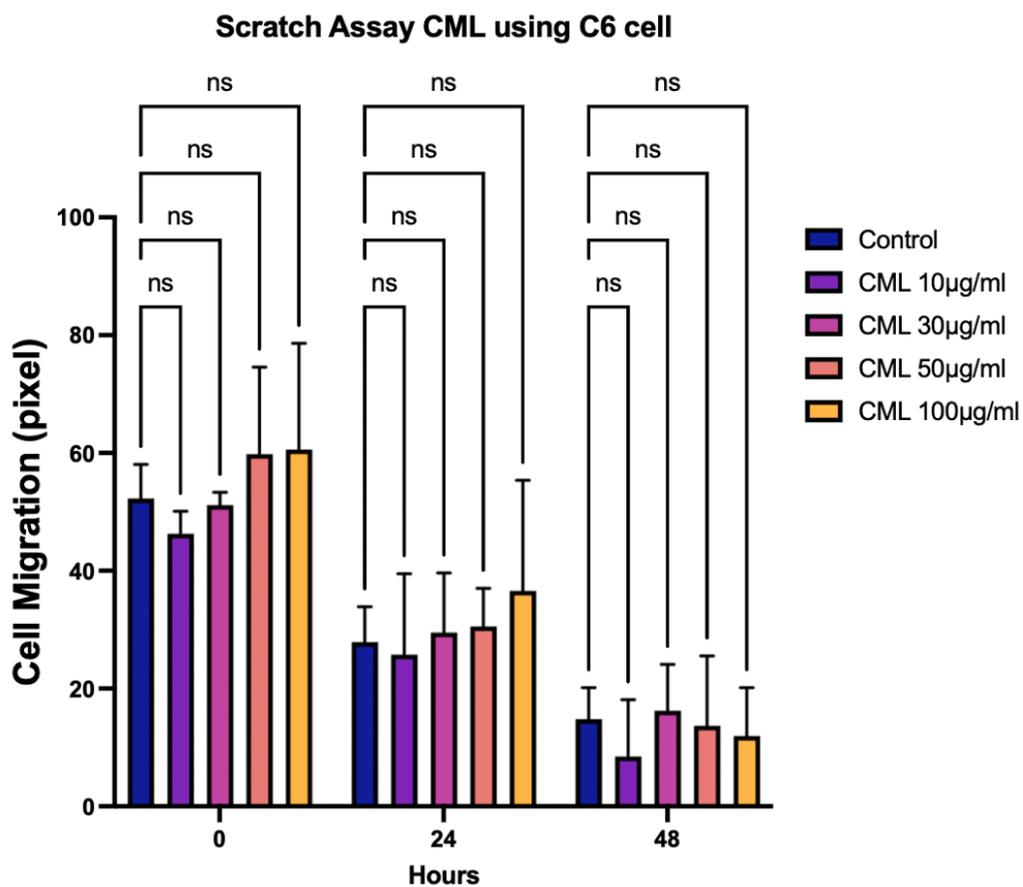
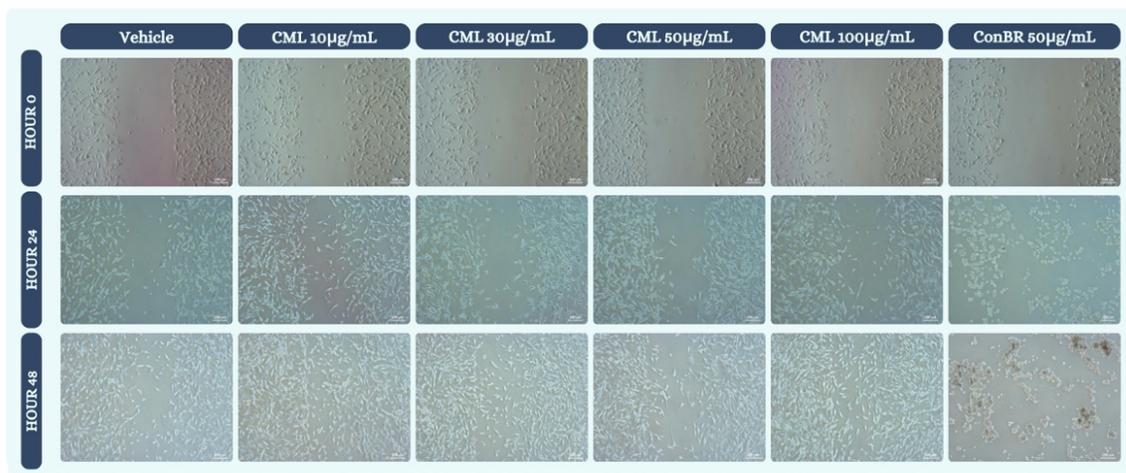
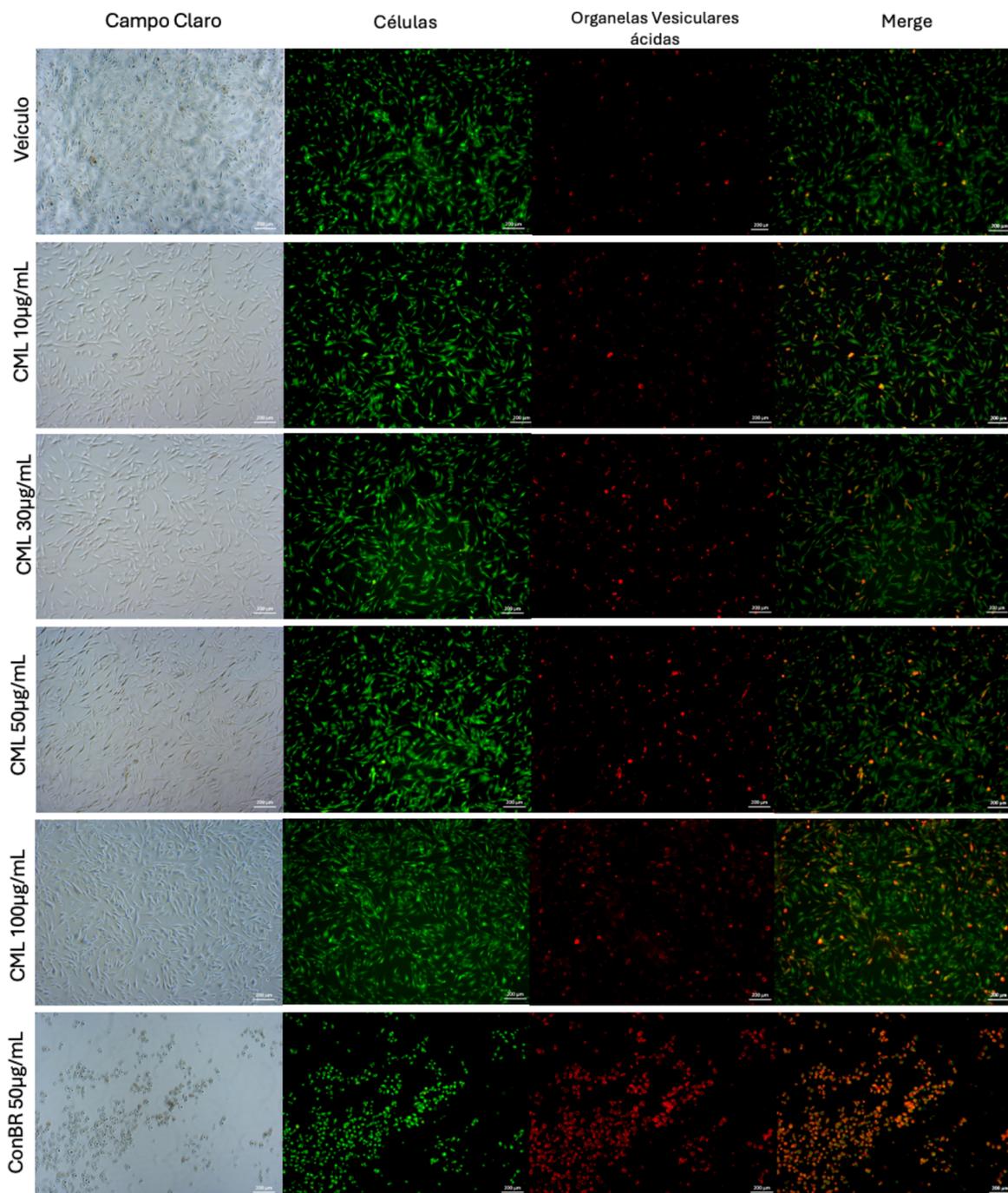


Figura 24. Ensaio para avaliação de autofagia pela formação de OVAs. Células tratadas com CML em doses de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 h. $N=3$. Imagens realizadas com auxílio de microscopia de fluorescência.

Ensaio Laranja de Acridina



REFERÊNCIAS

Agência Europeia de Medicamentos. Zolvix, INN-monepantel. 2009. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180702141685/anx_141685_pt.pdf>
Acesso em: 27 de agosto de 2024.

Ataie-Kachoie, P. et al. Monepantel considerably enhances the therapeutic potentials of PEGylated liposomal doxorubicin and gemcitabine in ovarian cancer: in vitro and in vivo studies. **Am J Cancer Res**, v. 8, n. 10, p. 2064–2075, 1 out. 2018.

Bahrami, F. Et Al. **Anticancer properties of novel aminoacetonitrile derivative monepantel (ADD 1566) in pre-clinical models of human ovarian cancer** **Am J Cancer Res**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ajcr.us/>.

Bahrami, F. Et Al. Monepantel induces autophagy in human ovarian cancer cells through disruption of the mTOR/p70S6K signalling pathway. **Am J Cancer Res**, v. 4, n. 5, p. 558–571, 2014b.

Bahrami, F. et al. Monepantel antitumor activity is mediated through inhibition of major cell cycle and tumor growth signaling pathways. **American Journal Cancer Research** , v. 11, n. 6, p. 3098–3110, 2021.

Barnett, S. F.; Bilodeau, M. T.; Lindsley, C. W. **The Akt/PKB Family of Protein Kinases: A Review of Small Molecule Inhibitors and Progress Towards Target Validation** **Current Topics in Medicinal Chemistry**. [s.l: s.n.].

Bejarano, E.; Cuervo, A. M. **Chaperone-mediated autophagy**. **Proceedings of the American Thoracic Society**, 15 fev. 2010.

Belyaeva, E. et al. **Isoforms of autophagy-related proteins: role in glioma progression and therapy resistance.** *Molecular and Cellular Biochemistry* Springer, , 1 fev. 2022.

Bhutia, S. K. et al. **Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death.** *Pharmacological Research* Academic Press, , 1 jun. 2019.

Cargnello, M.; Roux, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 1, p. 50–83, mar. 2011.

Chen, H. T. et al. **Crosstalk between autophagy and epithelial-mesenchymal transition and its application in cancer therapy.** *Molecular Cancer* BioMed Central Ltd., , 24 maio 2019.

Cui, J. et al. **JNK pathway: Diseases and therapeutic potential.** *Acta Pharmacologica Sinica*, maio 2007.

Dahlmanns, M.; Yakubov, E.; Dahlmanns, J. K. **Genetic Profiles of Ferroptosis in Malignant Brain Tumors and Off-Target Effects of Ferroptosis Induction.** *Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 1 dez. 2021.

Debnath, J.; Gammoh, N.; Ryan, K. M. **Autophagy and autophagy-related pathways in cancer.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Research, , 1 ago. 2023.

Dikic, I.; Elazar, Z. **Mechanism and medical implications of mammalian autophagy.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , 1 jun. 2018.

Dongre, A.; Weinberg, R. A. **New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , 1 fev. 2019.

Fahie, K.; Zachara, N. E. **Molecular Functions of Glycoconjugates in Autophagy.** *Journal of Molecular Biology* Academic Press, , 14 ago. 2016.

Furukawa, J. I. et al. Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, 1 jul. 2015.

Gao, Y. et al. **Role of glycans on key cell surface receptors that regulate cell proliferation and cell death.** *Cells* MDPI, , 1 maio 2021.

Glaviano, A. et al. **PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer.** *Molecular Cancer* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2023.

Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K. F. **Autophagy: Cellular and molecular mechanisms.** *Journal of Pathology*, maio 2010.

Graham-Gurysh, E. G. et al. Synergistic drug combinations for a precision medicine approach to interstitial glioblastoma therapy. *Journal of Controlled Release*, v. 323, p. 282–292, 10 jul. 2020.

Guo, Y. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, 15 jan. 2020.

Gupta, G. et al. **Cancer resistance to immunotherapy: What is the role of cancer stem cells? Cancer Drug Resistance**OAE Publishing Inc., , 2022.

Han, J.; Wu, J.; Silke, J. **An overview of mammalian p38 mitogen-activated protein kinases, central regulators of cell stress and receptor signaling.** F1000ResearchF1000 Research Ltd, , 2020.

Harris, T. J. et al. Induction of endoplasmic reticulum stress is associated with the anti-tumor activity of monepantel across cancer types. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 12, p. 13522–13537, 1 jun. 2023.

He, Y. et al. **Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy.** **Signal Transduction and Targeted Therapy**Springer Nature, , 1 dez. 2021.

Hsieh, T. H. et al. Combining an autophagy inhibitor, mpt01145, with abemaciclib is a new therapeutic strategy in gbm treatment. **Cancers**, v. 13, n. 23, 1 dez. 2021.

Huang, Z. et al. **Epithelial–mesenchymal transition: The history, regulatory mechanism, and cancer therapeutic opportunities.** **MedComm**John Wiley and Sons Inc, , 1 jun. 2022.

Jiang, Q. L. et al. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Proliferation**, v. 48, n. 1, p. 17–28, 1 fev. 2015.

Kaushik, S.; Cuervo, A. M. **The coming of age of chaperone-mediated autophagy.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , 1 jun. 2018.

Kuduvalli, S. S. et al. Evaluation of Cell Doubling Time in C6 and Y79 Cell Lines Based on Seeding Density. *SBV Journal of Basic, Clinical and Applied Health Science*, v. 2, n. 4, p. 146–149, 15 jul. 2020.

Kumar, S.; Boehm, J.; Lee, J. C. **P38 MAP kinases: Key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases.** *Nature Reviews Drug Discovery* European Association for Cardio-Thoracic Surgery, , 2003.

Lai, X. et al. **Epithelial-Mesenchymal Transition and Metabolic Switching in Cancer: Lessons From Somatic Cell Reprogramming.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Frontiers Media S.A., , 6 ago. 2020.

Laplanche, M.; Sabatini, D. M. **MTOR signaling in growth control and disease.** *Cell* Elsevier B.V., , 13 abr. 2012.

Lavoie, H.; Gagnon, J.; Therrien, M. **ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Research, , 1 out. 2020.

Leal, R. B. et al. Structural Prediction and Characterization of *Canavalia grandiflora* (ConGF) Lectin Complexed with MMP1: Unveiling the Antiglioma Potential of Legume Lectins. *Molecules*, v. 27, n. 20, 1 out. 2022.

Lecová, L. et al. **Monepantel: The most studied new anthelmintic drug of recent years.** **Parasitology** Cambridge University Press, , 14 nov. 2014.

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

Liu, F. et al. **Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy.** **Acta Pharmaceutica Sinica B** Chinese Academy of Medical Sciences, , 1 jul. 2018.

Liu, G. Y.; Sabatini, D. M. **mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease.** **Nature Reviews Molecular Cell Biology** Nature Research, , 1 abr. 2020.

Liu, R. et al. **PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers.** **Cell Death and Disease** Springer Nature, , 1 set. 2020.

Manning, B. D.; Toker, A. **AKT/PKB Signaling: Navigating the Network.** **Cell** Cell Press, , 20 abr. 2017.

Marafie, S. K.; Al-Mulla, F.; Abubaker, J. **mTOR: Its Critical Role in Metabolic Diseases, Cancer, and the Aging Process.** **International Journal of Molecular Sciences** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jun. 2024.

Mazalovska, M.; Kouokam, J. C. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

Mereiter, S. et al. **Glycosylation in the Era of Cancer-Targeted Therapy: Where Are We Heading?** *Cancer Cell* Cell Press, , 8 jul. 2019.

Mislang, A. et al. A preliminary assessment of oral monepantel's tolerability and pharmacokinetics in individuals with treatment-refractory solid tumors. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 86, n. 5, p. 589–594, 1 nov. 2020.

Mittal, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. 2024.

Mizushima, N. **Autophagy: Process and function.** *Genes and Development*, 15 nov. 2007.

Morrison, D. K. MAP kinase pathways. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 11, nov. 2012.

Nascimento, A. P. M. et al. Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 566–577, 1 dez. 2018.

Nascimento, A. P. M. et al. Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 660–672, 1 ago. 2019.

Nitulescu, G. M. et al. **The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review).** *International Journal of Oncology* Spandidos Publications, , 2018.

Panwar, V. et al. **Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease.** *Signal Transduction and Targeted Therapy* Springer Nature, , 1 dez. 2023.

Papavassiliou, K. A.; Papavassiliou, A. G. **Transcription factors in glioblastoma – Molecular pathogenesis and clinical implications.** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* Elsevier B.V., , 1 jan. 2022.

Parzych, K. R.; Klionsky, D. J. **An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation.** *Antioxidants and Redox Signaling*, 20 jan. 2014.

Peden, A. S. et al. Betaine acts on a ligand-gated ion channel in the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Nature Neuroscience*, v. 16, n. 12, p. 1794–1801, 2013.

Peterson, G. L. **A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable** *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. [s.l: s.n.].

PharmAust Limited. Likelihood of Approval and Phase Transition Success Rate Model - Monepantel in Motor Neuron Diseases. 2024. **Pharmaceutical Technology**. Disponível em: <https://www.pharmaceutical-technology.com/data-insights/monepantel-pharmaust-motor-neuron-diseases-likelihood-of-approval/> Acesso em: 27 de agosto de 2024.

Pucko, E. B.; Ostrowski, R. P. **Targeting protein kinases for anti-glioma treatment.** *Folia Neuropathologica* Termedia Publishing House Ltd., , 2021.

Reifenberger, G. et al. **Advances in the molecular genetics of gliomas-implications for classification and therapy.** *Nature Reviews Clinical Oncology* Nature Publishing Group, , 1 jul. 2017.

Rufener, L. et al. Phylogenomics of ligand-gated ion channels predicts monepantel effect. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, 2010.

Saxton, R. A.; Sabatini, D. M. **mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.** *Cell* Cell Press, , 9 mar. 2017.

Taylor, M. A.; Das, B. C.; Ray, S. K. **Targeting autophagy for combating chemoresistance and radioresistance in glioblastoma.** *Apoptosis* Springer New York LLC, , 1 dez. 2018.

Tian, T.; Li, X.; Zhang, J. **mTOR signaling in cancer and mtor inhibitors in solid tumor targeting therapy.** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 2019.

Timofeev, O. et al. **ERK pathway agonism for cancer therapy: evidence, insights, and a target discovery framework.** *npj Precision Oncology* Nature Research, , 1 dez. 2024.

Tournier, C. **The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer.** *Genes and Cancer*, set. 2013.

Trejo-Solís, C. et al. **Autophagic and apoptotic pathways as targets for chemotherapy in glioblastoma.** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 1 dez. 2018.

Veillon, L. et al. **Glycosylation Changes in Brain Cancer.** *ACS Chemical Neuroscience*American Chemical Society, , 17 jan. 2018.

Wang, L.; Klionsky, D. J.; Shen, H. M. **The emerging mechanisms and functions of microautophagy.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*Nature Research, , 1 mar. 2023.

Watanabe, R.; Wei, L.; Huang, J. MTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 52, n. 4, p. 497–500, 1 abr. 2011.

Wolin, I. A. V. et al. ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. *Biochimie*, v. 180, p. 186–204, 1 jan. 2021.

Wu, D. J.; Adamopoulos, I. E. **Autophagy and autoimmunity.** *Clinical Immunology*Academic Press Inc., , 1 mar. 2017.

Xuan, X. et al. **Mesenchymal stem cells in cancer progression and anticancer therapeutic resistance.** *Cancer Cell International*BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2021.

Yan, H. et al. **The Role of the Dysregulated JNK Signaling Pathway in the Pathogenesis of Human Diseases and Its Potential Therapeutic Strategies: A Comprehensive Review.** *Biomolecules*Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 fev. 2024.

Yang, T. et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio. *Pharmaceutical Research*, v. 32, n. 6, p. 2003–2014, 1 jun. 2015.

Yang, Y.; Huang, Y.; Li, W. **Autophagy and its significance in periodontal disease. Journal of Periodontal Research**Blackwell Munksgaard, , 1 jan. 2021.

Yao, W. et al. Taxifolin Targets PI3K and mTOR and Inhibits Glioblastoma Multiforme. **Journal of Oncology**, v. 2021, 2021.

Yarza, R. Et Al. **c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling as a therapeutic target for Alzheimer's disease. Frontiers in Pharmacology**Frontiers Media S.A., , 12 jan. 2016.

Yool, A. J.; Ramesh, S. Molecular Targets for Combined Therapeutic Strategies to Limit Glioblastoma Cell Migration and Invasion. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 27 mar. 2020.

You, G. et al. **Fusion Genes Altered in Adult Malignant Gliomas. Frontiers in Neurology**Frontiers Media S.A., , 4 out. 2021.

Zeke, A. et al. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 793–835, set. 2016.

Zhang, W.; Liu, H. T.; Tu, H. **MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells**Cell Research. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cell-research.com>>.

Zureick, A. H. et al. Successful treatment of a TSC2-mutant glioblastoma with everolimus. **BMJ Case Reports**, v. 12, n. 5, 31 maio 2019.