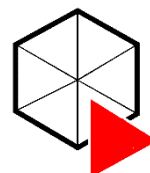




UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
QUÍMICA DE MINAS GERAIS



**Desenvolvimento de potenciais inibidores de ALDH1A3:
um alvo potencial no combate a células-tronco de
glioblastoma**

Emily Pacelli Moreira Linhares

Itajubá – MG

2023

Emily Pacelli Moreira Linhares

**Desenvolvimento de potenciais inibidores de ALDH1A3:
um alvo potencial no combate a células-tronco de
glioblastoma**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química

Linha de pesquisa: Síntese Orgânica/Química Medicinal

Orientador: Prof. Dr. Maurício Frota Saraiva

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Henriques Soares Leal

Itajubá – MG

2023

Emily Pacelli Moreira Linhares

**Desenvolvimento de potenciais inibidores de ALDH1A3:
um alvo potencial no combate a células-tronco de
glioblastoma**

Banca examinadora:

Prof. Dr. Maurício Silva dos Santos

Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior

Itajubá – MG

2023

DEDICATÓRIA

A Deus

que sempre está presente em todas as etapas da minha vida, mesmo quando em vários momentos me mostrei fraca na fé. Ele é o responsável por me guiar e me dar forças durante toda minha trajetória.

Aos meus pais, **Eva e Mário**

meus portos seguros, meus exemplos de vida e dedicação. Sempre abraçaram todos meus sonhos como se fossem seus, fazendo o possível e o impossível para que eu fosse feliz na escolha de estudar. Se cheguei até aqui, com certeza teve muito amor, incentivo e apoio desses dois. A eles todo meu amor e gratidão!

Ao meu marido, **Ledovan**

por me encorajar a correr atrás dos meus sonhos e me incentivar a ser uma pessoa melhor todos os dias. É ele o responsável por me reerguer em todos os momentos difíceis, sempre me fazendo enxergar o lado bom de tudo, auxiliando na minha persistência em ir atrás do futuro da nossa família. Foram muitas chamadas de vídeo e empurrões para me fazer seguir em frente. Essa vitória é nossa, cheiro!

“E pra ter você comigo, peito aberto

Ser um ombro amigo e seu abrigo

Se essa luz é tão bonita de se ver

Eu vou navegar até encontrar

Você (...)”

Gilsons

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão, **Mário** por seu meu melhor amigo e meu porto seguro. Compartilhamos toda trajetória da vida unidos e seu apoio sempre foi um dos pontos fortes para me manter em pé. Obrigada por tudo, Ju!

À minha amiga de infância, **Iriny**, que se disponibilizou em me ajudar no inglês e foi minha professora particular, auxiliando no meu desbloqueio com o idioma. Obrigada pela sua paciência e por não ter soltado minha mão até aprovação no exame de proficiência, amiguinha.

Às minhas amigas **Raniella** e **Beatriz**, que dividiram apartamento comigo durante a realização do mestrado e foram meu ponto de apoio em Itajubá. Muito obrigada, meninas! Não sei o que teria sido do meu trabalho de pesquisa se não fosse pelo incentivo e apoio de vocês.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Maurício Frota Saraiva**, pela confiança, amizade, incentivo, paciência e companheirismo durante esses quase 6 anos de convivência. Além disso, agradeço por todo conhecimento repassado que foi de suma importância para o meu desenvolvimento na área e por todo esforço em proporcionar melhores condições de trabalho para seus alunos.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Daniel Henriques Soares Leal**, pela disponibilidade em me ajudar no desenvolvimento desta pesquisa, abrindo as portas do seu laboratório, fornecendo computadores e ensinamentos das análises *in silico*. Muito obrigada pela paciência, companheirismo, confiança e, principalmente, pela colaboração intelectual e presteza em tirar minhas dúvidas ao longo deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Síntese de Moléculas Biotivas – LaSIMBio. Agradeço por todo apoio e companheirismo em meio às muitas dificuldades enfrentadas. Em especial, agradeço às alunas de iniciação científica **Maria Gabriela** e **Samirah**, que estavam vinculadas ao meu projeto e participaram ativamente na realização deste. Aos amigos **Gabriel**, **Patrícia**, **Nataly**, **Jhully**, **Carolina** e **Antônio**. A amizade de vocês foi e é muito importante para mim, este trabalho é uma conquista de todos nós! Não teria conseguido chegar até aqui sem vocês!

Ao **Dr. Érico Tosoni Costa**, do Laboratório de Biologia Tumoral do Hospital Sírio-Libanês (HSL-SP), pela realização dos ensaios biológicos dos compostos sintetizados.

À farmácia Bioflora e ao CNPq pela realização da parceria academia/indústria que culminou na minha bolsa e em todo suporte financeiro para realização da pesquisa.

Aos técnicos do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LRMN) da UNIFAL-MG e da Central Analítica da FIOCRUZ-RJ pela realização das análises de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas de alta resolução.

Ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, à Rede Mineira de Química e à UNIFEI pela infraestrutura e a oportunidade pelo título de mestre em química.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Maurício Silva dos Santos** e **Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior**, agradeço pelo tempo disponibilizado para ler e avaliar este trabalho.

*“Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais*

*Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei (...)”*

Almir Sater e Renato Teixeira

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é o tipo de tumor cerebral mais comum, o mais agressivo e letal. São poucos os tratamentos existentes e o período médio de sobrevivência é inferior a 15 meses após o diagnóstico. A permanência de subpopulações de células-tronco de gliomas (CTG's) após os tratamentos é uma descoberta recente que explica a alta frequência de recidivas e metástases deste tipo de tumor. A aldeído desidrogenase da família 1 membro A3 (ALDH1A3) é uma enzima superexpressada em CTG's que, além de ser utilizada como um biomarcador, tem sido apontada como um potencial alvo farmacológico para uma terapia seletiva e personalizada do glioblastoma visando a eliminação das células-tronco tumorais. Nesse contexto, o monoterpene citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal), apresenta-se como um produto natural promissor, pois possui a capacidade de inibir a ALDH1A3.

Palavras-chave: Células-tronco tumorais; glioblastoma; ALDH1A3; análogos do citral; síntese orgânica, *docking* molecular; U87MG.

ABSTRACT

Glioblastoma is the most common, aggressive, and lethal type of brain tumor. Few treatments exist and the median survival period is less than 15 months after diagnosis. The permanence of subpopulations of glioma stem cells (GSCs) after treatments is a recent discovery that explains the high frequency of recurrences and metastases of this type of tumor. Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3 (ALDH1A3) is an enzyme overexpressed in GSCs that has been used as a biomarker and has been also pointed out as a potential pharmacological target for a selective and personalized therapy of Glioblastoma aiming at the elimination of tumor stem cells. In this context, the monoterpene citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal), presents itself as a promising natural product, as it can inhibit ALDH1A3.

Keywords: Tumor stem cells; glioblastoma; ALDH1A3; citral analogs; organic synthesis, molecular docking; U87MG.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1. Frequência relativa de tumores cerebrais primários existentes.	1
Figura 1. 2. Células cerebrais – (1) Neurônios: formam redes de comunicação no cérebro e suas principais funções são controlar a regulação da homeostase e todas as funções do sistema nervoso; (2) Astrócitos: formam o principal tecido conectivo do cérebro; (3) Oligodendrócitos: possuem a função específica de envolver axônios do sistema nervoso com mielina; (4) Células endoteliais: possuem a função de revestir os ventrículos do cérebro e o canal central da medula; (5) Células microgliais: possuem a função de reparar e restaurar os tecidos cerebrais.	3
Figura 1. 3. Consequências bioquímicas da mutação da enzima isocitrato desidrogenase (IDH).	4
Figura 1. 4. Curva de análise de sobrevivência entre as faixas etárias.	5
Figura 1. 5. Ativação química da temozolomida em pH 7,4 e destinos in vivo dos átomos de C, H, N e O presentes na molécula.	8
Figura 1. 6. Mecanismo de metilação do DNA em um resíduo O ⁶ da guanina, pareamento de bases incompatíveis e reparo do dano pela MGMT.	9
Figura 1. 7. Componentes do microambiente tumoral, como MDSCs (células supressoras derivadas de mieloides), macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK e linfócitos. Esses componentes formam uma rede reguladora complexa que suporta o crescimento do tumor, criando um ambiente tolerogênico que permite que os cânceres evitem a vigilância imunológica e a destruição. TAN (neutrófilos associados a tumores); TAM (macrófagos associados a tumores); CAF (fibroblastos associados ao câncer).	12
Figura 1. 8. Esquema do desenvolvimento da linhagem monocítica.	13
Figura 1. 9. Células tronco mesenquimais e sua multipotencialidades.	14
Figura 1. 10. Interação entre TAM's e as células-tronco tumorais.	15
Figura 1. 11. Células-tronco tumorais e o tratamento do câncer.	16
Figura 1. 12. Interação entre CTTs e células TME. As CTTs secretam diferentes fatores para recrutar e ativar células-tronco mesenquimais (MSCs), fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células imunes infiltrantes (macrófago) para o TME. As CSCs também promovem sua própria manutenção e, portanto, são capazes de regular processos de hipóxia, vascularização, metástase e evasão da resposta imune.	18
Figura 1. 13. Conversão do retinal em ácido retinóico, catalisada pelas ALDH1A.	19
Figura 1. 14. Expressão das isoenzimas ALDH1A3 em células-tronco de gliomas, na linhagem celular U87MG e em astrócitos.	20
Figura 1. 15. O sítio de ligação do REA e as principais interações estabelecidas pelo REA com a ALDH1A3.	21
Figura 1. 16. Representação estrutural dos isômeros presentes no citral.	22
Figura 2. 1. Fluxograma dos procedimentos seguidos no método de Monte Carlo.	30

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

[M+H]⁺ – Íon molecular protonado

[M+Na]⁺ – Molécula cationizada com sódio

AC – Ácido conjugado

AIC – 5-amino-imidazol-4-carboxamida

ALDH – Aldeído desidrogenase

ASCs – Células-tronco adultas, do inglês *Adipose-derived stem cells*

Asn – Asparagina, do inglês *Asparagine*

Arg – Arginina

ATR-X - Síndrome alfa-talassemia - atraso mental, ligado ao X, do inglês *Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X*

BC – Base conjugada

BER – Reparo por excisão de base, do inglês *Base excision repair*

BHE – Barreira hematoencefálica

CAF – Fibroblastos associados ao câncer, do inglês *Cancer associated fibroblasts*

CCDS – Cromatografia de camada delgada de sílica

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

COSY – Espectroscopia de correlação, do inglês *Correlation spectroscopy*

CRABPs – Proteínas de ligação de ácido retinóico celular, do inglês *Cellular retinoic acid binding proteins*

CTTs – Células-tronco tumorais

Cys – Cisteína, do inglês *Cysteine*

d – Duplete

DCC – *N,N*-Diciclo-hexilcarbodiimida

DCM – Diclorometano

DCs – Células dentríticas, do inglês *Dendritic cell*

DEPT - Aprimoramento sem distorção por transferência de polarização, do inglês *Distortionless enhancement by polarization transfer*

DMF – *N,N*-dimetilformamida

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

DFT – Teoria do funcional de densidade, do inglês *Density functional theory*

E1cB – Eliminação unimolecular de base conjugada

ESCs – Células-tronco embrionárias, do inglês *Embryonic stem cell*

ESI – Ionização por eletrospray, do inglês *Electrospray ionization*

FDA – Administração de alimentos e medicamentos dos EUA, do inglês *Food and Drug Administration*

FT-IR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform – infrared spectroscopy*

GABA – Ácido gama-aminobutírico, do inglês *Gamma-aminobutyric acid*

GBM – Glioblastoma multiforme

GSCs – Células-tronco do glioblastoma, do inglês *Glioblastoma stem cells*

His – Histidina

HRMS – Espectrometria de massas de alta resolução, do inglês *High resolution mass spectrometry*

IDH – Isocitrato-desidrogenase

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IV – Infravermelho

J – Constante de acoplamento

Log P – Coeficiente de partição

m-RNA – RNA mensageiro, do inglês *Messenger ribonucleic acid*

m – Multiplete

m/v – Relação massa/volume

m/z – Razão massa/carga

Met – Metionina

MGMT – O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase

MMR – Reparo de mal pareamento, do inglês *Mismatch Repair*

MsCl - Cloreto de metanossulfonila

MSCs – Células-tronco mesenquimais, do inglês *Mesenchymal stem cells*

MDSCs – Células supressoras de origem mieloide, do inglês *Myeloid-derived supressor cells*

MMFF – Campo de força molecular de Merck, do inglês *Merk molecular force field*

MTIC – 5-(3-metilriazen-1-il) imidazol-4-carboxamida

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida), do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*

NADP⁺ – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida), do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*

NCSs – Células-tronco neurais, do inglês *Neural stem cells*

OMS – Organização Mundial da Saúde

p53 – Proteína supressora tumoral

Phe – Fenilalanina, do inglês *Phenylalanine*

REA – ácido retinoico, do inglês *Retinoic Acid*

RB – Retinoblastoma

R_f – Fator de retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

RTK – Receptores de tirosina quinase

RT-PCR – Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês *Reverse transcription polymerase chain reaction*

s – Simpleto

s/ – Simpleto largo

S_N1 – Substituição Nucleofílica Unimolecular

S_N2 – Substituição Nucleofílica Bimolecular

SNC – Sistema nervoso central

t – Tripleto

t.a – Temperatura ambiente

TAM – Macrófagos associados ao tumor, do inglês *Tumor-associated macrophages*

td - Tripleto distorcido

TEA – Trietilamina

TERT – Transcriptase Reversa da Telomerase, do inglês *Telomerase reverse transcriptase*

THF – Tetra-hidrofurano

Thr – Treonina, do inglês *Threonine*

TME – Microambiente tumoral, do inglês *Tumor microenvironment*

TMS – Tetrametilsilano

TMSCl – Cloreto de trimetilsilila, do inglês *Trimethylsilyl chloride*

TMZ – Temozolomida

TOF – Analisador de espectrometria de massas por tempo de voo, do inglês *Time of flight mass spectrometry*

TP53 – Gene supressor tumoral

Trp – Triptofano, do inglês *Tryptophan*

TsCl – Cloreto de *p*-toluenossulfonila

UV – Ultravioleta

δ – Deformação angular (para infravermelho)

δ – Deslocamento químico (para Ressonância Magnética Nuclear)

u – Estiramento

u_{as} – Estiramento assimétrico

u_s – Estiramento simétrico

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Síntese, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de análogos ao geranial

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Gliomas: contextualização, definições e problemáticas	1
1.1.1. Glioblastoma multiforme.....	5
1.1.1.1. Caracterização e causas	5
1.1.1.2. Tratamento.....	6
1.1.1.3. Alterações moleculares.....	10
1.2. O microambiente tumoral	10
1.3. Células-tronco	15
1.3.1. Células-tronco tumorais (CTTs)	16
1.3.2. Células-tronco tumorais e microambiente tumoral.....	17
1.4. Aldeído desidrogenase (ALDHs)	19
1.4.1. ALDHs no glioblastoma	20
1.5. Potencialidades dos terpenos na inibição da ALDH1A3: Citral	21
1.6. Como um inibidor de ALDH1A3 pode eliminar a população de células-tronco dos glioblastomas?.....	22

CAPÍTULO 2 - Análise conformacional dos compostos finais e intermediários principais, seguidos de Docking Molecular utilizando a ALDH1A3 como alvo

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Modelagem molecular: uma ferramenta essencial para o planejamento racional de fármacos em química medicinal.....	25
1.1.1 Métodos de mecânica molecular.....	25
1.1.2 Métodos de mecânica quântica.....	28
1.1.3 Análise conformacional	29
1.1.4 Método randômico de Monte Carlo	30
1.1.5 Simulações de <i>docking</i> molecular	31
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivos específicos.....	32
3. SEÇÃO EXPERIMENTAL	32
3.1 Análise conformacional	32
3.2 Protocolo de <i>docking</i> rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker	33
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	33

CAPÍTULO 1

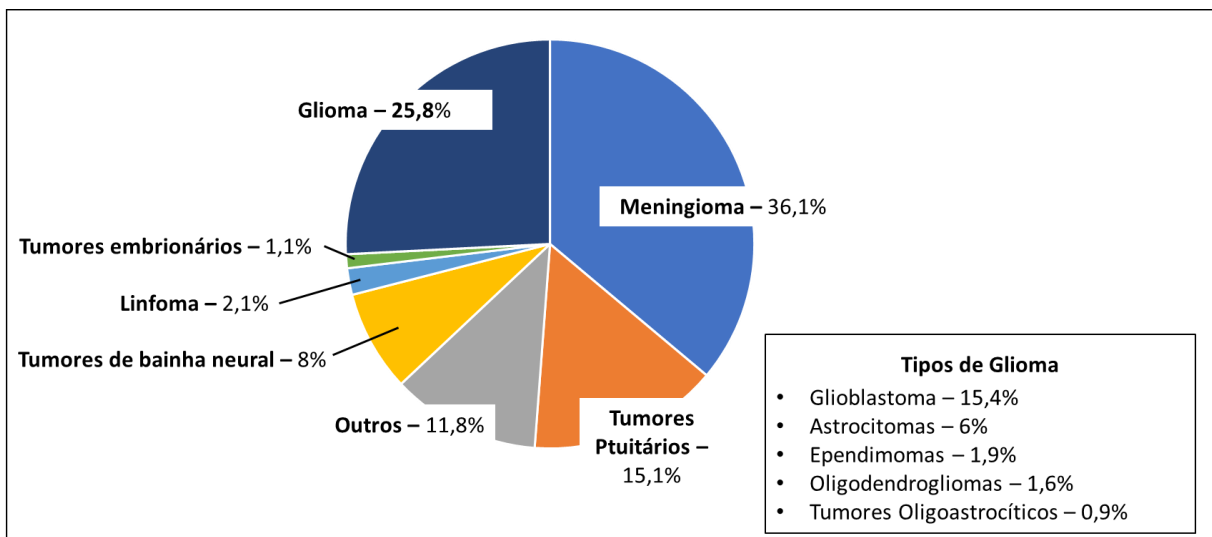
**Síntese, caracterização e avaliação da
atividade antitumoral de análogos ao
geranial**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gliomas: contextualização, definições e problemáticas

O termo glioma compreende todos os tumores do sistema nervoso central (SNC) provenientes das células da glia. Os gliomas representam um dos tipos mais comuns de tumores cerebrais primários – cerca de 26% dos casos (**Figura 1.1**), acometendo majoritariamente a população adulta no intervalo de 43-86 anos. Apesar de ser o tipo mais comum, a maior parte das lesões cerebrais neoplásicas não são oriundas dos tumores que se iniciam no tecido cerebral e sim, de metástases decorrentes de cânceres de fora do sistema nervoso (que são 5 a 10 vezes mais comuns que os tumores cerebrais primários) (AGÚNDEZ et al., 2014; STOYANOV et al., 2022; WELLER et al., 2015).

Figura 1. 1. Frequência relativa de tumores cerebrais primários existentes.



Fonte: Adaptado de Ostrom *et al.*, 2018.

Segundo a Globocan (2021), os tumores do sistema nervoso central representam cerca de 1,4 a 1,8% de todos os tumores malignos no mundo. No Brasil, para o ano de 2020, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) relatou 11.090 novos casos (sendo 5.870 homens e 5.220 mulheres) e 9.355 mortes (4.787 homens e 4.567 mulheres), indicando que este tipo de câncer tem uma alta taxa de mortalidade (FERLAY *et al.*, 2013; INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

Embora os gliomas não estejam entre os tipos de câncer de maior incidência no Brasil e no mundo, sua elevada taxa de mortalidade torna a situação preocupante. Além disso, com o aumento da expectativa de vida da população mundial, tem-se também a probabilidade de crescimento de novos casos da doença, visto que ela afeta principalmente pacientes de idade mais avançada (STOYANOV *et al.*, 2022; YABROFF *et al.*, 2012).

Os gliomas se caracterizam por serem altamente proliferativos e invasivos, com abundante vascularização, que auxiliam na resistência desses tumores aos regimes de tratamento convencionais (quimioterapia, radioterapia, cirurgia, transplante de medula óssea, terapias combinadas) (VELIZ *et al.*, 2015). A ausência ou presença de características anaplásicas, ou seja, o desenvolvimento anormal de uma célula ou tecido, é um critério para definir malignidade ou não em um tumor e, segundo definições atribuídas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua quarta edição em 2016, os tumores podem ser classificados em gliomas de grau I, sendo a forma menos agressiva, e de grau IV (a forma mais agressiva). Todavia, vale ressaltar que gliomas de baixo grau frequentemente evoluem para gliomas de maior grau (WELLER *et al.*, 2015). A seguir, encontram-se detalhadas as características dos diferentes graus clínicos do glioma:

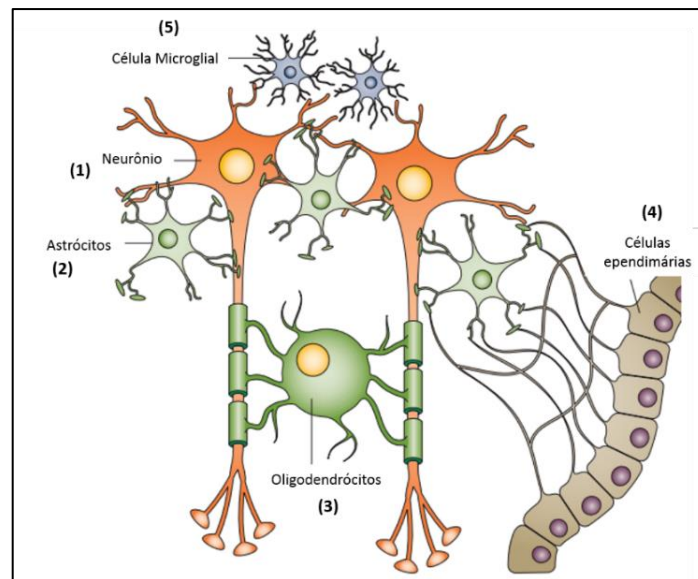
- **Grau I:** são tumores que não são considerados malignos e as suas lesões possuem baixo grau proliferativo. Após os procedimentos cirúrgicos existe uma grande possibilidade de cura.
- **Grau II:** são lesões de crescimento lento, células bem diferenciadas e de menor agressividade. Normalmente são tumores infiltrativos e possuem baixa atividade mitótica, contudo possuem uma maior chance de recorrência se comparado com os de grau I. A mediana de vida é de 5 a 15 anos.
- **Grau III:** são lesões com evidências histológicas de malignidade, alta atividade mitótica e capacidade infiltrativa. A média de sobrevida dos pacientes é de menos de 3 anos.
- **Grau IV:** são lesões caracterizadas pela alta taxa de proliferação (metodicamente ativas) com tendência a necrose. O prognóstico é grave, e os pacientes possuem sobrevida média em torno de 1 ano.

Os gliomas podem ser divididos em diferentes categorias, tendo como base suas características histopatológicas, como morfologia celular, citogenética e perfil de marcadores imunológicos. Desta maneira, os gliomas podem ser divididos em: astrocitoma de grau I, II (astrocitoma propriamente dito), III (astrocitoma anaplásico) e IV (glioblastoma multiforme ou GBM), oligodendrogliomas, ependimomas e gliomas mistos (**Figura 1.1**) (LOUIS *et al.*, 2007; VELIZ *et al.*, 2015).

Inicialmente, cientistas acreditavam que as células diferenciadas da glia (astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias) (**Figura 1.2**) possuíam a capacidade de se replicar indefinidamente para originar neoplasias correspondentes (astrocitoma, oligodendrogliomas e ependimomas). Porém, este conceito foi revisado por diversos trabalhos revelando a presença de células-tronco primitivas e células-tronco tumorais, acreditando que esses tipos

de tumores se originem a partir da proliferação destas células indiferenciadas, cuja população se distribui na zona subependimária dos ventrículos cerebrais e na camada granular dos hipocampos (CHESLER; BERGER; QUINONES-HINOJOSA, 2012; DIRKS, 2001; LATHIA *et al.*, 2015; QUIÑONES-HINOJOSA *et al.*, 2006; VICK; LIN; BIGNER, 1977).

Figura 1. 2. Células cerebrais – **(1)** Neurônios: formam redes de comunicação no cérebro e suas principais funções são controlar a regulação da homeostase e todas as funções do sistema nervoso; **(2)** Astrócitos: formam o principal tecido conectivo do cérebro; **(3)** Oligodendrócitos: possuem a função específica de envolver axônios do sistema nervoso com mielina; **(4)** Células endodimárias: possuem a função de revestir os ventrículos do cérebro e o canal central da medula; **(5)** Células microgliais: possuem a função de reparar e restaurar os tecidos cerebrais.



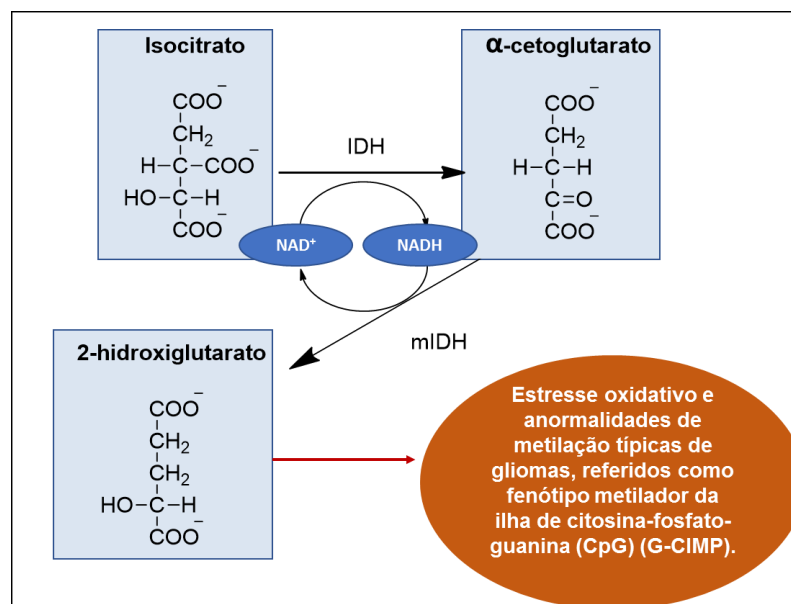
Fonte: Adaptado de Weller *et al.*, (2015).

Frente a este novo conceito e a evolução das técnicas moleculares, a quinta edição da classificação da OMS de tumores do SNC, em 2021, atualizou a proposta feita pela quarta edição em 2016, que propôs uma nova classificação para os gliomas (LOUIS *et al.*, 2016). Passam-se a utilizar parâmetros moleculares na classificação dessas doenças, somados aos critérios histológicos já bem estabelecidos. Dentre as principais alterações moleculares incluídas no diagnóstico, estão a presença de mutação na enzima isocitrato desidrogenase (IDH), a alteração do gene da TP53 e a co-deleção dos cromossomos 1p/19q (WELLER *et al.*, 2015).

- **Mutação na enzima isocitrato desidrogenase (IDH):** Gliomas de ambos os genótipos carregam mutações na IDH e essa mutação representa a alteração iniciadora de tumores da maioria dos gliomas. Esta enzima é responsável por catalisar a descarboxilação oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato, gerando NADH a partir de NAD^+ . Quando mutada, esta enzima catalisa a redução de α -cetoglutarato em (R)-(-)-2-hidroxiglutarato, sendo assim, gliomas que apresentam IDH mutante apresentam um aumento de (R)-(-)-2-hidroxiglutarato e

diminuição da produção de NADH (**Figura 1.3**). Segundo a OMS, mutações na IDH são mais comuns em gliomas de grau II e III (60-80%) do que em glioblastomas (5-10%). Contudo, apenas a mutação na IDH não é suficiente para causar o desenvolvimento de tumores. Em vez disso, células-tronco ou progenitoras neurogliais com IDH mutante necessitam adquirir modificações genéticas adicionais em astrocitomas, como por exemplo as mutações da TP53, ou em oligodendrogliomas, como a co-deleção 1p/19q (WELLER *et al.*, 2015).

Figura 1. 3. Consequências bioquímicas da mutação da enzima isocitrato desidrogenase (IDH).



Fonte: Adaptado de Weller et al., 2015.

- **Mutação no gene TP53:** O gene supressor de tumor TP53 (p53) é o responsável pela síntese da proteína p53 que controla a integridade do genoma frente a danos celulares. Esta pode atuar em várias frentes, incluindo controle do ciclo celular, reparo a mutações ocorridas no DNA e indução a morte celular (apoptose). Para os astrocitomas e os glioblastomas, esta é uma das principais vias que se encontram frequentemente alterada (MCLENDON *et al.*, 2008; MENENDEZ *et al.*, 2007; WELLER *et al.*, 2015).
- **Co-deleção dos cromossomos 1p/19q:** é definido como a mutação caracterizada pela remoção completa do segmento do braço curto do cromossomo 1 (1p), quanto do braço longo do cromossomo 19 (19q), unindo-os. Este tipo de mutação está presente em todos os Oligodendrogliomas (IDBAIH *et al.*, 2005).

Desta forma, essas características moleculares são consideradas como um avanço conceitual e prático na área da oncologia cerebral, uma vez que as alterações moleculares,

somadas com as informações da biologia tecidual dos tumores, auxiliam nos processos de diagnóstico e, conseqüentemente, tratamento mais adequado e assertivo, contribuindo para o conceito da oncologia de precisão para os tratamentos dos gliomas.

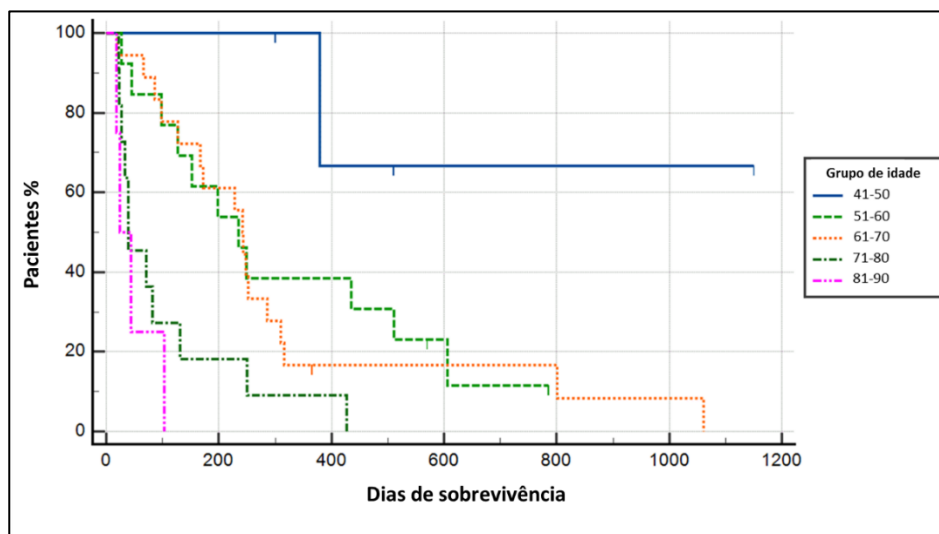
1.1.1. Glioblastoma multiforme

1.1.1.1. Caracterização e causas

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum de tumor maligno no SNC e, também, o mais agressivo (grau clínico IV segundo a classificação da OMS). É o tipo de glioma que possui a maior taxa de recidiva da doença após os tratamentos. Podem ser classificados em GBM primários ou secundários (quando surge da progressão de gliomas de baixo grau), sendo que os de origem primária constituem a forma mais comum do tumor, acometendo pacientes de maior idade, surgindo sem evidência clínica histológica de alguma lesão anterior. Contudo, os tumores secundários costumam ocorrer em pacientes mais jovens (idade média de 45 anos) (OHGAKI; KLEIHUES, 2007).

Os pacientes diagnosticados com GBM vão a óbito em aproximadamente um ano, mesmo sendo expostos aos tratamentos existentes. Um estudo realizado com pessoas diagnosticadas com a doença, com idade média de 65,3 anos, revelou que a taxa de sobrevivência em um ano após o diagnóstico é de 26%, em dois anos 8% e em três a taxa cai para 4%, sendo que enfermos mais idosos possuem tempo de sobrevivência ainda menores (**Figura 1.4**). Além disso, o estudo comprova que este tumor possui uma incidência significativamente maior em homens se comparado com as mulheres (STOYANOV *et al.*, 2022).

Figura 1. 4. Curva de análise de sobrevivência entre as faixas etárias.



Fonte: Adaptado de Stoyanov et al., 2022.

Os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do glioblastoma ainda não são totalmente elucidados e continuam sendo alvo de muitos estudos. Atualmente, compreende-se que esta doença é causada pelo somatório de várias alterações genéticas, sendo estas alterações adquiridas durante a vida, por predisposição ou exposição a fatores externos, como por exemplo, à radiação ionizante (profissionais que lidam com raios-X, pessoas submetidas a radioterapias e/ou exames excessivos de radiação), deficiência do sistema imunológico, ou ainda, possam advir de síndromes genéticas familiares (hereditariedade) (INCA, 2021).

Contudo, ainda não é bem esclarecido quais as células e como elas contribuem para a origem do glioblastoma. Como já mencionado anteriormente, até a data em questão, já foi revelado que ele pode surgir a partir de células-tronco neurais (NSCs), células progenitoras ou células diferenciadas, como astrócitos e oligodendrócitos. Para a descrição dessas informações, foram feitas observações morfológicas e dos marcadores de células, encontrando similaridades genéticas com as células neurais e gliais normais. Contudo, as células-tronco neurais tornam-se mais vulneráveis ao acúmulo de mutações que as demais, uma vez que elas possuem a capacidade de se autorrenovar e persistirem por longos períodos de tempo (FRIEDMANN-MORVINSKI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011; LLAGUNO; PARADA, 2016).

O estudo das células que originam o GBM vem recebendo cada vez mais atenção pelos cientistas, uma vez que o conhecimento da identidade da origem do tumor, estando esta associada ao grau de malignidade e à sensibilização aos fármacos, pode permitir uma intervenção contra a progressão tumoral (JIANG *et al.*, 2017).

Os sintomas apresentados por um paciente com GBM são semelhantes aos observados em pacientes com qualquer outro tumor do sistema nervoso central, contudo, são mais rapidamente progressivos. Os sintomas mais comuns são: perda de funções neurológicas, dores de cabeça, náuseas e vômitos, convulsões, dificuldade de equilíbrio, visão turva, mudanças de comportamento, sonolência acentuada e coma. Quando existe a suspeita de um tumor deste gênero, o diagnóstico é feito por exames de imagens, como ressonância magnética e tomografia computadorizada, que irão identificar o nível da lesão e se há ou não a presença de necrose. Após a identificação da lesão, procede-se com diagnósticos mais assertivos, como biópsia cerebral, que verificará as alterações teciduais e celulares encontradas no material colhido (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022; SHAW *et al.*, 2003).

1.1.1.2. Tratamento

Ao longo das décadas, os tratamentos de glioblastomas se desenvolveram centrados principalmente em remoções cirúrgicas, seguidas por radioterapia, comumente com

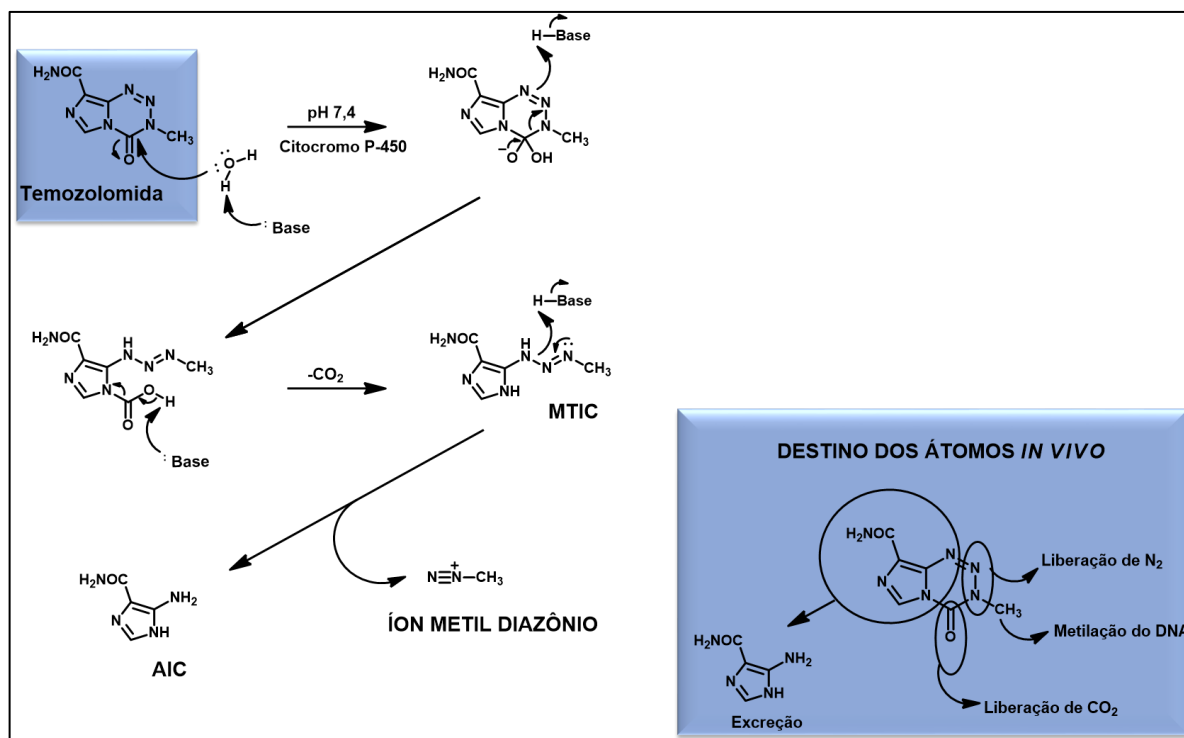
associação de agentes quimioterápicos. O procedimento cirúrgico tem como foco remover o máximo possível do tumor; porém, em algumas situações, não é viável a retirada completa das células tumorais, uma vez que o glioblastoma cresce no tecido cerebral normal e esta estratégia pode ocasionar malefícios para o paciente. Por esse motivo, recomenda-se tratamentos adicionais após a cirurgia para atingir as células residuais (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022; MAYO CLINIC, 2020).

A radioterapia no tratamento do glioblastoma avançou significativamente desde a sua primeira utilização em 1940 e, além da cirurgia, este é o tratamento que possui o maior impacto na sobrevivência de pacientes. A habilidade de focalizar o feixe da radiação ionizante, adaptando-a ao contorno irregular do tumor mostrou-se ser muito eficaz na diminuição da massa tumoral (GZELL *et al.*, 2017).

Em 2005, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a utilização do antitumoral temozolomida (TMZ) no tratamento do GBM e, desde essa aprovação, percebeu-se uma melhora ainda mais significativa na terapia. Atualmente, a combinação da radioterapia e da quimioterapia com a TMZ, após o procedimento de ressecção cirúrgica, é o tratamento mais comum utilizado para o glioblastoma multiforme (COHEN; JOHNSON; PAZDUR, 2005; MAYO CLINIC, 2020).

A TMZ é um derivado da imidazotetrazina, agente alquilante do DNA derivado da dacarbazina e um pró-fármaco do fármaco anticancerígeno Temodal®. De nome químico 3-metil-4-oxoimidazo[5,1-*d*][1,2,3,5]tetrazina-8-carboxamida, a TMZ é rapidamente absorvida por via oral e hidrolisada no fígado pelas enzimas do citocromo P450 (pH acima de 7) gerando o intermediário 5-(3-metiltriazin-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC), o qual é naturalmente degradado ao agente metilante íon metildiazônio e ao metabólito inativo 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AIC) dentro das células (**Figura 1.5**) (LEE, 2016; STEVENS, 2014).

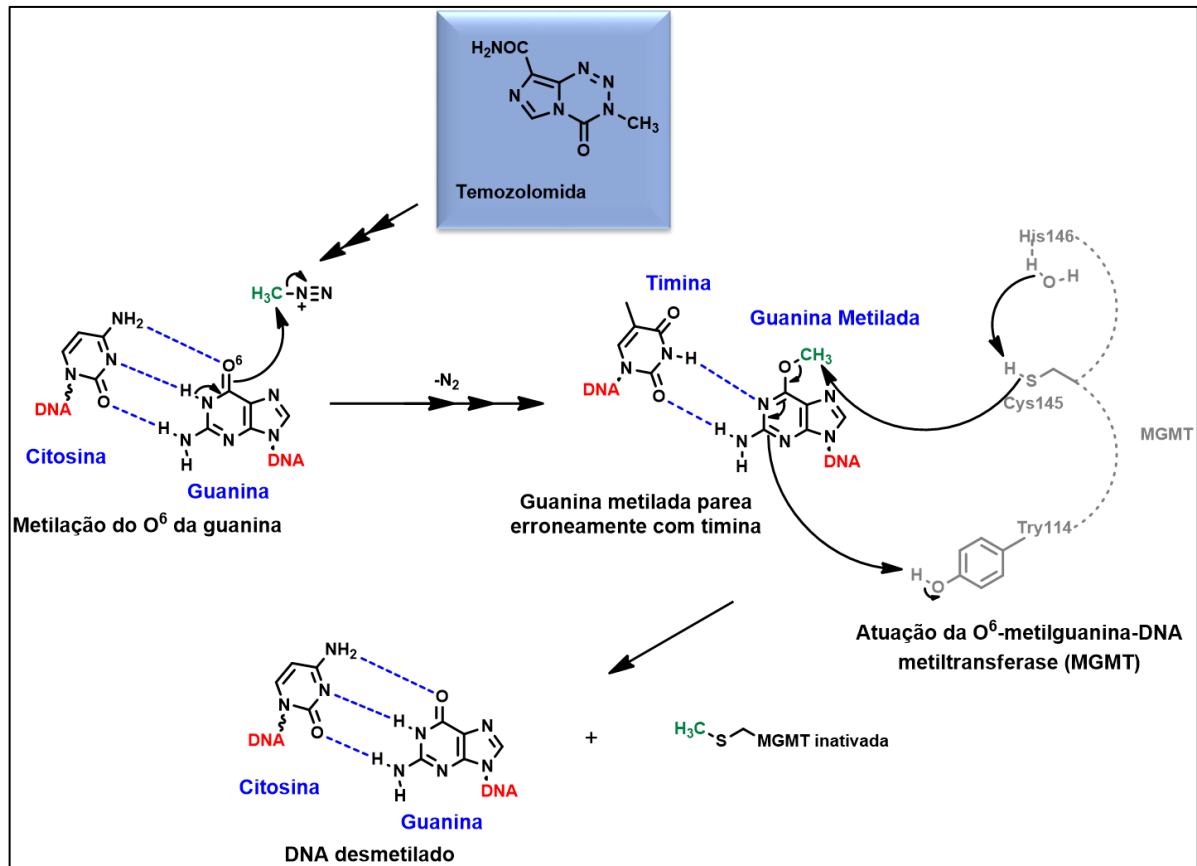
Figura 1. 5. Ativação química da temozolomida em pH 7,4 e destinos *in vivo* dos átomos de C, H, N e O presentes na molécula.



Fonte: Adaptado de Stevens 2014.

A natureza lipofílica da TMZ permite que ela penetre na barreira hematoencefálica (BHE). O mecanismo pelo qual a temozolomida interage com o DNA ocorre por meio da metilação de uma série de sítios em resíduos de purina, mais especificamente nas posições N⁷ da guanina, N³ da adenina e no O⁶ de resíduos de guanina. O íon metildiazônio (espécie eletrofílica derivada do MTIC), interage covalentemente no microambiente nucleofílico do DNA (resíduos de guanina e adenina). Todos os derivados alquilados de purinas na posição do nitrogênio são rapidamente reconhecidos e reparados pelo mecanismo de reparo por excisão de base (BER) (reparo do dano do DNA modificado), minimizando os efeitos citotóxicos de aproximadamente 95% das lesões. Já os efeitos citotóxicos causados no oxigênio dos resíduos de guanina são reparados por outro sistema, baseado na atividade da enzima O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) (**Figura 1.6**). Caso a atividade desta última enzima for inexistente ou muito baixa, a metilação no O⁶ da guanina é mantida e irá parear erroneamente com a timina durante a replicação do DNA. Porém, este pareamento incorreto pode ser reconhecido e bloqueado pelo reparo de mal pareamento (*Mismatch Repair*, MMR), que ocasionará na morte celular programada da célula. Sendo assim, percebe-se que a eficácia da TMZ é dependente da baixa ou nula atividade das enzimas MGMT e dependentes da elevada atividade de MMR (LEE, 2016; STEVENS, 2014).

Figura 1. 6. Mecanismo de metilação do DNA em um resíduo O⁶ da guanina, pareamento de bases incompatíveis e reparo do dano pela MGMT.



Fonte: Adaptado de Stevens 2014.

A elevada expressão da enzima MGMT gera um importante fator de risco para o desenvolvimento da resistência terapêutica a TMZ, uma vez que elas diminuem o efeito do agente alquilante. Segundo Lee (2016), 50% dos pacientes tratados com temozolomida não respondem ao tratamento e, com isso, percebe-se que o reconhecimento do perfil genético/presença ou não de algumas proteínas pode ser benéfico para a seleção de medicamentos mais adequados (LEE, 2016).

A TMZ é o único antitumoral existente que apresenta especificidade para o tratamento do glioblastoma primário. Como já visto anteriormente, o conhecimento dos fatores moleculares é interessante para auxiliar no diagnóstico dos gliomas e por isto, como visto acima, identificar também a presença de proteínas que realizam o reparo do DNA se torna uma estratégia interessante para evitar a utilização da TMZ de forma ineficaz (LEE, 2016).

Ademais, apesar dos efeitos benéficos do agente metilante temozolomida no tratamento do GBM, ele ainda possui algumas limitações relacionadas à sua resistência terapêutica e, com isso, apostar em antitumorais alquilantes para a doença em questão possa não vir a ser uma estratégia inovadora. Acredita-se que se deva investir em novos

antineoplásicos que consigam inibir proteínas/enzimas, seja esses fármacos atuando em alvos que realizem a mutação genética favorecendo a formação do glioblastoma (como a IDH, p53, entre outros), ou ainda, nas enzimas que realizam o reparo do DNA, como a MGMT e BER, sendo administrado juntamente com a temozolomida, tornando-a mais eficiente e os pacientes menos suscetíveis a resistência.

1.1.1.3. Alterações moleculares

O levantamento de dados moleculares gerados na última década vem revolucionando o estudo não somente do glioblastoma, como de outros tipos de tumores, contribuindo para o diagnóstico e desenvolvimento de terapias cada vez mais adequadas e inovadoras. Diversas vias centrais de sinalizações celulares vêm sendo propostas para os tumores e, para o GBM, as que se encontram alteradas são as da proteína p53, a via da proteína retinoblastoma (RB) e as vias ativadas por receptores de tirosina quinase (RTK). Como já explicado anteriormente, a proteína p53 é responsável por regular diversos genes que induzem a interrupção do ciclo celular, morte celular, diferenciação e reparo do DNA. Da mesma forma, a proteína retinoblastoma possui a função de controlar a progressão do ciclo celular e ambas estas vias agem tentando frear o processo de formação de um tumor e por isso essas proteínas são frequentemente mutadas nos processos tumorigênicos. Já as vias ativadas por receptores de tirosina quinase são responsáveis por regular diversos processos celulares que são essenciais para o desenvolvimento de um tumor, como: crescimento, apoptose, invasão e migração celular.

1.2. O microambiente tumoral

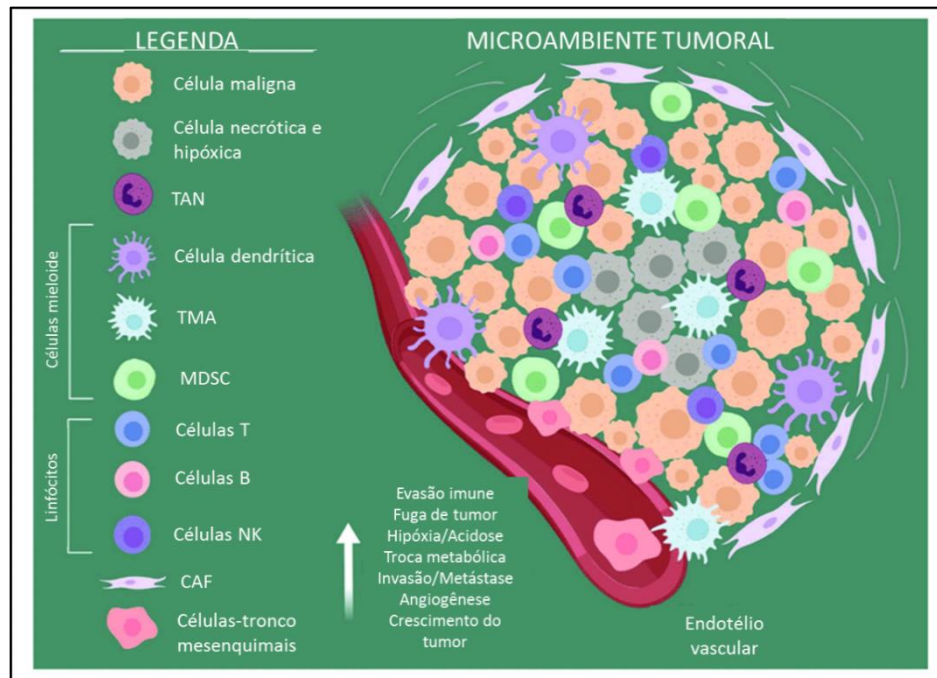
Os estudos a respeito da interação de células tumorais com células da sua vizinhança tiveram início há muitas décadas, desde a identificação de processos inflamatórios à tumorigênese. Porém, a ideia da existência de um microambiente tumoral (TME, do inglês: *Tumor microenvironment*) começou a ser amplamente discutida em 1989 pelo cientista Stephen Paget, que propôs que a preferência das metástases de um tumor por um determinado órgão seria produto de interações favoráveis entre células tumorais (“semente”) e o microambiente que ela se encontra (“solo”) (PAGET, 1989).

Pesquisas realizadas após esta proposta de Paget trouxeram à comunidade científica uma mudança na forma de pensar a respeito da evolução tumoral, na qual passou-se a entender que as células tumorais não se manifestam sozinhas. Sendo assim, tumores são definidos como uma coleção heterogênea de células hospedeiras infiltrantes e residentes, fatores secretados e matriz extracelular. As células tumorais possuem a capacidade de estimular mudanças moleculares, celulares e físicas dentro de seus tecidos hospedeiros para apoiar o desenvolvimento de um tumor (ANDERSON; SIMON, 2020; PAGET, 1989).

Acredita-se que o microambiente tumoral não seja apenas um espectador silencioso, mas sim um promotor ativo do câncer, definido como uma entidade complexa e em constante evolução. Além da presença de uma massa heterogênea de células malignas, o TME é composto também por células não-tumorais (residentes ou recrutadas pela própria célula do câncer), componentes de matriz extracelular, fatores solúveis, metabólitos diversos e condições físicas específicas (hipóxia, baixo pH ou aumento de pressão intersticial). No início do crescimento do tumor, desenvolve-se uma relação dinâmica e recíproca entre as células cancerígenas e esses componentes do microambiente, suportando a sobrevivência das células neoplásicas, invasão local e disseminação de metástases. Esta relação inclui aos tumores diversas células imunes que desempenham uma função pró e antitumoral (ANDERSON; SIMON, 2020; MAMAN; WITZ, 2018).

Dentre os componentes celulares que fazem parte do microambiente tumoral pode-se destacar, mais especificamente, as células endoteliais, células do sistema linfático, células do sistema imunológico, fibroblastos e células recrutadas da medula óssea (macrófagos, monócitos e células-tronco mesenquimais (MSCs)) (**Figura 1.7**). Algumas dessas células, em situações normais, trabalham para tentar “frear” o processo tumorigênico. Porém, uma vez que a doença começa a progredir, elas acabam sendo moduladas pelas células do tumor e, induzidas pelo microambiente tumoral, sofrem uma mudança de função, tornando-se pró tumorais. Um exemplo são os fibroblastos, que podem auxiliar na inibição do crescimento inicial do tumor e até conseguem reverter o processo neoplásico. Contudo, o processo de inflamação crônica gerada no TME acaba reprogramando-os para contribuir no crescimento dos tumores (JOYCE; POLLARD, 2008; KALLURI; ZEISBERG, 2006).

Figura 1. 7. Componentes do microambiente tumoral, como MDSCs (células supressoras derivadas de mieloides), macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células NK e linfócitos. Esses componentes formam uma rede reguladora complexa que suporta o crescimento do tumor, criando um ambiente tolerogênico que permite que os cânceres evitem a vigilância imunológica e a destruição. TAN (neutrófilos associados a tumores); TAM (macrófagos associados a tumores); CAF (fibroblastos associados ao câncer).

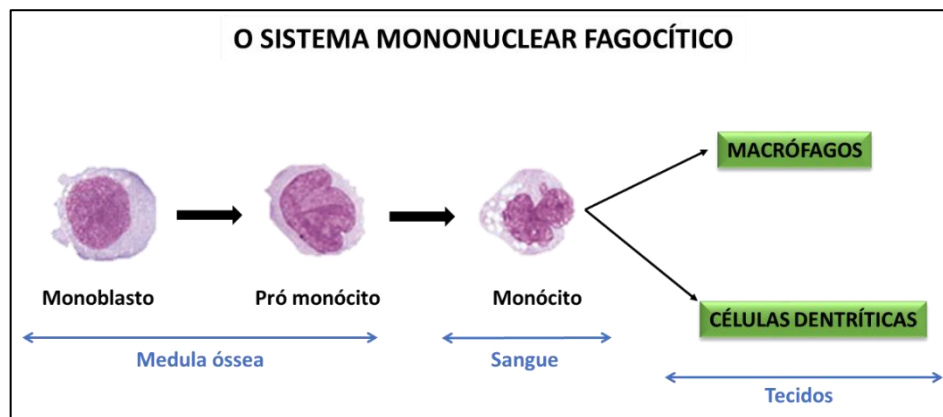


Fonte: Adaptado de Audrito *et al.*, (2019).

Além dos fibroblastos, perfis pró e antitumorais também já foram identificados em macrófagos e, para o trabalho em questão, estas são as entidades de maior interesse, uma vez que elas participam ativamente no ambiente especializado do nicho das células-tronco cancerígenas (ALLAVENA; DIGIFICO; BELGIOVINE, 2021).

Os macrófagos são formados através da medula óssea e se originam a partir dos monócitos. Esta última entidade celular possui a capacidade de circular pela corrente sanguínea até aos locais de destino, onde sofrem diferenciação e passam a desempenhar funções específicas. Pode-se dizer que os monócitos são a forma “imatura” dos macrófagos e, quando ocorre a conversão de um em outro, ocorre também o aumento do número de lisossomos, que aumenta a capacidade da célula em realizar fagocitose, atuando nos processos imunológicos (**Figura 1.8**).

Figura 1. 8. Esquema do desenvolvimento da linhagem monocítica.



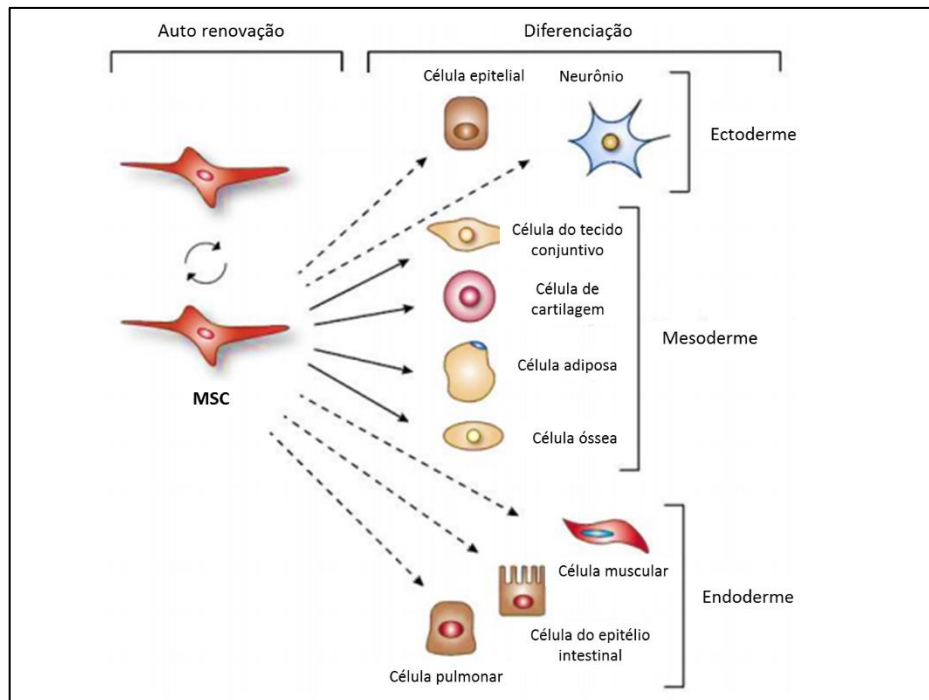
Fonte: Adaptado de Auffray et al, (2009).

Os macrófagos são células que possuem a capacidade de transitar em diferentes estados de polarização (macrófagos M1 e M2). Os do tipo M1 participam na apresentação de antígenos para montar uma resposta citotóxica contra o tumor, eles atuam no início do processo neoplásico, tentando impedir o estabelecimento do tumor. Contudo, durante a progressão dos tumores, essas células sofrem um processo de reprogramação e passam a ser do tipo M2, atuando a favor do tumor. Esse tipo de macrófago (M2) também são denominados de macrófagos associados ao tumor (TAMs) e dão suporte ao crescimento e invasão celular. Os TAMs são uma importante fonte de enzimas (proteases) que contribuem para os processos de migração e invasão através da perturbação das arquiteturas das células e tecidos, diminuindo a adesão célula-célula (CONDEELIS; POLLARD, 2006; GOCHEVA *et al.*, 2010; GOSWAMI *et al.*, 2005; POLLARD, 2004).

Para que um tumor consiga progredir é necessário que ele escape da defesa imposta pelo sistema imune, portanto, dentro do microambiente tumoral existem as células supressoras imunológicas e as principais efetoras dessa resposta são as MDSCs, que contribuem para regular o sistema imunológico e manter a homeostase frente a situações de infecção, respostas traumáticas e doenças imunes. Em situações proliferativas, essas células são recrutadas ao sítio tumoral e ativam a polarização de macrófagos associados ao tumor (tipo M2) (KUMAR *et al.*, 2016).

Além dessas células, tem-se também as MSCs (do inglês: *Mesenchymal stem cells*), que possuem a capacidade de se diferenciar em células de origem mesodérmica (células do tecido conjuntivo, cartilagens, adiposas e ósseas), ectoderma (células epiteliais e neurônios) e endoderme (células musculares, epitélio intestinal e pulmonares) (**Figura 1.9**). Elas podem ser isoladas de praticamente todos os tecidos do organismo, como: medula óssea, tendão, membrana sinovial, pulmão, tecido adiposo, rim, veia cava, aorta e músculo (PITTENGER *et al.*, 2019; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

Figura 1. 9. Células tronco mesenquimais e sua multipotencialidades.



Fonte: Adaptado de Salem et al. (2010).

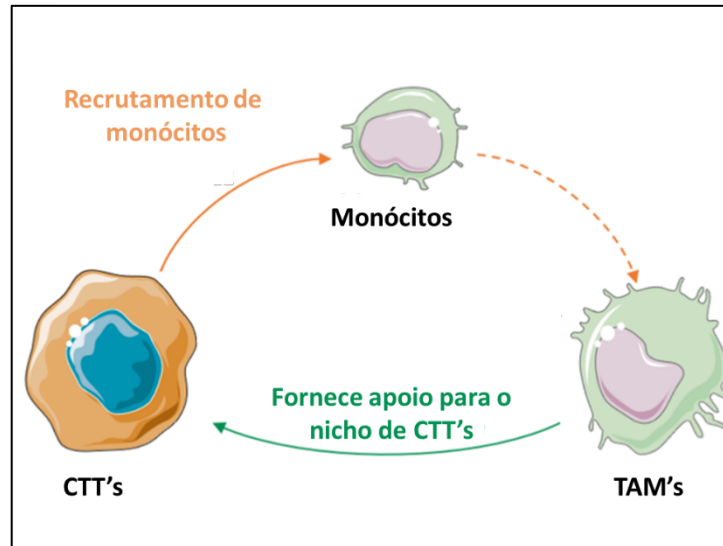
As células-tronco mesenquimais são células multipotentes que podem ser encontradas em inúmeros tumores primários. E elas vêm recebendo uma grande atenção como constituinte ativo do microambiente tumoral, uma vez que estas liberam uma gama de fatores estimuladores dos processos de angiogênese, migração celular e metástase (BECKERMANN *et al.*, 2008; ONZI *et al.*, 2016; SHAHAR *et al.*, 2017).

Até a data em questão, é de conhecimento dos cientistas que, além dos tumores serem extremamente heterogêneos por possuírem mutações, eles também são heterogêneos pela natureza complexa do microambiente tumoral. O TME muda constantemente durante a evolução tumoral e, sendo assim, vale ressaltar que o desafio de desenvolver tratamentos que o tenham como alvo não é uma tarefa simples. Porém, o reconhecimento do microambiente tumoral, somado com os conhecimentos de mutações e marcadores celulares dos glioblastomas, pode auxiliar nas pesquisas pela busca de quimioterápicos mais inovadores, como por exemplo, tratamentos com diferentes alvos do TME, visando impedir o desenvolvimento da resistência. Todavia, muitos estudos a respeito da relação entre células tumorais e seu microambiente ainda precisam ser realizados.

As células-tronco do câncer residem em um nicho de câncer que as defendem de sinais de estresse, como quimioterápicos, apoptose e radioterapias. Os TAMs interagem fisicamente com as células-tronco tumorais (CTTs), protegendo o microambiente tumoral do

ambiente hostil (injúrias exógenas, compostos tóxicos e ataque das células imunes) (**Figura 1.10**) (ALLAVENA; DIGIFICO; BELGIOVINE, 2021).

Figura 1. 10. Interação entre TAM's e as células-tronco tumorais.



Fonte: Adaptado de Allavena et al. (2021).

No glioblastoma, três microambientes principais já foram descritos: o núcleo hipóxico-necrótico, que desempenha um papel fundamental na progressão do tumor e apoio das células-tronco tumorais; o nicho perivascular, que é cercado por uma massa de vasos sanguíneos que alimentam o tumor com estrutura e função anormais, e por fim, o nicho invasivo ou nicho imunológico que possuem a função de contribuir para a recorrência do tumor após a sua remoção cirúrgica (PRAGER *et al.*, 2020; SEIDEL *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2021).

1.3. Células-tronco

Entende-se como células-tronco as células capazes de se autorrenovar e se diferenciar, dando origem a outras células especializadas. Neste contexto, elas podem ser divididas em células tronco embrionárias (ESCs), que são obtidas durante o estágio embrionário, e as células-tronco adultas ou somáticas (ASCs), que advêm de tecidos adultos e formados. O trabalho em questão irá focar apenas nas características das ASCs, uma vez que estas se encaixam no escopo da pesquisa.

As ACSs são células multipotentes encontradas em tecidos e órgãos adultos desenvolvidos. Elas possuem a capacidade de se diferenciar em muitos tipos celulares distintos, com a função fisiológica de manter a integridade de órgãos e tecidos, como também reparar possíveis danos aos mesmos, auxiliando na manutenção da homeostase do organismo. Essas células podem ser divididas em: células-tronco hematopoiéticas (células-

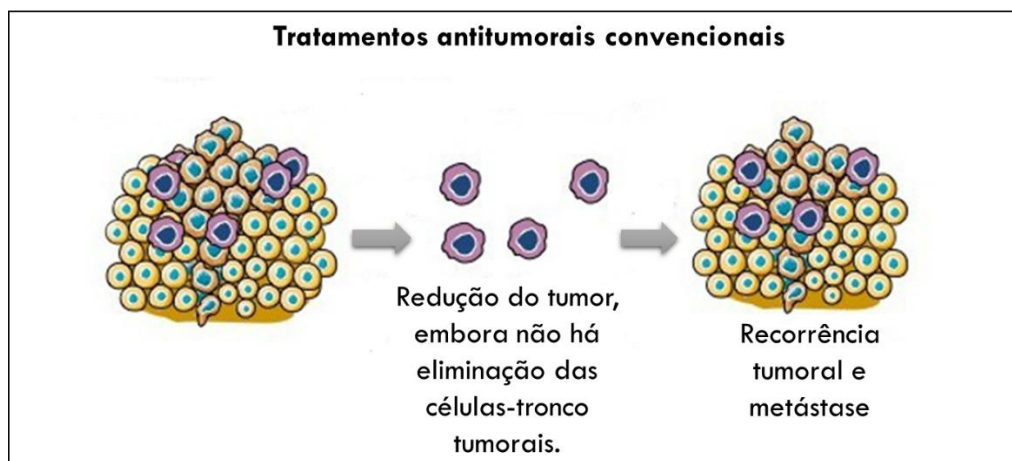
tronco do sangue); células-tronco mesenquimais (MSCs); células-tronco neurais (NSCs) e células-tronco epiteliais (CLEVERS; WATT, 2018; UNIVERSITY OF NEBRASKA MEDICAL CENTER, 2022).

1.3.1. Células-tronco tumorais (CTTs)

Ao longo dos anos, diversas teorias têm sido propostas para explicar a origem do câncer. Recentemente, estudos revelaram que nem toda célula tumoral é capaz de iniciar um processo tumorigênico, somente uma subpopulação das células cancerosas, denominadas de células-tronco tumorais (CTTs) possuem essa capacidade. Estas células apresentam semelhança com as células-tronco normais e são as únicas capazes de gerar um tumor idêntico ao original (KOBAYASHI; DE NORONHA, 2015).

É definido como células-tronco tumorais uma subpopulação de células neoplásicas que possuem a capacidade de se autorrenovar, gerando novas linhagens de células tumorais. Elas permanecem “adormecidas” na fase de interfase do ciclo celular por períodos indefinidos, sendo, portanto, capazes de escapar dos protocolos de tratamentos convencionais (quimioterapia, radioterapia e cirurgia) (**Figura 1.11**) (PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; VASCONCELLOS, 2016).

Figura 1. 11. Células-tronco tumorais e o tratamento do câncer.



Fonte: Modificada de (GELARDI . *et al.*, 2021).

Esta capacidade de autorrenovação das CTTs pode provocar a ativação, diferenciação e proliferação das mesmas, ocasionando processos de reincidências tumorais e metástases que, segundo a OMS, é a principal causa de morte por câncer (VASCONCELLOS, 2016; WHO | WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Estudos revelaram que, até a data atual, são 11 os tipos de câncer onde foi identificado a presença da população de células-tronco tumorais: leucemia, câncer colorretal,

glioblastoma, melanoma, câncer de mama, próstata, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, fígado e ovário (KOBAYASHI; DE NORONHA, 2015; MIMEAULT *et al.*, 2007; WALCHER *et al.*, 2020).

Para identificar a presença de células-tronco tumorais nos tumores é necessário o uso de biomarcadores específicos que analisam diversos parâmetros celulares que permitem a detecção das CTTs, como: o fenótipo, a senescência e a composição do microambiente tumoral dessas células. Para o glioblastoma multiforme, até a data em questão, foram identificados 10 biomarcadores: CD133, CD44, CD15, CD70 (CD27 L), S100A4, ALDH1, Nanog, OCT-4, SOX-2 e Nestin (HASSN MESRATI *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2021; WALCHER *et al.*, 2020).

Acredita-se que a heterogeneidade e a resistência à terapia que caracterizam os glioblastomas sejam promovidas pelas populações destas células e, atualmente, elas são conhecidas como células-tronco do glioblastoma (GSCs). Como visto anteriormente, o glioblastoma possui três nichos no microambiente tumoral e, cada um deles, serve como um atrator único para as GSCs. As interações destes nichos podem ser cruciais para manter a amplitude de estados que estas populações de células podem ocupar, promovendo a heterogeneidade do tumor, conferindo uma resistência terapêutica devastadora para a doença (HAMBARDZUMYAN; BERGERS, 2015; PRAGER *et al.*, 2020).

Para o glioblastoma, tem-se conhecimento de dois subtipos principais células-tronco de gliomas, proneurais e mesenquimais, sendo que cada uma expressa fenótipos e assinaturas moleculares distintas (LI *et al.*, 2021).

1.3.2. Células-tronco tumorais e microambiente tumoral

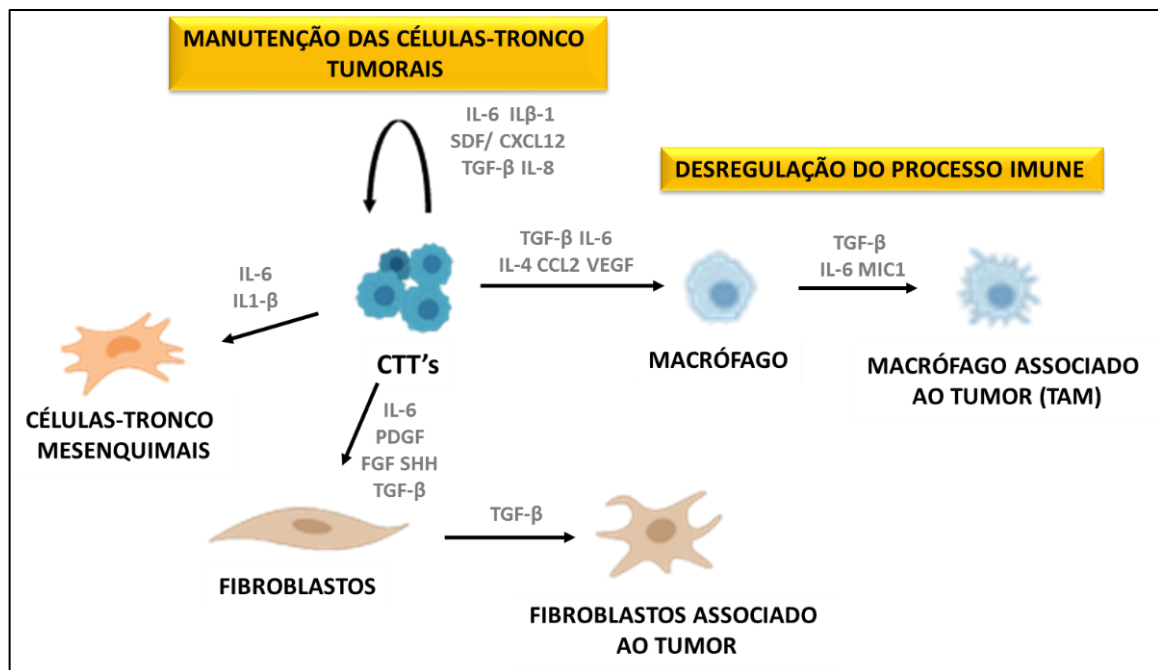
Um estudo realizado por López de Andrés e colaboradores (2020) com um secretoma de células-tronco cancerígenas revelou que o fenótipo dessas células depende do microambiente tumoral, que envolve diferentes tipos celulares, como células tumorais diferenciadas, células-tronco mesenquimais, células endoteliais, fibroblastos, células do sistema imunológico, entre outras, demonstrando uma relação mútua entre as CTTs e essas entidades celulares.

Define-se como secretoma todas as moléculas que são secretadas por uma célula, ou liberadas por sua membrana, que é fundamental para a comunicação célula-célula. Apesar da literatura definir este termo apenas pela fração proteica das células, os componentes não proteicos também foram incorporados nesta definição, como: lipídeos, RNAs mensageiros e micro RNAs isolados ou secretados via corpos vesiculares. Este estudo mostra evidências crescentes que as CTTs regulam diferentes características tumorais, como angiogênese,

crescimento tumoral, metástase, resistência aos fármacos e desregulação imune através do seu secretoma. As CTTs possuem a capacidade de regular várias características do câncer por meio da sua interação com as células do TME, liberando uma infinidade de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, hormônios e metabólitos (que estão representados em cinza na figura 1.12) (LÓPEZ DE ANDRÉS *et al.*, 2020).

Sendo assim, as células-tronco tumorais possuem a capacidade de recrutar para o nicho tumoral as células-tronco mesenquimais, os fibroblastos e os macrófagos e, uma vez no microambiente tumoral, essas entidades são ativadas para favorecer o processo tumorigênico. As MSCs atuam auxiliando na modulação da vascularização do nicho tumoral, os fibroblastos se diferenciam em fibroblastos associados ao tumor, apoiando a manutenção tumoral e metástase e, por fim, as CTTs ativam os macrófagos associados ao tumor, conduzindo a evasão da resposta imune (**Figura 1.12**) (LÓPEZ DE ANDRÉS *et al.*, 2020).

Figura 1. 12. Interação entre CTTs e células TME. As CTTs secretam diferentes fatores para recrutar e ativar células-tronco mesenquimais (MSCs), fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e células imunes infiltrantes (macrófago) para o TME. As CSCs também promovem sua própria manutenção e, portanto, são capazes de regular processos de hipóxia, vascularização, metástase e evasão da resposta imune.



Fonte: Adaptado de López de Andrés *et al.* 2020.

Desta forma, terapias que tem como alvo apenas as células de proliferação tumoral, podem resultar em tratamentos que não sejam eficazes, não conduzindo a total erradicação das células cancerígenas. Portanto, para uma terapia eficaz torna-se necessário a utilização de tratamentos combinados, direcionados ao microambiente tumoral, que sejam capazes de

interferir no funcionamento das CTTs, tentando atingir alguns dos mecanismos de evasão dos tumores ao tratamento.

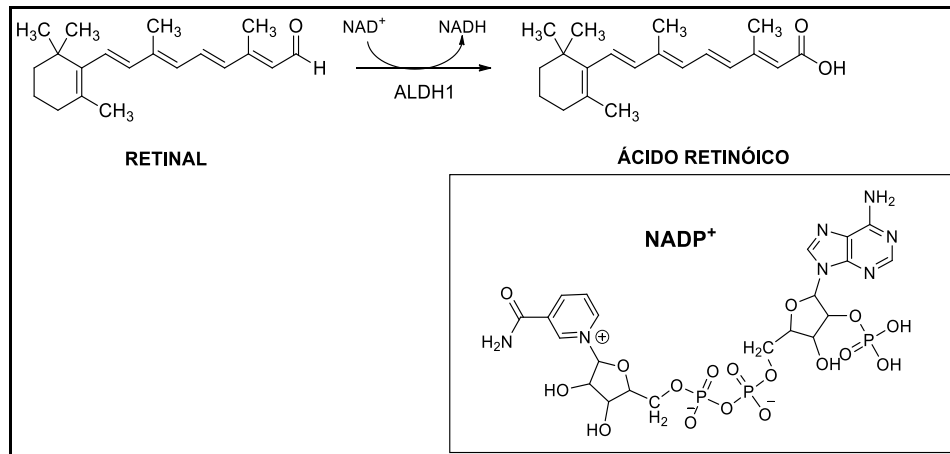
Para que se possa elaborar uma proposta terapêutica considerando todo o TME, acredita-se que seja necessária uma compreensão dos marcadores de células-tronco tumorais bem como de suas relações com essas células e com o TME.

1.4. Aldeído desidrogenase (ALDHs)

A superfamília de aldeído desidrogenases (ALDHs) consiste em 19 isoenzimas diferentes que são conhecidas por diminuir o estresse causado por aldeídos. Elas possuem o papel de converter aldeídos em seus respectivos ácidos carboxílicos, utilizando NAD^+ como cofator. Esta família de isoenzimas é fundamental para a biossíntese dos principais reguladores metabólicos da homeostase celular, como o ácido retinóico (AR), ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina e betaína (GELARDI, EDOARDO L.M. *et al.*, 2021; MORETTI *et al.*, 2016).

No trabalho em questão envolve pesquisas relacionadas a aldeído desidrogenase da família 1 (ALDH1), que é composta por três isoformas diferentes (ALDH1A1, ALDH1A2 e ALDH1A3), que estão envolvidas na conversão do retinal em ácido retinóico (AR) (**Figura 1.13**) (GELARDI *et al.*, 2021).

Figura 1. 13. Conversão do retinal em ácido retinóico, catalisada pelas ALDH1A.



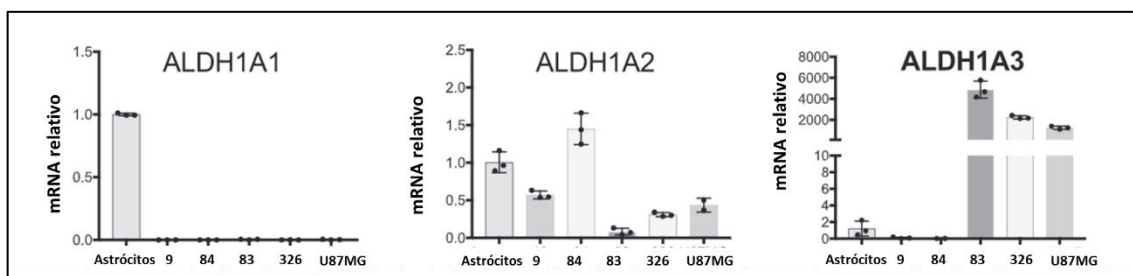
Nas últimas décadas, durante a busca por biomarcadores de células-tronco do câncer, descobriu-se que durante a proliferação dessas células ocorre uma super expressão das isoenzimas ALDH1A. Assim, esta subfamília foi destacada como um potencial biomarcador de CTTs em vários tipos de tumores, como: glioblastoma, colorretal, câncer pancreático, câncer de mama, leucemia, câncer de fígado e de pulmão. Desta subfamília, a isoforma ALDH1A3 é a mais expressada dentre as demais (ALDH1A1 e ALDH1A2) (GELARDI, EDOARDO L.M. *et al.*, 2021; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2014; THOMAS *et al.*, 2016).

Segundo Duan et al. (2016), a super-expressão da isoforma ALDH1A3 acontece em uma variedade de tumores com a presença de CTTs. Nesse contexto, estudos demonstram que fármacos capazes de inibir seletivamente a ALDH1A3 podem vir a ser uma estratégia interessante para diminuir a população de células-tronco tumorais, fornecendo um novo caminho de intervenção terapêutica para o tratamento do câncer (DUAN *et al.*, 2016; GELARDI, EDOARDO L.M. *et al.*, 2021; MORETTI *et al.*, 2016; THOMAS *et al.*, 2016).

1.4.1. ALDHs no glioblastoma

Uma análise quantitativa de RT-PCR para medir o nível de expressão de mRNA de 19 isoformas de ALDH em astrócitos humanos, células U87MG (linhagem celular de glioblastoma multiforme) e células-tronco do glioblastoma (GSC-19, GSC-84, GSC-83 e GSC-326), revelou que a isoforma ALDH1A3 é a mais expressada da família 1A, em algumas dessas linhagens (Figura 1.14) (LI et al., 2021).

Figura 1. 14. Expressão das isoenzimas ALDH1A3 em células-tronco de gliomas, na linhagem celular U87MG e em astrócitos.



Fonte: Adaptado de LI et al. (2021).

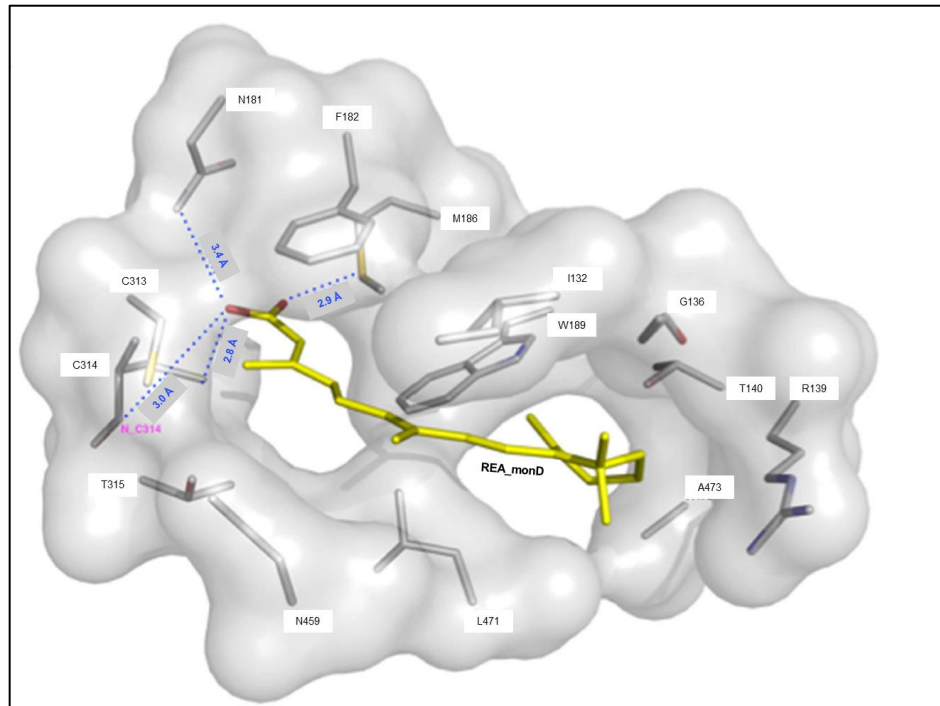
Além disso, este estudo revelou que a supressão da expressão da ALDH1A3, a partir de um candidato a inibidor, diminuiu drasticamente a produção de ácido retinóico e consequentemente, afetou o crescimento das GSCs, sugerindo que esta isoenzima é um alvo em potencial para o tratamento deste tipo de glioma (LI et al., 2021).

Contudo, um grande desafio que se deve levar em consideração durante o desenvolvimento de inibidores seletivos para uma isoenzima individual de ALDH é a alta similaridade de sequência entre essas isoenzimas. São 19 isoenzimas da superfamília ALDH, cada qual com as suas características bioquímicas e genéticas. Essa falta de seletividade dos inibidores atuais torna difícil evitar a inibição de uma isoenzima ALDH sem afetar as outras, causando efeitos adversos não desejados. No entanto, quando se tem informações e conhecimentos sobre a caracterização bioquímica de cada isoenzima, torna-se possível desenvolver inibidores mais seletivos e adequados.

Em um estudo cristalográfico da ALDH1A3 complexada com o ácido retinóico, juntamente com resultados de testes *in silico* que mapearam o sítio ligante desta isoenzima,

revelou-se que, neste sítio, existem resíduos de cisteína (Cys314) capazes de se ligar à carbonila do ácido retinóico por ligação de hidrogênio. Ademais, o sítio apresenta uma elevada superfície hidrofóbica, capaz de interagir com porções lipofílicas do RA (**Figura 1.15**) (MORETTI et al., 2016).

Figura 1. 15. O sítio de ligação do REA e as principais interações estabelecidas pelo REA com a ALDH1A3.



Fonte: Adaptado de Moretti et al., 2016.

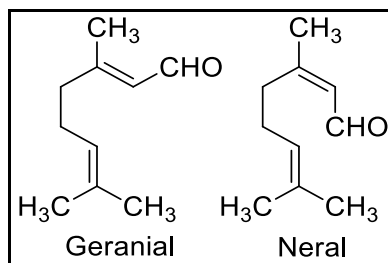
Em outro estudo realizado com um possível inibidor dessa enzima revelou-se que, para inibir a isoforma ALDH1A3 de forma seletiva, é necessário planejar compostos levando em consideração a possível interação por ligação de hidrogênio aos resíduos Cys314 e Thr315 (que atuam como doadores de ligação de hidrogênio) e a existência no sítio de dois bolsos hidrofóbicos próximos ao túnel de acesso ao substrato (LI et al., 2021).

1.5. Potencialidades dos terpenos na inibição da ALDH1A3: Citral

O Citral ($C_{10}H_{16}O$) ou 3,7-dimetilocta-2,6-dienal, é uma mistura dos dois estereoisômeros geranial (isômero *E*) e neral (isômero *Z*) (**Figura 1.16**), de coloração amarelo pálido e que apresenta um forte odor de limão. Este composto pode ser encontrado em óleos essenciais como os de frutas cítricas, capim-limão e gengibre e, no que se refere às suas aplicabilidades farmacológicas, ele tem demonstrado efeitos promissores, como: antibacteriano, antitumoral e anti-inflamatório (SHARMA et al., 2019; SILVA et al., 2019; TAMER; SUNA; ÖZCAN-SINIR, 2019).

O geranial e o neral podem ser obtidos em bons rendimentos a partir de reações de oxidação dos respectivos álcoois monoterpênicos geraniol e nerol utilizando dióxido de manganês (SILVA *et al.*, 2022).

Figura 1. 16. Representação estrutural dos isômeros presentes no citral.



Um estudo *in vitro*, realizado por Thomas et al. (2016), revelou uma interessante atividade do citral em inibir a isoenzima ALDH1A3 em células de câncer de mama (MDA-MB-231). Além disso, o tratamento com o terpeno resultou na inibição direta de crescimento do tumor de mama, mas não prejudicou as células saudáveis. Sendo assim, este estudo revelou que o citral pode ser considerado como um composto promissor para o tratamento do câncer, uma vez que atuou reduzindo a massa tumoral, a população de CTTs e preservou a integridade das células saudáveis (THOMAS et al., 2016).

Com os conhecimentos sobre o sítio ligante da ALDH1A3, e devido à semelhança estrutural com o substrato retinal, acredita-se que o citral possa estar inibindo esta isoenzima por meio de uma inibição competitiva com o retinal. A carbonila presente no citral pode interagir com os resíduos de cisteína e a porção hidrofóbica das unidades isoprênicas pode preencher parcialmente o “bolsão hidrofóbico” presente no sítio ligante do ácido retinóico. Portanto, acredita-se que, baseado no conhecimento do potencial sítio ligante para o citral acrescido de novos estudos teóricos aliados à abordagem do design de análogos, seja possível planejar modificações na estrutura do citral, mais especificamente do geranial, com o intuito de aumentar sua ação antiproliferativa por meio da inibição da ALDH1A3.

1.6. Como um inibidor de ALDH1A3 pode eliminar a população de células-tronco dos glioblastomas?

Como visto ao longo deste trabalho, as células-tronco tumorais são a principal força motriz responsável pela recorrência de um tumor e pela resistência à terapia. Sendo assim, direcionar pesquisas para a eliminação desta subpopulação celular com o intuito de remover a capacidade de recidiva de um tumor pode ser uma estratégia terapêutica promissora.

O marcador de células-tronco tumorais ALDH1A3 é responsável por catalisar a reação de oxidação do aldeído retinal para o ácido retinoico (AR). Entre as aldeído desidrogenases catalisadoras dessa reação, no glioblastoma, a isoenzima ALDH1A3 é a que está presente

em maiores concentrações, revelando que em uma situação proliferativa ela é super expressada no meio celular, portanto, uma maior concentração de ácido retinóico é produzida no meio (LI et al., 2021).

Alguns estudos vêm revelando que a isoenzima ALDH1A3 pode ser um alvo interessante para eliminação de células-tronco tumorais, uma vez que ela está diretamente ligada com a permanência e sobrevivência dessas células (GELARDI et al., 2021; LI et al., 2021; MORETTI et al., 2016).

As células-tronco tumorais recrutam componentes do microambiente tumoral, como fibroblastos associados ao câncer, macrófagos associados ao tumor e células-tronco mesenquimais, criando uma rede de comunicação, auxiliando na proliferação e resistência do tumor frente aos tratamentos antitumorais existentes. Ademais, um estudo realizado por Samir Devalajara e colaboradores (2020) revelou que o TME induz células tumorais a produzirem mais ácido retinóico, explicando o motivo de uma maior concentração de ALDH1A3. O AR produzido irá polarizar a diferenciação de monócitos intratumorais em direção aos macrófagos associados ao tumor (TMAs) e para longe das células dendríticas (DCs), impedindo, portanto, a atuação do sistema imune naquela microrregião tumoral, contribuindo para a proliferação das células tumorais (DEVALARAJA *et al.*, 2020).

Neste mesmo estudo, comprovou-se por análise do perfil de expressão gênica que os macrófagos associados ao tumor expressam mais proteínas de ligação de ácido retinóico celular (CRABPs). Portanto, a necessidade de uma maior “produção” de ácido retinóico e o motivo de se ter uma elevada expressão de ALDH1A3.

O citral possui a capacidade de inibir a enzima ALDH1A3 em células do câncer de mama, e acredita-se que análogos deste composto, com as estruturas necessárias para interação com o sítio ligante (carbonila para interagir com resíduos de cisteína e porções lipofílicas) possam ser possíveis inibidores da isoenzima. Ao inibi-la, impede-se a formação de ácido retinóico no meio celular e, sendo assim, altera-se a polarização que este composto realiza para a produção de TAMs, impedindo que esses macrófagos do tipo M2 realizem suas funções pró tumorais de proteção das células-tronco tumorais dos tratamentos anticancer existentes.

Portanto, acredita-se que uma terapia combinada de um inibidor de ALDH1A3, somados aos tratamentos de glioblastoma existente (temozolomida, radioterapia e cirurgia) pode vir a ser uma estratégia eficaz para eliminação das células-tronco de gliomas, contribuindo para uma maior expectativa de vida do paciente oncológico.

CAPÍTULO 2

Análise conformacional dos compostos finais e intermediários principais, seguidos de *Docking* Molecular utilizando a ALDH1A3 como alvo

1. INTRODUÇÃO

1.1 Modelagem molecular: uma ferramenta essencial para o planejamento racional de fármacos em química medicinal

A busca por novas substâncias que sejam capazes de fornecer efeito farmacológico no organismo humano está presente desde os primórdios da humanidade e, atualmente, é uma tarefa constante na medicina. Diversas pesquisas são realizadas no mundo inteiro, nos mais diferentes âmbitos farmacológicos, fazendo com que, todos os anos, novos fármacos sejam introduzidos no arsenal terapêutico. O avanço da tecnologia permitiu a introdução de metodologias computacionais que auxiliam na descoberta de novos fármacos de uma forma mais racional, possibilitando encontrar estruturas mais específicas, com uma menor toxicidade e maior eficácia.

A modelagem molecular é um conjunto de técnicas utilizadas para investigar as estruturas e suas propriedades moleculares através da química computacional, incluindo construção, edição, visualização e, por fim, análises de sistemas moleculares que possam ser essenciais no planejamento de compostos bioativos. Esta técnica permite o estabelecimento de um modelo que descreve as interações entre enzima e substrato (ou inibidor) ou entre um receptor e bioligantes (agonista/antagonista). Este modelo é definido em termos matemáticos, em que é possível descrever ou representar um processo ou sistema envolvendo estruturas moleculares, bem como realizar cálculos e previsões de propriedades a elas associadas (BARREIRO *et al.*, 1997; LEAL, 2003; SANT'ANNA, 2009).

Os métodos utilizados na modelagem molecular para análise de estruturas, bem como de processos e/ou sistemas, compreendem os métodos de mecânica quântica e de mecânica molecular, estando a diferença entre eles relacionada fundamentalmente no tratamento matemático dado aos conjuntos atômicos, envolvendo núcleos e eletrosferas (LEAL, 2003).

1.1.1 Métodos de mecânica molecular

O método de mecânica molecular é um dos mais utilizados em modelagem molecular, devido à simplicidade e menor demanda de tempo computacional. Nele “ignoram-se” os elétrons e considera-se apenas a posição relativa dos núcleos dos átomos que formam uma estrutura determinada por uma função de interação, que tem origem nas forças de repulsão e atração que operam na estrutura. A soma de todas as energias de forças repulsivas e atrativas entre os átomos de uma estrutura corresponde à energia potencial total de uma molécula, o que faz com que a mecânica molecular também seja conhecida como o método dos campos de força (SHEN; YANG, 2018).

Um campo de forças pode ser definido, mais precisamente, como uma coleção de equações que envolvem parâmetros energéticos que descreve diferentes classes de moléculas com uma precisão razoável, e a confiabilidade nos cálculos de mecânica molecular depende de funções de energia potencial das contribuições estruturais como, comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos torsionais, distância de van der Waals e interações eletrostáticas. A soma de todas essas contribuições é definida como a energia potencial total (ou energia estérica) da molécula (E_T) (**Equação 1**) (BARREIRO *et al.*, 1997; LEACH, 1996; LEAL, 2003; VANOMMESLAEGHE; GUVENCH; MACKERELL, 2014).

$$E_T = E_{axi} + E_{ang} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{ele} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

E_{axi} = energia de deformação axial de ligação (energia covalente);

E_{ang} = energia de deformação angular (energia covalente);

E_{tors} = energia de torção de ligação (energia covalente);

E_{vdw} = energia de interações de Van de Waals (energia não covalente);

E_{ele} = energia de interações eletrostáticas (energia não covalente).

Das energias mencionadas anteriormente, deduz-se que, àquela associada à deformação axial de ligação tem seus fundamentos formados a partir da lei de Hooke (usada para calcular o módulo de força elástica), onde considera-se a somatória de todas as ligações presentes na molécula (**Equação 2**) (LEAL, 2003).

$$E_{axi} = \sum \frac{K_{est} (r-r_0)^2}{2} \quad \text{Equação 2}$$

onde:

K_{est} = constante de força do estiramento da ligação;

r = comprimento da ligação;

r_0 = comprimento da ligação livre de tensão.

Para a energia de deformação angular, segue-se os mesmos parâmetros do cálculo de deformação axial de ligação. Todavia, considera-se a formação de um ângulo θ entre três átomos ligados em sequência (**Equação 3**) (LEAL, 2003).

$$E_{ang} = \sum \frac{K_{ang} (\theta-\theta_0)^2}{2} \quad \text{Equação 3}$$

Quando se tem quatro átomos ligados em sequência, formam-se os ângulos torcionais (ω) e a energia de torção de ligação está relacionada à dificuldade existente na rotação em torno de uma ligação, que ocorre devido a fatores de impedimentos estéricos. A **equação 4** representa a forma de calculá-la.

$$E_{\text{tors}} = \sum \frac{K_{\text{tors}} (1 \pm \cos n \times \omega)}{2} \quad \text{Equação 4}$$

onde:

K_{tors} = constante de força da torção da ligação;

n = periodicidade;

ω = ângulo torsional.

Os átomos, quando muito próximos um do outro, sem a formação de ligações químicas, são influenciados pelas energias de repulsão, ocasionando em um aumento de energia potencial e desfavorecendo a estabilidade molecular. Contudo, quando muito afastados, esta situação também se torna desfavorável, uma vez que ocorre o rompimento das interações dipolo-induzidas que mantem a atração mútua entre eles. Estes processos afetam diretamente a energia potencial total da molécula e são levados em consideração no cálculo em questão. Esta energia é denominada como energia de Van der Waals e o cálculo mais comumente utilizado é o potencial de *Lennard-Jones* (**Equação 5**) (HÖLTJE *et al.*, 2008).

$$E_{\text{vdw}} = \sum_i \sum_j \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad \text{Equação 5}$$

onde:

A_{ij} = coeficiente do termo repulsivo;

B_{ij} = coeficiente do termo atrativo;

r_{ij} = distância entre dois átomos i e j não-ligados.

Tratando somente de hidrocarbonetos, as contribuições anteriores já são suficientes para definir a energia potencial da molécula. Porém, quando se tem estruturas de outros grupos funcionais, deve-se considerar as interações entre as cargas, quando elas estiverem presentes. A energia responsável por esta característica é a de interações eletrostáticas, que é descrita pela **equação 6**:

$$E_{\text{ele}} = \sum_{ij} \frac{1}{4\pi\epsilon} \times \frac{q_i \times q_j}{r_{ij}} \quad \text{Equação 6}$$

onde:

ϵ = permissividade do meio;

q_i e q_j = cargas dos átomos i e j ;

r_{ij} = distância interatômica entre i e j .

Os resultados da mecânica molecular são de fácil compreensão, uma vez que se referem à diferença de energias entre diferentes geometrias de uma mesma estrutura e podem ser tão precisos quanto os de mecânica quântica. Todavia, deve-se sempre ter em mente que os resultados fornecidos por esta técnica não consideram a parte eletrônica da molécula. Sendo assim, critérios rígidos de avaliações devem ser adotados para verificar a veracidade dos resultados fornecidos (BARREIRO *et al.*, 1997; LEACH, 1996).

1.1.2 Métodos de mecânica quântica

Os métodos da mecânica quântica, diferente da mecânica molecular, consideram a população eletrônica da molécula nos cálculos, sendo a energia obtida por meio de equações da mecânica ondulatória, que remontam à equação de Schrodinger, considerando as características ondulatórias dos elétrons no cálculo de energia total do sistema (CRAMER, 2007). Sendo assim, com os cálculos de mecânica quântica é possível obter propriedades que levam em consideração a distribuição eletrônica, tornando os resultados cada vez mais próximos da realidade. Contudo, estes cálculos consomem muito mais tempo, uma vez que levam em consideração todos os elétrons da molécula, que são descritos por múltiplas funções de base e, sendo assim, podem apresentar certas limitações em determinadas análises. Dois métodos principais possuem utilidade em química computacional para fornecer parâmetros quânticos:

- Métodos *ab initio*: são aqueles que apresentam a principal abordagem para realizar cálculos de propriedades eletrônicas, uma vez que ele utiliza todos os elétrons da molécula. O tipo mais comum deste cálculo é o método de Hartree-Fock, no qual uma aproximação primária é inserida às repulsões elétron-elétron, sem desprezar qualquer dos termos ou integrais empregados no operador Hamiltoniano. Este método fornece informações mais precisas sobre o comportamento dos elétrons e utiliza equações exatas, sendo, portanto, muito útil para análises de moléculas pequenas e, por ser mais exato, requer uma elevada memória computacional e tempo de cálculo, sendo essa, portanto, a maior desvantagem do método.

Uma alternativa ao método *ab initio* é a Teoria do Funcional de Densidade (do inglês *Density Functional Theory*, DFT), em que a energia total é expressa em

termos de densidade eletrônica total, em vez de função de onda. A maior vantagem da abordagem DFT está relacionada ao menor tempo computacional. Este modelo emprega um conjunto de funções de bases nos cálculos e uma função de base mínima conteria o número de funções necessárias para acomodar todos os orbitais preenchidos de um átomo. Na prática, uma base mínima inclui todos os orbitais atômicos em uma camada. Existem diversas implementações da DFT nos métodos quânticos, dependendo da forma da expressão matemática utilizada para representar a função da densidade eletrônica (funcional), sendo os funcionais mais comuns o LYP e o B3LYP.

- Métodos semiempíricos: são métodos que consideram apenas os elétrons da camada de valência em seus cálculos, uma vez que são estes os elétrons envolvidos em uma ligação química. Sendo assim, os cálculos são mais simplificados e possibilitam uma redução do tempo computacional (CRAMER, 2007; LEACH, 1996).

1.1.3 Análise conformacional

As propriedades químicas, físicas e biológicas de uma molécula dependem da sua estrutura tridimensional (a conformação que ela adota, especificamente). O arranjo dos átomos e da própria estrutura não é fixo no espaço e naturalmente, rotacionam em torno de uma ou mais ligações simples. Sendo assim, estudar os arranjos espaciais (conformações) energeticamente favoráveis de uma molécula (conformações de menor energia/mais estáveis) são consideradas cruciais para estudos de “*docking*” molecular posteriores. O estudo desses arranjos, visando encontrar conformações de menor energia e em maior proporção, é chamada de análise conformacional (LEACH, 1996; SANT’ANNA, 2009).

As moléculas, quando representadas tridimensionalmente, não estão necessariamente na sua conformação mais estável. Diante disso, estas distorções são otimizadas pelos procedimentos de minimização de energia, a fim de identificar as conformações preferenciais. A análise conformacional pode ser feita por meio de dois métodos computacionais essenciais:

- Método sistemático: no qual a busca conformacional é baseada na análise combinatória de todos os possíveis ângulos de torção da molécula. É um método em que se explora as conformações de menor energia, combinando sistematicamente todos os ângulos de torção relevantes da molécula.
- Método aleatório: a investigação conformacional é realizada através de movimentos aleatórios nas posições dos átomos e as estruturas geradas são

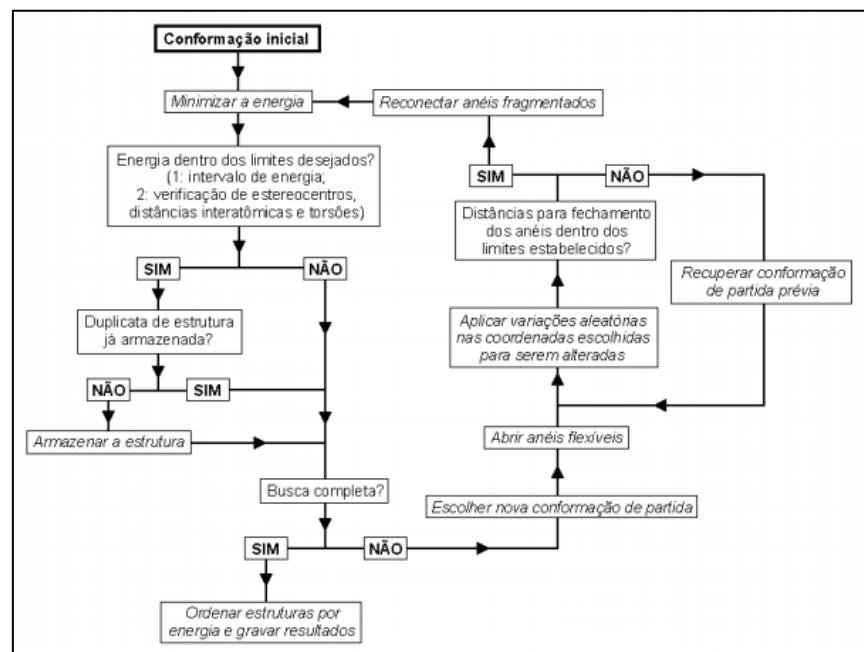
aceitas ou não de acordo com as janelas energéticas definidas pelo analista. O método randômico de busca conformacional utiliza um gerador numérico randômico, que seleciona diversas conformações a fim de obter uma descrição estatística do sistema. O método de Monte Carlo é o método randômico mais comumente utilizado nas análises conformacionais (CRAMER, 2007; LEACH, 1996).

1.1.4 Método randômico de Monte Carlo

Este método é um dos mais utilizados para a realização da varredura do espaço conformacional. Ele é um método de busca aleatória e tem como objetivo gerar eventuais conformações, minimizá-las e armazená-las, cobrindo potencialmente toda a área do espaço conformacional (LEAL, 2003).

Após o armazenamento dessas conformações, variações estruturais são realizadas na estrutura inicial, principalmente nos ângulos torcionais, minimizando-as mais uma vez a partir da mecânica molecular. A nova conformação gerada é comparada à primeira e armazenada, se for única e diferente, ou rejeitada, se for uma conformação duplicada. O processo é repetido diversas vezes, comparando as estruturas geradas com as iniciais de mínimos armazenadas em ciclos anteriores (**Figura 2.1**).

Figura 2. 1. Fluxograma dos procedimentos seguidos no método de Monte Carlo.



Fonte: Leal (2003).

Para o cálculo em questão o analista escolhe o número de ciclos desejado e/ou a quantidade mínima de conformações aceitas e, após alcançar este limite, interrompe-se o

cálculo. Ao final, tem-se um conjunto de conformações únicas que formarão a densidade populacional das conformações mais estáveis da molécula (CRAMER, 2007).

1.1.5 Simulações de *docking* molecular

Os processos de simulação de *docking* molecular é caracterizado pela geração de possibilidades de encaixe proteína-ligante de forma tridimensional simulado computacionalmente. A predição do ligante mais adequado é realizada a partir da aplicação da função escore empírica, que torna possível analisar a interação deste complexo. Este tipo de abordagem computacional permite a triagem *in silico* de bibliotecas de compostos, tornando possível avaliar a afinidade e especificidade de compostos a partir de propriedades estruturais e químicas, como geometria, densidade de cargas, polaridade, potencial de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Sendo assim, esta seleção de possíveis ligantes possui a função de identificar moléculas que se ligam mais fortemente a uma proteína alvo em relação ao seu substrato natural, assim a reação bioquímica que esta macromolécula realiza pode ser alterada ou impedida (em casos de inibição) (DE AZEVEDO JR., 2010; DE AZEVEDO; DIAS, 2008).

Existem diversas metodologias para realização do *docking* molecular e para este estudo, utilizou-se o método de evolução diferencial guiada (*Guided differential evolution*, GDE) implementado no software *Molegro Virtual Docker* (MVD). O MVD é capaz de encontrar a posição correta de um ligante e exibe um melhor desempenho se comparado com os programas AUTODOCK, SURFLEX, FLEXX e GOLD (DE AZEVEDO JR., 2010; HEBERLE; F. DE AZEVEDO, 2011; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

As simulações foram realizadas através do MOLDOCK, onde o melhor complexo proteína-ligante é a posição mais próxima da estrutura cristalográfica. Sendo assim, deve-se estabelecer uma metodologia que avalia a distância entre a solução gerada na simulação (pose) e a cristalográfica. Essa distância pode ser avaliada utilizando o Desvio médio quadrático (RMSD), que é uma medida das diferenças entre os valores previstos pelo modelo e os encontrados após o *docking* (complexo proteína-ligante).

Nas simulações de *docking*, espera-se que os melhores resultados gerem um RMSD inferior a 2,0 Å.

2. OBJETIVOS

Identificar compostos terpenóides análogos do citral (mais especificamente do geranial) como possíveis inibidores para a enzima ALDH1A3 por meio de estudos estruturais focados na interação proteína-ligante.

2.1 Objetivos específicos

- Realizar a análise conformacional das estruturas planejadas neste trabalho por métodos de mecânica molecular e mecânica quântica.
- Simular computacionalmente a interação entre os potenciais ligantes planejados neste trabalho e o sítio ativo do ácido retinóico da enzima ALDH1A3 por meio de simulações de *docking* molecular.

3. SEÇÃO EXPERIMENTAL

Os estudos de modelagem molecular foram desenvolvidos nos computadores do laboratório coordenado pelo Professor Daniel Henriques Soares Leal (Instituto de Física e Química, Unifei), utilizando os softwares Spartan'14® e Gaussian09® para realização da análise conformacional, tanto por Métodos de Mecânica molecular quanto Mecânica Quântica. Para visualização das estruturas e geração das figuras tridimensionais, utilizou-se os softwares GaussView 6® e BIOVIA Discovery Studio®. Para realização do *docking* utilizou-se o programa Molegro Virtual Docker® e, para visualização e interpretação dos resultados, utilizou-se também o BIOVIA Discovery Studio®.

3.1 Análise conformacional

Utilizando a interface gráfica do programa Gaussian09® (GaussView 6®), desenhou-se as estruturas tridimensionais das formas neutras e protonadas das moléculas planejadas. Ajustou-se a geometria inicial de cada estrutura desenhada e, posteriormente, iniciou-se a análise conformacional com mecânica molecular, explorando as conformações mais estáveis utilizando o software Spartan'14®.

Esta análise conformacional foi realizada por busca aleatória, utilizando o método de Monte Carlo. As conformações de partida utilizadas na busca foram otimizadas em fase gasosa, utilizando o campo de força MMFF (do inglês *Merck Molecular Force Field*) e a função de busca *conformer distribution*. As buscas realizadas para cada conformação de partida variaram em no máximo 100 estruturas geradas e selecionou-se as conformações que contribuíram para uma distribuição cumulativa de Boltzmann de no mínimo 60% para cada composto, incluindo sua base e ácido conjugado.

Em seguida, as estruturas selecionadas anteriormente foram otimizadas com métodos quanto-mecânicos em nível DFT (funcional B3LYP) e conjunto de bases 6-31G(d,p) e solvatação implícita IEFPCM em água no software Gaussian09®. Este nível de cálculo foi selecionado visando resultados que possibilitaram encontrar a conformação de menor energia para cada composto planejado.

3.2 Protocolo de *docking* rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker

Na interface do programa BIOVIA Discovery Studio®, exportou-se a estrutura cristalográfica da ALDH1A3 depositada no *Protein Data Bank* com o código 5FHZ (MORETTI *et al.*, 2016). A unidade ativa desta enzima trata-se de um tetrâmero; porém, com o objetivo de acelerar os estudos computacionais, apenas uma das cadeias foi utilizada (cadeia A). Preparou-se a macromolécula verificando-se a existência de fragmentações na estrutura dos aminoácidos, a aromaticidade de resíduos e as cargas existentes.

A macromolécula previamente tratada no BIOVIA Discovery Studio® foi exportada para o Molegro Virtual Docker®, seguindo-se a detecção de todas as cavidades existentes, inclusive aquela do ácido retinóico. O espaço de trabalho foi definido como uma esfera de 10 ângstrons centrada na cavidade onde se encontrava o REA e o NAD⁺ na estrutura cristalográfica.

A função de pontuação (*score*) utilizada foi o *MolDock Score* [GRID], utilizando o algoritmo MOLDOCK SE (indicado para moléculas mais flexíveis) com 20 corridas por ligante. Para avaliar se o protocolo ofereceria resultados confiáveis, realizou-se o *redocking* utilizando o ligante cristalográfico (REA).

Após validação do protocolo por meio do *redocking*, refez-se todo o processo dito anteriormente modificando-se a estrutura do ácido retinóico para o aldeído retinal, e o NAD⁺ para sua forma reduzida (NADH), uma vez que se acredita que os compostos planejados neste projeto possam atuar como inibidor competitivo da ALDH1A3. Sendo assim, é válido avaliar esta capacidade de inibição comparando com o retinal e não com a de seu produto. Diante disso, após o *redocking*, foram importados para o programa os ligantes de menor energia (após análise conformacional) e o *docking* foi realizado.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O objetivo das simulações computacionais foi avaliar as propriedades físico-químicas dos compostos planejados neste projeto e verificar se eles possuíam ou não capacidade de inibir o alvo de interesse (ALDH1A3). Os resultados encontrados na análise conformacional foram extremamente importantes para compreensão das características dos monoterpênicos.

REFERÊNCIAS

- AGÚNDEZ, JOSÉ A.G. *et al.* Clinical practice guidelines for translating pharmacogenomic knowledge to bedside. Focus on anticancer drugs. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 5 AUG, p. 188, 2014.
- ALLAVENA, Paola; DIGIFICO, Elisabeth; BELGIOVINE, Cristina. Macrophages and cancer stem cells: a malevolent alliance. **Molecular Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s10020-021-00383-3>. Acesso em: 27 jun. 2023.
- ANDERSON, NICOLE M.; SIMON, M. CELESTE. The tumor microenvironment. **Current Biology**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020.
- AUDRITO, VALENTINA *et al.* NAD-Biosynthetic and consuming enzymes as central players of metabolic regulation of innate and adaptive immune responses in cancer. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, p. 1720, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31402913/>. Acesso em: 3 jun. 2022.
- AUFFRAY, CEDRIC; SIEWEKE, MICHAEL H.; GEISSMANN, FREDERIC. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 27, p. 669–692, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19132917/>. Acesso em: 3 jun. 2022.
- BARREIRO, Eliezer J. *et al.* Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 300–310, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/qn/a/pWzK48Xxh965cnQkSFmnd3j/?lang=pt>. Acesso em: 18 jul. 2022.
- BECKERMANN, B. M. *et al.* VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. **British Journal of Cancer** 2008, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 622–631, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/6604508>. Acesso em: 31 maio 2022.
- CHESLER, DAVID A.; BERGER, MITCHELL S.; QUINONES-HINOJOSA, ALFREDO. The potential origin of glioblastoma initiating cells. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 190, 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3635065/>. Acesso em: 25 maio 2022.

CLAYDEN, JONATHAN; GREEVES, NICK; WARREN, STUART. **Organic Chemistry**. 2^oed. [S. l.: s. n.], 2012.

CLEVERS, HANS; WATT, FIONA M. Defining adult stem cells by function, not by phenotype. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 87, p. 1015–1027, 2018. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-062917-012341>. Acesso em: 30 maio 2022.

COHEN, MARTIN H.; JOHNSON, JOHN R.; PAZDUR, RICHARD. Food and Drug Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 11, n. 19 Pt 1, p. 6767–6771, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16203762/>. Acesso em: 28 maio 2022.

CONDEELIS, JOHN; POLLARD, JEFFREY W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 263–266, 2006. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867406000559/fulltext>. Acesso em: 30 maio 2022.

CRAMER, Christopher J. **Essentials of computational chemistry: theories and models**. 2^oed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

DE AZEVEDO, Walter Filgueira; DIAS, Raquel. Evaluation of ligand-binding affinity using polynomial empirical scoring functions. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 20, p. 9378–9382, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18829335/>. Acesso em: 6 ago. 2023.

DE AZEVEDO JR., Walter. MolDock applied to structure-based virtual screening. **Current drug targets**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 327–334, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20210757/>. Acesso em: 6 ago. 2023.

DEVALARAJA, SAMIR *et al.* Tumor-derived retinoic acid regulates intratumoral monocyte differentiation to promote immune suppression. **Cell**, [s. l.], v. 180, n. 6, p. 1098-1114.e16, 2020. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867420302191/fulltext>. Acesso em: 30 maio 2022.

DIRKS, P. B. Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration. **Journal of Neuro-Oncology 2001**, [s. l.], v. 53, n. 2, p.

203–212, 2001. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1012273922478>. Acesso em: 25 maio 2022.

DOS REIS, DIJOVANI BATISTA *et al.* Synthesis and biological evaluation against *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania amazonensis* of a series of diaminated terpenoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 84, p. 1739–1747, 2016.

DUAN, J *et al.* ALDH1A3, a metabolic target for cancer diagnosis and therapy. **International journal of cancer**, [s. l.], v. 139, n. 5, p. 965–975, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26991532/>. Acesso em: 28 out. 2021.

FERLAY, J *et al.* GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. **International Agency for Research on Cancer**, [s. l.], n. 11, 2013. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Databases/IARC-Cancerbases/GLOBOCAN-2012-Estimated-Cancer-Incidence-Mortality-And-Prevalence-Worldwide-In-2012-V1.0-2012>. Acesso em: 25 maio 2022.

FRIEDMANN-MORVINSKI, DINORAH *et al.* Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. **Science**, [s. l.], v. 338, n. 6110, p. 1080–1084, 2012.

GELARDI, Edoardo L.M. *et al.* A selective competitive inhibitor of aldehyde dehydrogenase 1A3 hinders cancer cell growth, invasiveness and stemness in vitro. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1–20, 2021.

GELARDI, EDOARDO L.M. *et al.* A selective competitive inhibitor of Aldehyde Dehydrogenase 1A3 hinders cancer cell growth, invasiveness and stemness in vitro. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33478031/>. Acesso em: 8 jun. 2022.

GOCHEVA, VASILENA *et al.* IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. **Genes & Development**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 241, 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC2811826/>. Acesso em: 30 maio 2022.

GOSWAMI, SUMANTA *et al.* Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. **Cancer Research**, [s. l.], v. 65, n. 12, p. 5278–5283, 2005. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15958574/>. Acesso em: 30 maio 2022.

GRAHAM SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, CRAIG B. Química Orgânica : volume 1. [s. l.], p. 648, 2012.

GZELL, C. *et al.* Radiotherapy in glioblastoma: the past, the present and the future. **Clinical Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 15–25, 2017.

HAMBARDZUMYAN, DOLORES; BERGERS, GABRIELE. Glioblastoma: defining tumor niches. **Trends in Cancer**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 252–265, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27088132/>. Acesso em: 3 jun. 2022.

HASSN MESRATI, MALAK *et al.* Understanding glioblastoma biomarkers: knocking a mountain with a hammer. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 5, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7291262/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

HEBERLE, G.; F. DE AZEVEDO, W. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. **Current medicinal chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1339–1352, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21366530/>. Acesso em: 6 ago. 2023.

HÖLTJE, Hans-Dieter *et al.* **Molecular modeling: basic principles and applications**. 3^{ed.} [S. l.: s. n.], 2008. *E-book*. Disponível em: <https://www.wiley.com/en-be/Molecular+Modeling:+Basic+Principles+and+Applications,+3rd+Edition-p-9783527315680>. Acesso em: 11 jul. 2023.

IDBAIH, AHMED *et al.* Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 483–487, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16130103/>. Acesso em: 26 maio 2022.

INCA. **Como surge o câncer? | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>. Acesso em: 18 out. 2021.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Tipos de câncer | Câncer do sistema nervoso central**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central>. Acesso em: 25 maio 2022.

JIANG, YIWEN *et al.* Glioblastoma cell malignancy and drug sensitivity are affected by

the cell of origin. **Cell Reports**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 977–990, 2017. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S2211124717300219/fulltext>. Acesso em: 31 maio 2022.

JOYCE, JOHANNA A.; POLLARD, JEFFREY W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer** 2009, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 239–252, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc2618>. Acesso em: 30 maio 2022.

KALLURI, RAGHU; ZEISBERG, MICHAEL. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer** 2006, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 392–401, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc1877>. Acesso em: 30 maio 2022.

KOBAYASHI, Natália Cristina Ciufa; DE NORONHA, Samuel Marcos Ribeiro. Cancer stem cells: A new approach to tumor development. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 86–93, 2015.

KUMAR, VINIT *et al.* The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 208–220, 2016. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1471490616000053/fulltext>. Acesso em: 31 maio 2022.

LATHIA, JUSTIN D. *et al.* Cancer stem cells in glioblastoma. **Genes & development**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 1203–1217, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26109046/>. Acesso em: 25 maio 2022.

LEACH, Andrew R. **Molecular modelling: principles and applications**. Seconded. Edinburgh: [s. n.], 1996. *E-book*. Disponível em: http://gec.di.uminho.pt/mmnt/modsim/molecm modelling_ch-1.pdf. Acesso em: 18 jul. 2022.

LEAL, Daniel Henriques Soares. **Síntese e estudos de modelagem molecular de peptideomiméticos da seqüência rgd, inibidores potenciais da angiogênese tumoral**. 2003. - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

LEE, SANG Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 198, 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC6150109/>. Acesso em: 28 maio 2022.

LI, JIANFENG *et al.* A specific inhibitor of ALDH1A3 regulates retinoic acid biosynthesis in glioma stem cells. **Communications Biology** 2021, [s. l.], v. 4, n. 1, p.

1–16, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42003-021-02949-7>. Acesso em: 8 jun. 2022.

LIEBER, E. et al. Infrared spectra of acid azides, carbamyl azides and other azido derivatives: Anomalous splittings of the N₃ stretching bands. **Spectrochimica Acta**, [s. l.], v. 19, p. 1135–1144, 1963.

LIU, CHONG *et al.* Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. **Cell**, [s. l.], v. 146, n. 2, p. 209–221, 2011. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867411006568/fulltext>. Acesso em: 31 maio 2022.

LLAGUNO, SHEILA R.ALCANTARA; PARADA, LUIS F. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. **British Journal of Cancer** 2016, [s. l.], v. 115, n. 12, p. 1445–1450, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/bjc2016354>. Acesso em: 31 maio 2022.

LÓPEZ DE ANDRÉS, JULIA *et al.* Cancer stem cell secretome in the tumor microenvironment: a key point for an effective personalized cancer treatment. **Journal of Hematology & Oncology** 2020, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–22, 2020. Disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-020-00966-3>. Acesso em: 4 jun. 2022.

LOUIS, DAVID N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-007-0243-4>. Acesso em: 25 maio 2022.

LOUIS, DAVID N. *et al.* The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27157931/>. Acesso em: 25 maio 2022.

MAMAN, SHELLY; WITZ, ISAAC P. A history of exploring cancer in context. **Nature Reviews Cancer** 2018, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 359–376, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41568-018-0006-7>. Acesso em: 30 maio 2022.

MARTINS, Leandro; CARDOSO, Dilson. Produção de etilenoglicóis e derivados por reações catalíticas do óxido de eteno. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 264–273, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/J6Lt73yzGy6bxMr7Sbqzn/gn/>.

Acesso em: 8 jul. 2023.

MAYO CLINIC. **Glioblastoma - Overview**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/glioblastoma/cdc-20350148>. Acesso em: 28 maio 2022.

MCLENDON, ROGER *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature** **2008**, [s. l.], v. 455, n. 7216, p. 1061–1068, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature07385>. Acesso em: 26 maio 2022.

MENENDEZ, D. *et al.* Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. **Oncogene**, [s. l.], v. 26, n. 15, p. 2191–2201, 2007.

MIMEAULT, M *et al.* Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 981–1011, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17979879/>. Acesso em: 28 out. 2021.

MORETTI, ANDREA *et al.* Crystal structure of human aldehyde dehydrogenase 1A3 complexed with NAD⁺ and retinoic acid. **Scientific Reports** **2016**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep35710>. Acesso em: 8 jun. 2022.

OHGAKI, HIROKO; KLEIHUES, PAUL. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 170, n. 5, p. 1445–1453, 2007. Disponível em: <http://ajp.amjpathol.org/article/S0002944010613582/fulltext>. Acesso em: 26 maio 2022.

ONZI, GIOVANA RAVIZZONI *et al.* Analysis of the safety of mesenchymal stromal cells secretome for glioblastoma treatment. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 828–837, 2016. Disponível em: <http://www.isct-cytotherapy.org/article/S1465324916303413/fulltext>. Acesso em: 31 maio 2022.

OSTROM, QUINN T. *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011-2015. **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 20, n. suppl_4, p. iv1–iv86, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30445539/>. Acesso em: 26 maio 2022.

PAGET, STEPHEN. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **The Lancet**, [s. l.], v. 133, n. 3421, p. 571–573, 1989.

PATTABIRAMAN, Diwakar R; WEINBERG, Robert A. Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose?. **Nature Reviews. Drug Discovery**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 497, 2014. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4234172/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25111111/). Acesso em: 3 nov. 2021.

PITTENGER, MARK F. *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. **NPJ Regenerative Medicine** 2019, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41536-019-0083-6>. Acesso em: 31 maio 2022.

POLLARD, JEFFREY W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer** 2004, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 71–78, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc1256>. Acesso em: 30 maio 2022.

POPR, MARTIN; HYBELBAUEROVÁ, SIMONA; JINDRICH, JINDRICH. A complete series of 6-deoxy-monosubstituted tetraalkylammonium derivatives of α -, β -, and γ -cyclodextrin with 1, 2, and 3 permanent positive charges. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1390–1396, 2014. Disponível em: <https://www.beilstein-journals.org/bjoc/articles/10/142>. Acesso em: 24 maio 2022.

PRAGER, BRIANA C. *et al.* Glioblastoma stem cells: driving resilience through chaos. **Trends in Cancer**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 223–235, 2020. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S240580332030025X/fulltext>. Acesso em: 3 jun. 2022.

QUIÑONES-HINOJOSA, ALFREDO *et al.* Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 494, n. 3, p. 415–434, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cne.20798>. Acesso em: 25 maio 2022.

SALEM, HUSEIN K.; THIEMERMANN, CHRIS. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem Cells**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 585–596, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/stmcls/article/28/3/585/6419942>. Acesso em: 3 jun. 2022.

SANT'ANNA, Carlos Mauricio R. Molecular modeling methods in the study and design of bioactive compounds: an introduction. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 1, n. 1,

2009.

SEIDEL, SASCHA *et al.* A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. **Brain: A Journal of Neurology**, [s. l.], v. 133, n. Pt 4, p. 983–995, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20375133/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

SHAHAR, TAL *et al.* Percentage of mesenchymal stem cells in high-grade glioma tumor samples correlates with patient survival. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 660–668, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/19/5/660/2706378>. Acesso em: 31 maio 2022.

SHARMA, Sandeep *et al.* Chemical properties and therapeutic potential of citral, a monoterpene isolated from lemongrass. **Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 2–12, 2019.

SHAW, E.G *et al.* Reexamining the radiation therapy oncology group (RTOG) recursive partitioning analysis (RPA) for glioblastoma multiforme (GBM) patients. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. S135–S136, 2003.

SHEN, Lin; YANG, Weitao. Molecular dynamics simulations with quantum mechanics/molecular mechanics and adaptive neural networks. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 1442–1455, 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jctc.7b01195>. Acesso em: 18 jul. 2022.

SILVA, Jorge Alberto Valle *et al.* Molecular modeling studies on the interactions of 7-methoxytacrine-4-pyridinealdoxime, 4-PA, 2-PAM, and obidoxime with VX-inhibited human acetylcholinesterase: a near attack conformation approach. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 1018–1029, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/40923>. Acesso em: 21 nov. 2021.

SILVA, Gabriel dos Santos e *et al.* Review of anticancer activity of monoterpenoids: Geraniol, nerol, geranial and neral. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], p. 109994, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279722001995>. Acesso em: 8 jun. 2022.

STEVENS, MALCOLM F.G. Temozolomide: from cytotoxic to molecularly targeted agent. **Cancer Drug Design and Discovery: Second Edition**, [s. l.], p. 145–164, 2014.

STOYANOV, GEORGE S. *et al.* Reclassification of glioblastoma multiforme according to the 2021 World Health Organization Classification of central nervous system tumors: a single institution report and practical significance. **Cureus**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2022. Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/84418-reclassification-of-glioblastoma-multiforme-according-to-the-2021-world-health-organization-classification-of-central-nervous-system-tumors-a-single-institution-report-and-practical-significance>. Acesso em: 25 maio 2022.

TAMER, Canan Ece; SUNA, Senem; ÖZCAN-SINIR, Gülşah. Toxicological aspects of ingredients used in nonalcoholic beverages. **Non-alcoholic Beverages: Volume 6. The Science of Beverages**, [s. l.], p. 441–481, 2019.

TANG, XUEJIA *et al.* Targeting glioblastoma stem cells: a review on biomarkers, signal pathways and targeted therapy. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 11, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8297686/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

THOMAS, Margaret Lois *et al.* Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1485–1496, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2016.08.004>.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, [s. l.], v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16722650/>. Acesso em: 8 jul. 2023.

UCCELLI, ANTONIO; MORETTA, LORENZO; PISTOIA, VITO. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 726–736, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri2395>. Acesso em: 31 maio 2022.

UNIVERSITY OF NEBRASKA MEDICAL CENTER. **Types of stem cell | stem cells**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.unmc.edu/stemcells/educational-resources/types.html>. Acesso em: 30 maio 2022.

VANOMMESLAEGHE, Kenno; GUVENCH, Olgun; MACKERELL, Alexander D.

Molecular mechanics. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 20, n. 20, p. 3281–3292, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23947650/>. Acesso em: 11 jul. 2023.

VASCONCELLOS, Marcel. Comentário sobre células-tronco do câncer: um novo alvo terapêutico?. [s. l.], v. 38, n. 2, p. 111–115, 2016.

VELIZ, IGNACIO *et al.* Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma—is there any hope for the future?. **Annals of Translational Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 7, 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4293478/>. Acesso em: 25 maio 2022.

VICK, NICHOLAS A.; LIN, MEI JANE; BIGNER, DARELL D. The role of the subependymal plate in glial tumorigenesis. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 63–71, 1977. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00688574>. Acesso em: 25 maio 2022.

WALCHER, Lia *et al.* Cancer stem cells—origins and biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 0, p. 1280, 2020.

WELLER, MICHAEL *et al.* Glioma. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–18, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201517>. Acesso em: 25 maio 2022.

WHO | WORLD HEALTH ORGANIZATION. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.who.int/>. Acesso em: 28 out. 2021.

YABROFF, K. ROBIN *et al.* Patterns of care and survival for patients with glioblastoma multiforme diagnosed during 2006. **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 351–359, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22241797/>. Acesso em: 25 maio 2022.