

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

Jullyana Bicalho Costa

**Avaliação da Inibição da FAK e o Efeito na Interação entre FAK e α B-Cristalina em
Células de Glioblastoma**

Governador Valadares

2025

Jullyana Bicalho Costa

Avaliação da Inibição da FAK e o Efeito na Interação entre FAK e α B-Cristalina em Células de Glioblastoma

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora – *Campus* Governador Valadares para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

Governador Valadares

2025

Jullyana Bicalho Costa

Avaliação da Inibição da FAK e o Efeito na Interação entre FAK e α B-Cristalina em Células de Glioblastoma

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

Aprovada em 05 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

**Prof^a. Dr^a. Michelle Bueno de Moura Pereira
Antunes – Orientador**

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Raquel Tognon Ribeiro
Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Maísa Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes Professor(a)**, em 05/02/2025, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maisa Silva Professor(a)**, em 05/02/2025, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Tognon Ribeiro Usuário Externo**, em 06/02/2025, às 09:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2180447** e o código CRC **EF38E121**.

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

Costa, Jullyana Bicalho.

Avaliação da Inibição da FAK e o Efeito na Interação entre FAK e β -Cristalina em Células de Glioblastoma / Jullyana Bicalho Costa. -- 2025.

67 p. : il.

Orientadora: Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2025.

1. Glioblastoma. 2. Interação proteína-proteína. 3. FAK. 4. β -cristalina. I. Antunes, Michelle Bueno de Moura Pereira, orient. II. Título.

Aos meus pais, Levi e Elcy, e ao meu irmão, João Pedro, por terem sempre me ajudado e acreditado em mim, mais do que eu mesma.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar viva e com saúde para ir atrás dos meus sonhos;

À minha família, por me apoiar e estar comigo nos momentos mais difíceis;

À Kissylla e à Gabi, por terem compreendido meus desabafos;

À Andreia, por ter me ajudado a colocar meus pensamentos em ordem;

À Michelle, por toda paciência e dedicação;

À Larissa, por ter dividido essa experiência comigo em vários momentos;

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho –
vocês sabem quem são.

Muito obrigada.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda.”

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

Glioblastoma Multiforme (GBM) é um dos cânceres humanos mais agressivos existentes e com uma das menores taxas de sobrevivência. As limitações no tratamento tornam necessário a descoberta de novas alternativas que possibilitem aos pacientes maior tempo de sobrevivência. A FAK e a α B-cristalina são proteínas altamente expressas em diversos tipos de cânceres, inclusive o glioblastoma, e estão associadas à sobrevivência e proliferação de células tumorais. Estudos anteriores demonstraram a importância da interação FAK/ α B-cristalina na viabilidade das células de glioblastoma U87MG. No presente estudo, objetivamos avaliar a inibição da FAK e seu efeito na interação entre as proteínas FAK/ α B-cristalina em células de glioblastoma. Para a realização dos ensaios foi utilizado o inibidor de atividade quinase da FAK PF 562.271 (PF) e as linhagens celulares de glioblastoma U87MG e T98G. As células foram cultivadas e tratadas com PF em diferentes concentrações e tempos de tratamento, após os quais foram realizados ensaios de viabilidade celular por MTT, *Western Blotting*, PCR quantitativo (RT-qPCR), co-imunoprecipitação e migração (ranhura). Os ensaios de MTT demonstraram que as células U87MG e T98G tiveram a viabilidade reduzida quando tratadas com as concentrações de 100 μ M (U87MG), 200 μ M e 400 μ M (T98G) de PF em 24h, indicando que a ativação de FAK é importante para a sobrevivência das células. A partir dos experimentos com MTT, foi utilizada a linhagem T98G e PF na concentração de 200 μ M. Os ensaios de *Western Blotting* demonstraram que houve diminuição da fosforilação de FAK após tratamento com PF e não houve alteração da expressão proteica de α B-cristalina. Já os ensaios de RT-qPCR demonstraram não haver alteração significativa na expressão de FAK e de Caspase-3. A expressão gênica de α B-cristalina, por sua vez, aumentou significativamente após o tratamento com PF. Os dados obtidos apontam conjuntamente que houve aumento de expressão gênica sem aumento de expressão proteica de α B-cristalina. A interação entre as proteínas FAK/ α B-cristalina ocorreu com e sem fosforilação de FAK, mas aumentou após a inibição da fosforilação de FAK, o que a sugere como um evento de estresse para as células de glioblastoma, e assim aumenta a interação FAK/ α B-cristalina. Por fim, verificou-se que não houve alteração de migração das células de glioblastoma após o tratamento com PF. Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram o efeito da inibição da ativação da FAK na interação com a α B-cristalina e sua importância na sobrevivência de células de GBM, indicando-a como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da doença.

Palavras-chave: glioblastoma, interação proteína-proteína, FAK, α B-cristalina.

ABSTRACT

Glioblastoma Multiforme (GBM) is one of the most aggressive human cancers in existence and has one of the lowest survival rates. The limitations in the treatment make it necessary to discover new alternatives that allow patients a longer survival time and better quality of life. FAK and α B-crystalline are proteins that are highly expressed in several types of cancers, including glioblastoma, and are associated with tumor cell survival and proliferation. Previous studies have demonstrated the importance of the FAK/ α B-crystalline interaction in the viability of U87MG glioblastoma cells. In the present study, we aimed to evaluate the effects of inhibition of FAK activation on the survival and migration of glioblastoma cells, and to verify the effect of this inhibition on the interaction between FAK/ α B-crystalline proteins. The FAK kinase inhibitor PF 562.271 (PF) and glioblastoma cell lines U87MG and T98G were used to perform the assays. The cells were cultured and treated with PF at different concentrations and treatment times, after which cell viability assays were performed by MTT, Western Blotting, quantitative PCR (qPCR), co-immunoprecipitation and slotting assay. MTT assays demonstrated that GBM cells (U87MG and T98G) treated at different times and PF concentrations significantly reduced glioblastoma cell viability, indicating that FAK phosphorylation in tyrosine residue 397 is important for GBM cell survival. Western blotting assays demonstrated that there was inhibition of FAK activation after PF treatment and there was no change in α B-crystalline protein expression. On the other hand, qPCR assays showed no significant alteration in FAK expression, which suggests that PF treatment only inhibits FAK activation and does not alter its expression; there was also no significant expression of Caspase-3, indicating that cell death caused by PF occurs by alternative pathways to apoptosis. α B-crystalline gene expression, in turn, increased significantly after PF treatment; the data obtained indicated that there was an increase in gene expression, however, there was no increase in protein expression. The interaction between FAK/ α B-crystalline proteins occurred even after inhibition of FAK activation, which indicates that the interaction between proteins does not depend on FAK activation. Finally, it was found that there was no change in the migration of glioblastoma cells after treatment with PF. Taken together, the results obtained in the present study demonstrated the effect of inhibition of FAK activation on the interaction with α B-crystalline and its importance in the survival and migration of GBM cells, indicating it as a potential therapeutic target for the treatment of the disease.

Keywords: glioblastoma; protein-protein interaction; FAK; α B-crystalline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|------|
| Figura 1 – Decomposição da TMZ em Metildiazônio (MTD) | 19 |
| Figura 2 – Mecanismo de ação (A) e resistência inata (B) à TMZ | 20 |
| Figura 3 – Angiogênese no GBM..... | 24 |
| Figura 4 – Estrutura esquemática da FAK (A) e modelo de ativação da FAK (B)..... | 25 |
| Figura 5 – Múltiplas ações da FAK no câncer | 30 |
| Figura 6 – Estrutura do inibidor da FAK PF 562.271 (A) e sua ligação ao sítio ativo da proteína (em azul) (B)..... | 32 |
| Figura 7 – Estrutura esquemática da α B-cristalina..... | 33 |
| Figura 8 – Interação entre FAK e α B-cristalina pela formação do complexo FAT-ACD | 35 |
| Figura 9 – Fluxograma da metodologia..... | 37 |
| Quadro 1 – Especificações dos anticorpos primários utilizados | 40 |
| Quadro 2 – Sequência de nucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR..... | 42 |
| Figura 10 – Avaliação de dose-resposta de PF em células U87MG (6 horas)..... | 45 |
| Figura 11 – Avaliação de dose-resposta de PF em células U87MG (12 horas)..... | 45 |
| Figura 12 – Avaliação de dose-resposta de PF em células U87MG (24 horas)..... | 46 |
| Figura 13 – Curva de regressão viabilidade x concentração de PF (U87MG)..... | 46 |
| Figura 14 – Avaliação de dose-resposta de PF em células T98G (24 horas)..... | 47 |
| Figura 15 – Curva de regressão viabilidade x concentração de PF (T98G)..... | 47 |
| Figura 16 – Viabilidade das células U87MG após tratamentos com DMSO, PF e TMZ (24 horas)..... | 49 |
| Figura 17 – Viabilidade das células T98G após tratamentos com DMSO, PF e TMZ (24 horas)..... | 50 |
| Figura 18 – CI_{50} da T98G..... | 51 |
| Figura 19 – Avaliação da fosforilação (A) pFAK e da expressão proteica de (B) α B-cristalina | 52 |
| Figura 20 – Avaliação da expressão gênica diferencial de <i>FAK</i> (A), <i>CRYAB</i> (B) e <i>CASPASE-3</i> (C) após tratamento das células T98G com PF..... | 5454 |
| Figura 21 – Avaliação da interação entre FAK e α B-cristalina após tratamento com PF... 5555 | |
| Figura 22 – Avaliação da migração das células T98G após tratamento com PF | 5656 |
| Figura 23 – Principais resultados do trabalho | 5757 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| ACD | Domínio α -cristalino |
| AGO2 | Argonauta 2 |
| AIC | 5-amino-imidazol-4-carboxamida |
| APNG | Alquilpurina-DNA-N-glicosilase |
| BCA | Ácido Bicinchonínico |
| BCRJ | Banco de Células do Rio de Janeiro |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| BSA | Soro albumina bovina |
| CAF | Complexo de Adesão Focal |
| CBTRUS | <i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i> |
| CDK | Quinase dependente de ciclina |
| cDNA | DNA complementar |
| CE | Célula endotelial |
| CHIP | Proteína de interação com HsP 70 |
| CIPOI | Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância |
| CI ₅₀ | Concentração Inibitória (50%) |
| CT | <i>Cycle Threshold</i> |
| DMEM | Meio Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EGFR | Receptor do Fator de Crescimento Epidermal |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated Kinase</i> |
| FADD | <i>Fas-associated death domain</i> |
| FAK | Quinase de Adesão Focal |
| FAT | Alvo de adesão focal |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FERM | Quatro ponto-um, ezrina, radixina, moesina |
| <i>GAPDH</i> | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| GBM | Glioblastoma Multiforme |
| GLOBOCAN | <i>Global Cancer Statistics</i> |

| | |
|----------------|--|
| Grb2 | Proteína ligada ao fator de crescimento 2 |
| IAP | Proteína inibidora de apoptose |
| <i>IDH</i> | Isocitrato Desidrogenase |
| iFAK | Inibidor da FAK |
| IFN- γ | Interferon γ |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MAT | Microambiente tumoral |
| MDM2 | <i>Mouse double minute 2</i> |
| MEC | Matriz extracelular |
| MGMT | O ⁶ -metilguanina-DNA metiltransferase |
| MMP | Metaloproteinase de matriz |
| MTD | Metildiazônio |
| MTIC | 5-(3-metil-1-triazeno) imidazol-4-carboxamida |
| mRNA | RNA mensageiro |
| mTOR | Alvo mamífero da rapamicina |
| NCCN | <i>National Comprehensive Cancer Network</i> |
| NF- κ B | Fator Nuclear κ B |
| NES | Sinal de exportação nuclear |
| NLS | Sinal de localização celular |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PA3 | Ativador de poliomavírus 3 |
| PF | PF 562.271 |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3 quinase |
| PIP2 | Fosfatidilinositol 2 |
| PKC | Proteína quinase C |
| PLC γ | Fosfolipase C γ |
| <i>PTEN</i> | Fosfatase e análogo de tensina |
| Pyk2 | Tirosina quinase rica em prolina 2 |
| Rb | Retinoblastoma |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RPMI | Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |

| | |
|--------------|---|
| SDS-PAGE | Eletroforese desnaturante |
| SH2 | Domínio homólogo SRC 2 |
| SH3 | Domínio homólogo SRC 3 |
| sHSP | <i>Small heat shock protein</i> |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TCGA | <i>The Cancer Genome Atlas</i> |
| TEM | Transição epitelial-mesenquimal |
| TGF- β | Fator de crescimento transformador β |
| TMZ | Temozolomida |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TNF α | Fator de necrose tumoral α |
| TRADD | <i>TNF receptor-associated death domain</i> |
| TFields | <i>Tumor Treating Fields</i> |
| UNICAMP | Universidade Estadual de Campinas |
| VCAM-1 | Fator de adesão de células vasculares 1 |
| VEC | Caderina endotelial vascular |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| Y397 | Tirosina 397 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 2.1. CÂNCER..... | 16 |
| 2.2. GLIOBLASTOMA MULTIFORME | 16 |
| 2.2.1. Diagnóstico | 16 |
| 2.2.2. Tratamento | 17 |
| 2.2.3. Patogênese | 21 |
| 2.2.3.1. <i>Regulação da apoptose</i> | 21 |
| 2.2.3.2. <i>Desenvolvimento tumoral</i> | 22 |
| 2.3. QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK) | 24 |
| 2.3.1. Estrutura e sinalização | 24 |
| 2.3.2. FAK e câncer | 26 |
| 2.3.2.1. <i>Proliferação e sobrevivência</i> | 26 |
| 2.3.2.2. <i>Invasão e metástase</i> | 27 |
| 2.3.2.3. <i>Angiogênese</i> | 28 |
| 2.3.2.4. <i>Microambiente tumoral</i> | 28 |
| 2.3.2.5. <i>Resistência à terapia</i> | 29 |
| 2.3.3. FAK no GBM | 30 |
| 2.3.4. Inibidores da FAK | 31 |
| 2.4. α B-CRISTALINA (CRYAB, HSPB5)..... | 3333 |
| 2.5. INTERAÇÃO FAK/ α B-CRISTALINA | 3535 |
| 3. OBJETIVOS | 3636 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL..... | 3636 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 3636 |
| 4. METODOLOGIA | 3737 |
| 4.1. CULTURA DE CÉLULAS | 3737 |
| 4.2. ENSAIO DE VIABILIDADE (MTT)..... | 3838 |
| 4.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS | 3939 |
| 4.4. WESTERN BLOTTING | 3939 |
| 4.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR..... | 4040 |
| 4.5.1. Extração de RNA Total | 4040 |
| 4.5.2. Quantificação das amostras de RNA Total | 4141 |
| 4.5.3. Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real | 4141 |

| | |
|---|-------------|
| 4.6. CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO | 4343 |
| 4.7. ENSAIO DE RANHURA <i>IN VITRO</i> (MIGRAÇÃO CELULAR) | 4343 |
| 4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 4444 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 4545 |
| 5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DA FAK NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA | 4545 |
| 5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DA FAK NA ATIVIDADE DE FAK E EXPRESSÃO DE α B-CRISTALINA | 5151 |
| 5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DA FAK NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FAK, α B-CRISTALINA E CASPASE-3..... | 5252 |
| 5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DA FAK NA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS FAK/ α B-CRISTALINA | 5454 |
| 5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DA FAK NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA..... | 5555 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 5858 |
| REFERÊNCIAS | 5959 |

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs) figuram dentre as principais causas de morte globais; dentre elas, os cânceres se destacaram como a segunda maior causa de morte nos Estados Unidos em 2020, dos quais tumores cerebrais foram a primeira causa de morte entre homens abaixo dos 40 anos e mulheres abaixo dos 20 no país (Siegel; Miller; Jehmal, 2020).

Gliomas são tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) que atingem o cérebro, correspondendo a mais de 80% dos tumores malignos cerebrais (Hanif et al, 2017; Weller et al, 2015). Trata-se de um grupo heterogêneo de neoplasias originárias das células da neuroglia que podem ser divididos em astrocitomas, oligodendromas, gliomas oligoastrocíticos mistos e ependimomas (Weller et al, 2015). Outra classificação corresponde a seu grau de malignidade, definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) segundo aspectos histológicos. Os gliomas de grau 1 e 2 são os menos agressivos, enquanto os graus 3 e 4 correspondem àqueles com maior agressividade (Hanif et al, 2017; Weller et al, 2015).

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor maligno primário de grau 4, com tempo médio de sobrevida de até 15 meses (Wen; Kesari, 2008; Zalles; Towner, 2021) Consoante a mais recente classificação dos tumores do SNC divulgada pela OMS, o GBM encontra-se na categoria de gliomas difusos em adultos, caracterizados pelo crescimento infiltrante do parênquima cerebral (Rapôso; Vitorino-Araujo; Barreto, 2021), sob a nomenclatura *Glioblastoma, IDH-wildtype*, em referência ao gene da Isocitrato Desidrogenase (*IDH*), um importante biomarcador na classificação de gliomas (Louis et al, 2021; Valadares et al, 2021).

O GBM pode ser subdividido em primário e secundário, com o primeiro ocorrendo principalmente em pacientes acima dos cinquenta anos de idade, representando a maior parte dos casos (Hanif et al, 2017; Ohgaki; Kleihues, 2013; Wen; Kesari, 2008; Weller et al, 2015; Zalles; Towner, 2021) enquanto o secundário acomete principalmente pacientes jovens, abaixo dos 45 anos, evoluindo a partir de gliomas de baixo grau e possuem maior tempo de sobrevida, em parte por portarem mutações do gene *IDH*, o que acarreta em menor agressividade e melhor resposta às terapias (Wen; Kesari, 2008; Zalles; Towner, 2021; Valadares et al, 2021). Com base em estudos moleculares, foram definidos quatro subtipos de GBM: clássico, neural, mesenquimal e proneural (Rapôso; Vitorino-Araujo; Barreto, 2021). Os glioblastomas primários podem se apresentar em qualquer um dos quatro subtipos, ao passo que os secundários apresentam majoritariamente o tipo proneural (Ohgaki; Kleihues, 2013).

Em estudo realizado pela *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS), glioblastomas foram responsáveis por 14,2% de todos os tumores do SNC e 50,9% dos tumores malignos do SNC (Ostrom et al, 2023), totalizando uma incidência de 3,27 a cada 100 mil habitantes e média de sobrevivência de oito meses. No Brasil, a análise de Oliveira, Wolf e Grivicich (2022) reportou o glioblastoma como sendo a principal neoplasia do SNC, responsável por 30,6% dos casos na região Norte do país. Em outra pesquisa, Silva e colaboradores (2024) reportaram que, dos mais de 13 mil casos de GBM notificados entre 2012 e 2021, a maior parte ocorreu em homens, pessoas acima dos cinquenta anos e autodeclaradas brancas, o que é corroborado por outros estudos (Aguirre-Cruz et al, 2020; Ohgaki et al, 2004; Ostrom et al, 2023; Valadares et al, 2021).

O tratamento do GBM consiste principalmente na ressecção cirúrgica máxima do tumor seguido de quimioterapia e radioterapia concomitantes e quimioterapia adjuvante – ainda assim, sua taxa de sobrevivência é uma das menores entre os cânceres humanos (Tykocki; Eltayeb, 2018). Dados do CBTRUS revelam que a taxa de sobrevivência de 5 anos para o GBM, de 2004 a 2019, foi de 6,9% e de 10 anos foi de 4,3%. A temozolomida (TMZ) é o principal medicamento utilizado no tratamento do GBM, contudo, muitos pacientes não respondem adequadamente à terapia, em especial devido à fatores epigenéticos, além de ser comum o desenvolvimento de resistência, que pode ser adquirida após o início do tratamento (Singh et al, 2021). Outro fator a se considerar são os efeitos adversos da temozolomida em conjunto com a radioterapia, a saber náuseas, trombocitopenia e neutropenia (Tan et al, 2020).

Devido às limitações do tratamento somadas à alta agressividade da doença e sua baixa taxa de sobrevivência, novas alternativas terapêuticas se fazem necessárias. A Quinase de Adesão Focal (FAK) é uma proteína ubíqua cuja função está relacionada à ativação de diferentes vias de sinalização responsáveis pela sobrevivência, proliferação e migração das células (Hu et al, 2017). Sua super expressão foi detectada em vários cânceres, como mama, próstata, laringe, osteossarcoma, astrocitomas anaplásticos e glioblastomas, tendo um papel importante em seu desenvolvimento e metástase (Hu et al, 2017; Natarajan; Hecker; Gladson, 2003; Slack-Davis et al, 2009; van Nimwegen; van de Water, 2007).

Outra proteína relacionada ao desenvolvimento de cânceres é a α B-cristalina, pertencente à família das *small heat shock proteins* (sHSPs), apresentando as funções de chaperona, ao inibir a agregação de proteínas não dobradas, e citoprotetora, ao modular a atividade de diversas proteínas sinalizadoras essenciais para o ciclo celular (Pereira et al, 2014). O aumento de sua expressão está ligado a doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Alexander, bem como em cânceres, se associando a um pior prognóstico no câncer de mama e

a gliomas altamente infiltrativos, incluindo o GBM (Bhat et al, 1999; Goplen et al, 2010; Moyano et al, 2006). No estudo de Pereira e colaboradores (2014), foi demonstrada a interação entre FAK e α B-cristalina em miócitos cardíacos submetidos ao estresse mecânico. Neste estudo verificou-se que a interação entre as proteínas é essencial para a sobrevivência das células e a redução dessa interação leva a apoptose dos miócitos cardíacos. Recentemente, Folly et al (2024) avaliaram a mesma interação em células de GBM, chegando a resultados similares, ou seja, a interação entre FAK e α B-cristalina é importante para a viabilidade de células de glioblastoma. Tais resultados, em conjunto com os demais estudos realizados sobre ambas as proteínas, demonstram o potencial de novos alvos terapêuticos para o tratamento do glioblastoma.

Assim sendo, no presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito da inibição da fosforilação da FAK na sobrevivência, migração e interação entre FAK e α B-cristalina em células de glioblastoma por meio da utilização do inibidor de FAK/Pyk2 PF 562.271.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CÂNCER

O câncer é uma das causas de morte mais comuns em todo o mundo, sendo um reflexo do rápido crescimento e envelhecimento populacionais, bem como do impacto de hábitos de vida. Os estudos da *Global Cancer Statistics (GLOBOCAN)* de 2022 reportaram 20 milhões de novos casos de cânceres e mais de 9 milhões de mortes pela doença, havendo variações entre sexos e regiões do globo – contudo, os cânceres de pulmão, de mama feminino, colorretal e de próstata foram responsáveis por quase dois quintos dos casos de incidência e morte em todo o mundo em 2022 (Bray et al, 2024). Apesar dos avanços nas pesquisas moleculares de diversas linhagens de câncer e descobertas de novos tratamentos, a doença ainda é um obstáculo a ser superado especialmente devido à sua heterogeneidade e complexidade, o que afeta as estratégias terapêuticas (Cheng et al, 2023; Siegel; Miller; Jehmal, 2020).

2.2. GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Tumores cerebrais primários são caracterizados como um grupo heterogêneo de neoplasias que variam desde os tipos menos invasivos ao glioblastoma, o mais agressivo e praticamente incurável (Nabors et al, 2020). O GBM, assim como outros gliomas malignos, possui uma baixa incidência e a maior parte dos casos não apresenta uma causa definida, com uma pequena parcela possuindo histórico de câncer (Alexander; Cloughesy, 2017).

2.2.1. Diagnóstico

A maior parte dos pacientes com GBM têm história clínica de menos de três meses, sendo que aqueles com GBM primário possuem histórico menor do que os portadores do tipo secundário (Ohgaki; Kleihues, 2013). A principal localização da doença são os hemisférios cerebrais, com pouquíssimas exceções afetando o tronco cerebral, cerebelo ou medula espinhal (Nakada et al, 2011). Os sinais e sintomas dependerão da área cerebral afetada e do tamanho do tumor. Tumores menores tendem a causar sintomas mais perceptíveis, como fraqueza, dormência, perda de visão e alterações na fala; tumores maiores, por sua vez, podem causar sintomas mais sutis, tais como disfunções cognitivas, perdas de memória, variações de humor e fadiga. Entretanto, o sintoma mais comum é a dor de cabeça, que muitas vezes está relacionada a efeitos significativos da massa tumoral, seja diretamente ou por meio da obstrução ventricular

(Alexander; Cloughesy, 2017). Convulsões estão presentes em até 25% dos pacientes e podem ocorrer nos estágios finais da doença, sendo controladas com o uso de anticonvulsivantes, que não são recomendados em pacientes que não as apresentem (Alexander; Cloughesy, 2017; Davis, 2016).

O diagnóstico é realizado principalmente por exames de imagem, a saber tomografia computadorizada e ressonância magnética, na qual o GBM se apresenta como uma lesão em anel com necrose central e edema peritumoral, além de hemorragia, áreas císticas e gelatinosas. Em determinados casos, pode haver lesões multifocais ou difusas causadas pela infiltração tumoral, que pode estar além do que é visto na ressonância magnética (Alexander; Cloughesy, 2017; Davis, 2016; Hanif et al, 2017; Nakada et al, 2011). Uma ínfima parcela – 0,5% dos pacientes – apresenta metástases, em parte devido ao pouco tempo de sobrevida (Lah; Novak; Breznik, 2020).

Além dos exames de imagem, também é realizado diagnóstico histológico por microscopia e imunocoloração, no qual tecidos tumorais de glioblastoma apresentam pleomorfismo, com populações que variam de células indiferenciadas a múltiplas áreas de necrose (Alexander; Cloughesy, 2017; Hanif et al, 2017). Nos últimos anos, os avanços nos estudos moleculares a respeito de gliomas levaram à incorporação de marcadores que auxiliam na distinção entre subtipos tumorais, sendo utilizados a partir de 2016 pela OMS (Rapôso; Vitorino-Araujo; Barreto, 2021). Dessa forma, os glioblastomas primários são caracterizados principalmente pela falta de mutações no gene *IDH*, da Isocitrato Desidrogenase, enzima atuante no ciclo de Krebs que está associada a um pior prognóstico (Valadares et al, 2021); outros marcadores são a super expressão do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (*EGFR*), perda de heterozigose no cromossomo 10 e mutações no gene da fosfatase e análogo de tensina (*PTEN*) (Zalles; Towner, 2021). Os secundários, por sua vez, se caracterizam especialmente pela presença de mutações no gene *IDH*, no gene *TP53* e perda do braço curto do cromossomo 1 e do braço longo do cromossomo 19 (Ohgaki; Kleihues, 2013; Zalles; Towner, 2021).

2.2.2. Tratamento

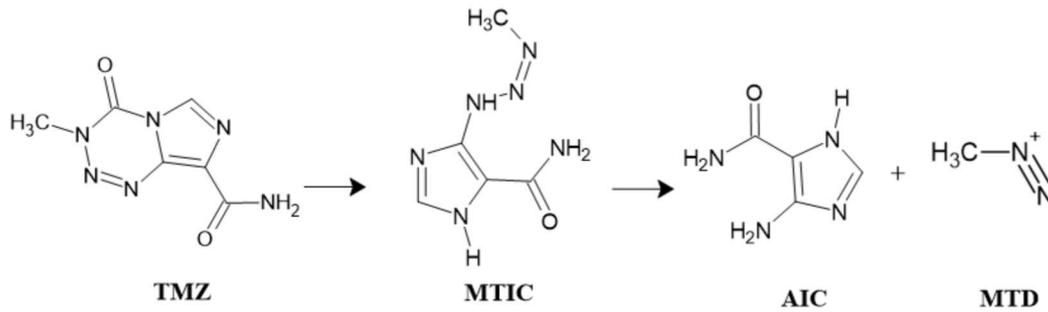
Os esforços para o tratamento do GBM se iniciaram nos anos 1920 com a remoção completa do hemisfério afetado pelo tumor em dois pacientes – infelizmente, ambos não sobreviveram e, até os dias de hoje, o tratamento do GBM se mostra um grande desafio (Dandy, 1928; Dunn et al, 2012). Stupp e colegas (2005) realizaram um estudo no qual reuniram pacientes de 18 a 70 anos e os randomizaram em dois grupos: um receberia somente radioterapia

– regime utilizado até então – enquanto o outro receberia radioterapia em concomitância à temozolomida seguido de seis ciclos de temozolomida após o fim da radioterapia. Os resultados mostraram que a adição da TMZ à terapia aumentou significativamente a sobrevivência dos pacientes, passando a se tornar o regime de tratamento padrão que persiste até os dias atuais, conhecido como regime de Stupp (Stupp et al, 2005). Análise recente de Lakomy e colegas (2020) em um centro de tratamento de câncer reportou que o regime de Stupp elevou a taxa de sobrevivência geral quando comparado a coorte de 10 anos atrás, mesmo sem a presença de um novo método de tratamento, indicando que continua sendo efetivo.

No entanto, apesar do sucesso do regime de Stupp, muitos pacientes ainda apresentam progressão do tumor ou recidivas (Davis, 2016; Tykocki; Eltayeb, 2018). Diversos estudos envolvendo alterações na frequência de administração da TMZ foram realizados, porém, nenhuma diferença ou melhora significativa foi encontrada, e o uso do medicamento por mais de seis ciclos foi associado à maior toxicidade (Lakomy et al, 2020; Nabors et al, 2020). Ademais, um fator importante do tratamento é a completude dos ciclos adjuvantes de quimioterapia, que nem todos os pacientes são capazes de completar principalmente devido à progressão da doença (Lakomy et al, 2020; Stupp et al, 2005).

A temozolomida, cujo nomenclatura química é 3 metil-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5] tetrazina-8 carboxamida, é uma imidotetrazina derivada da dacarbazina, sendo um pró-fármaco e agente alquilante do DNA. Em pHs acima de 7, é convertida em 5-(3-metil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida (MTIC), que é posteriormente transformado em 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AIC) e metildiazônio (MTD), um carbocátion eletrofílico que reage com as porções nucleofílicas do DNA (Lee, 2016; Fresnais et al, 2021) (Fig.1). Seu mecanismo de ação consiste principalmente na metilação das posições N³ da adenina e N⁷ e O⁶ da guanina. A metilação na guanina leva à inserção de uma timina no lugar de uma citosina; o sistema de reparo do DNA dispara uma cascata de sinalização que ativa os *checkpoints* do ciclo celular, levando à apoptose por quebras nas fitas de DNA (Khabibov et al, 2022; Lee, 2016; Wu W. et al, 2021) (Fig. 2A). Um dos principais desafios relacionados ao uso da TMZ no tratamento do GBM é a resistência, que pode ser inerente às células ou adquirida após o início da terapia.

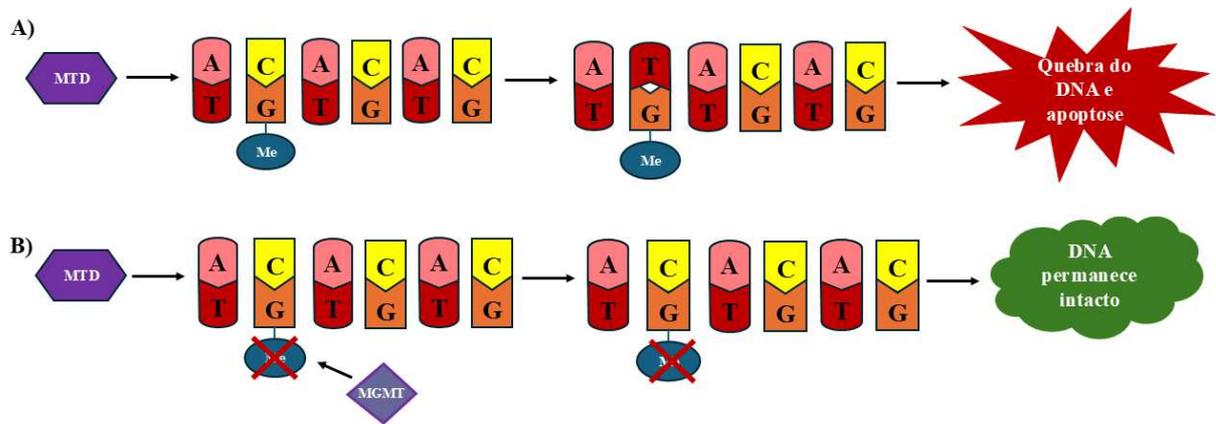
Figura 1 – Decomposição da TMZ em Metildiazônio (MTD)



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Com relação à resistência inata, várias pesquisas têm apontado o papel da O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), enzima capaz de remover os grupos metila da posição O⁶, levando ao reparo do DNA e conseqüentemente ineficácia da TMZ. Dessa maneira, a metilação do promotor do gene *MGMT* passou a ser avaliada. Ensaios clínicos demonstraram que indivíduos com GBM – incluindo idosos – que possuíam o promotor de *MGMT* metilado apresentavam melhores respostas à terapia com agentes alquilantes, bem como taxa de sobrevivência maior (Lee, 2016; Singh et al, 2021; Weller et al, 2015; Wu W. et al, 2021). Isso levou a metilação de *MGMT* a se tornar um importante fator prognóstico e de seleção de terapias, sendo recomendado nas diretrizes recentes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (Nabors et al, 2020) (Fig. 2B). Apesar de tais resultados, conforme Brennan e colegas (2013), em estudo da *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para avaliar as mutações somáticas no glioblastoma, a metilação do promotor de *MGMT* somente serviu de biomarcador em pacientes com o subtipo clássico, mas não proneural, mesenquimal ou neural. Além disso, outros estudos reportaram que pacientes que não possuíam a metilação também respondiam bem à terapia com TMZ, indicando que a resistência ao fármaco se dá por diversas moléculas (Lee, 2016).

Figura 2 – Mecanismo de ação (A) e resistência inata (B) à TMZ



Nota: somente a metilação da guanina é demonstrada.

Legenda: MTD: metildiazônio; MGMT: O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase; Me: grupo metila.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Na resistência adquirida, foi observado que células de GBM tratadas por longos períodos com TMZ desenvolviam mudanças genóticas e fenotípicas em resposta às alterações no DNA causadas pelo fármaco por meio da instabilidade cromossômica, ou seja, perdas ou ganhos em cromossomos geravam alterações em vias metabólicas e diversidade bioquímica e genética em tumores. Essas alterações levavam a diferenças nas respostas à terapia mesmo em células advindas de uma mesma origem e, conseqüentemente, mudanças na arquitetura celular e progressão do tumor (Stepanenko et al, 2016). Outros fatores incluem a perda da metilação de *MGMT*, autofagia, mecanismos de reparo do DNA e mutações em vias de sinalização (Singh et al, 2021).

As dificuldades do tratamento vão além da resistência à quimioterapia. A heterogeneidade do tumor torna difícil o desenvolvimento de novos tratamentos devido às diferenças nas taxas de crescimento, agressividade e resposta às terapias (Zalles; Towner, 2021), bem como a dificuldade em ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) e a presença de bombas de efluxo (Wu W. et al, 2021). Kang et al (2014) realizaram um estudo com células de glioblastoma e reportaram subpopulações celulares com expressão aumentada de glicoproteína P, proteína relacionada a bombas de efluxo e, por conseguinte, resistência terapêutica.

Uma das formas de tratamento relativamente recentes é a terapia de campo elétrico alternado (*Tumor Treating Fields*, TTFs), aprovada pela *Food and Drug Administration*

(FDA) em 2011 para pacientes com GBM recorrente e em 2015 para aqueles com GBM recém diagnosticado como adjuvante na terapia (Fabian et al, 2019; Wu W. et al, 2021). O tratamento consiste na utilização de quatro conjunto de transdutores aplicados no couro cabeludo por ao menos 18 horas por dia. Os transdutores geram campos elétricos alternados de baixa intensidade que interrompem a mitose, agindo seletivamente em células de divisão rápida (Nabors et al, 2020; Tan et al, 2020; Wu W. et al, 2021). Suas maiores vantagens são a invasividade mínima e ausência de efeitos colaterais graves. No entanto, o dispositivo dividiu a comunidade de neuro-oncologistas, em especial pela falta de grupos controle nos estudos realizados e pela falta de entendimento do funcionamento do equipamento (Fabian et al, 2019). Suas desvantagens residem no efeito adverso de irritação local da pele e o alto preço do equipamento (Khabibov et al, 2022). Ainda assim, os resultados obtidos de aumento na taxa de sobrevivência geral e a maior conformidade dos pacientes em utilizá-lo tornou o TTFields um tratamento utilizado na terapia do GBM; inclusive, Stupp e colegas (2017) realizaram um estudo no qual administraram TMZ em concomitância ao TTFields, observando um aumento significativo na taxa de sobrevida.

2.2.3. Patogênese

2.2.3.1. Regulação da apoptose

O ciclo celular se trata de uma maquinaria refinada por meio da qual as células se multiplicam e crescem; a apoptose, por sua vez, é um mecanismo fisiológico utilizado pelo organismo para “remover células extremamente danificadas ou disfuncionais dos tecidos”, balanceada pela mitose das células restantes (Gousias; Theocharous; Simon, 2022). O desequilíbrio entre crescimento e morte celular pode levar ao desenvolvimento de patologias, como os cânceres.

A apoptose pode ser ativada por sinais endógenos ou exógenos, o que irá ativar diferentes vias de sinalização. A via intrínseca, também chamada de mitocondrial, é ativada por fatores endógenos, como perda de nutrientes ou choques de temperatura; esses sinais causam alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, acarretando a liberação de proteínas pró-apoptóticas, processo regulado pela família da BCL-2 (Obeng, 2021). A via extrínseca se caracteriza pela ativação por sinais externos que interagem com receptores de membrana da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) que se ligam às proteínas adaptadoras FADD (*Fas-associated death domain*) e TRADD (*TNF receptor-associated death domain*), responsáveis por ativar a via das caspases, cisteínas proteases que se dividem em iniciadoras ou efetoras

dependendo da parte do processo apoptótico que regulam (Gousias; Theocharous; Simon, 2022; Obeng, 2021).

Dois dos principais reguladores do ciclo celular são a via do supressor tumoral p53 e a via do retinoblastoma (Rb)/E2F. Mutações no p53 foram encontradas em glioblastomas primários e secundários; também foram detectadas metilações do promotor do gene *TP53*, comprometimento da estabilidade proteica, amplificação de genes inibidores do p53 e mutações ou deleções de genes envolvidos na via do p53 (Gousias; Theocharous; Simon, 2022). A via Rb encontra-se mutada principalmente no GBM secundário. Suas proteínas, quando fosforiladas, tornam-se inativadas e se separam da cromatina, permitindo a transcrição dos genes-alvo de E2F, promovendo o crescimento das células (Gousias; Theocharous; Simon, 2022).

A via da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)/Akt/alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) se encontra desregulada em muitos glioblastomas; mTOR é responsável pela indução de várias ciclinas, promovendo o crescimento das células. Tratamentos direcionados especificamente a componentes da via têm sido estudados, apesar de não terem apresentado eficácia clínica significativa (Gousias; Theocharous; Simon, 2021; Touat et al, 2017).

2.2.3.2. *Desenvolvimento tumoral*

A matriz extracelular (MEC) possui componentes com diferentes propriedades bioquímicas, o que a confere uma estrutura única para promover sua função, conforme descrito por Lu, Weaver e Zerb (2012):

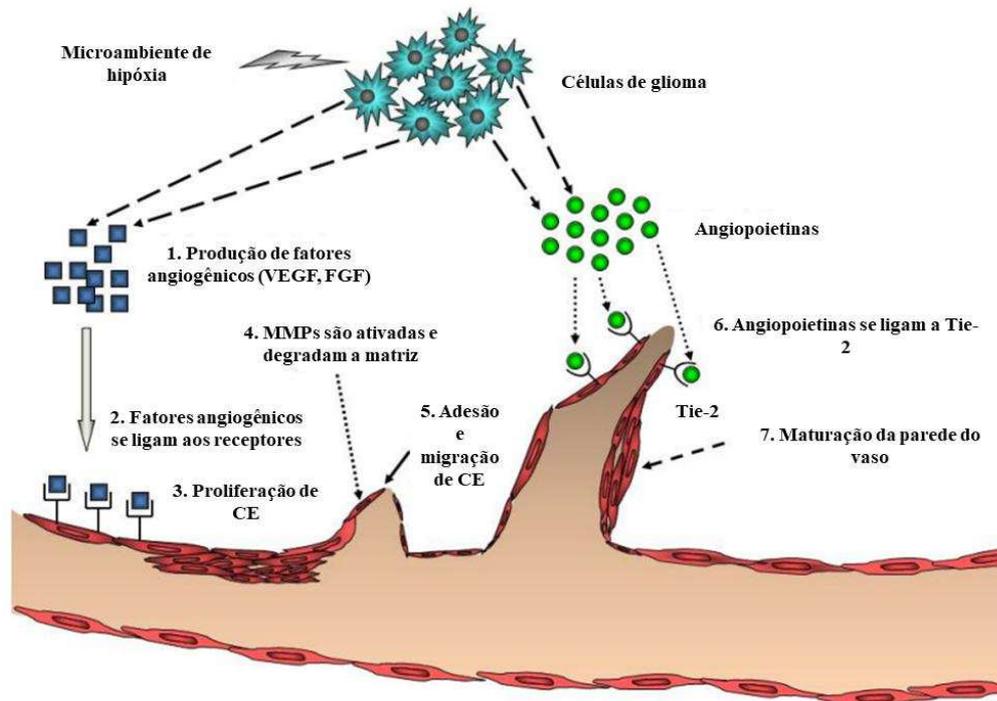
[...] as propriedades físicas da MEC referem-se à sua rigidez, porosidade, insolubilidade, disposição e orientação espacial [...] que, em conjunto, determinam seu papel para apoiar a arquitetura e integridade tecidual. Além disso, ao funcionar como barreira, local de ancoragem ou trilha de movimentação, as propriedades físicas da MEC desempenham papéis negativos e positivos na migração celular [...]. Em contraste, as propriedades bioquímicas da MEC dizem respeito às suas capacidades de sinalização indireta e direta que permitem que as células percebam e interajam com seus ambientes usando várias cascatas de transdução de sinal que emanam da superfície celular para o núcleo, resultando em expressão gênica ou outras mudanças de comportamento celular.

A MEC é capaz de se ligar a vários de fatores de crescimento, limitando a difusão e acesso dos receptores aos seus ligantes (Lu; Weaver; Zerb, 2012). A super expressão de fatores de crescimento confere às células de glioblastoma vantagens em relação às outras células, uma vez que expressam os fatores e seus receptores, criando assim um *looping* autócrino (Nakada et al, 2011). O receptor do EGFR é um receptor transmembrana cuja super expressão ou mutação está presente em até 50% dos glioblastomas e se associa a maior malignidade por promover a proliferação e migração das células (Khabibov et al, 2022; Nakada et al, 2011; Touat et al, 2017).

Além do crescimento acelerado, a angiogênese é uma etapa fundamental na progressão do GBM. A alta vascularização é uma das principais características desse tipo de tumor, iniciando-se a partir da degradação dos vasos existentes e da matriz extracelular, culminando com a migração das células tumorais e formação de novos vasos sanguíneos (Onishi et al, 2011) (Fig. 3). A degradação da MEC ocorre principalmente por meio da interação com as metaloproteinases de matriz (MMPs), em especial MMP-2 e MMP-9. Esta também é responsável pela clivagem de CD44, receptor expresso no glioblastoma que leva à reorganização do citoesqueleto, promovendo motilidade (Dunn et al, 2012).

A invasão e migração do GBM para o tecido circundante começa com a separação das células cancerosas da massa tumoral inicial e sua adesão à MEC; em seguida, as MMPs interagem com a MEC por meio de receptores, degradando-a e permitindo a invasão do GBM (Nakada et al, 2011; Onishi et al, 2011). Essa degradação faz com que a MEC cerebral se torne desorganizada e a BHE aumente sua permeabilidade de maneira não uniforme, com áreas mais permeáveis do que outras (Lah; Novak; Breznik, 2020; Wu W. et al, 2021).

Figura 3 – Angiogênese no GBM



Legenda: CE: células endoteliais; MMPs: metaloproteinases de matriz

Fonte: Nakada et al, 2011. Imagem com alterações.

2.3. QUINASE DE ADESÃO FOCAL (FAK)

2.3.1. Estrutura e sinalização

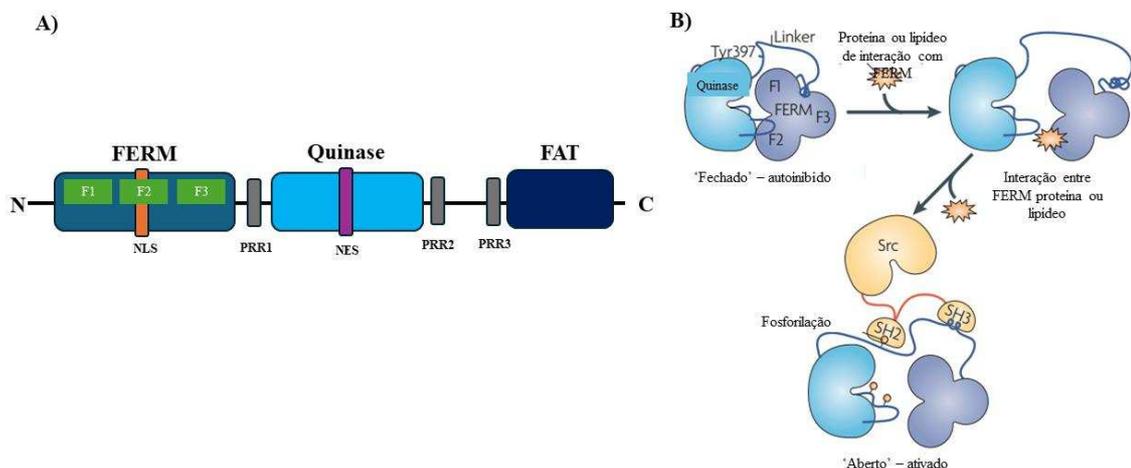
A FAK é uma tirosina quinase não receptora de 125kDa descoberta há mais de trinta anos relacionada principalmente à adesão das células, sendo um componente chave na regulação deste processo em células aderentes (Chauhan; Khan, 2021; Martínez; Navajas; Lietha, 2020), tendo também papel importante na migração, proliferação e sobrevivência das células (Santos et al, 2011). Sua estrutura consiste em um domínio N-terminal quatro pontos-um, ezrina, radixina, moesina (FERM), uma região *linker*, o domínio quinase, uma região rica em prolina de baixa complexidade e o domínio C-terminal alvo de adesão focal (FAT) (Fig. 4A).

O domínio FERM apresenta três lobos (F1, F2, F3) em formato de trevo. O lobo F1 possui estrutura semelhante à ubiquitina; o F2 se assemelha à proteína acil-coA; e o lobo F3 apresenta similaridade ao domínio homólogo da pleckstrina e de ligação à fosfotirosinoquinase (Frame et al, 2010; Martínez; Navajas; Lietha, 2020). O lobo F2 interage com o lobo C da quinase, no qual o resíduo Fenilalanina 596 se insere em uma região hidrofóbica em FERM,

impedindo o acesso de ATP e outras proteínas ao sítio catalítico (Frame et al, 2010; Martínez; Navajas; Lietha, 2020; Santos et al, 2011), criando uma estrutura de autoinibição (Fig. 4B). O domínio quinase consiste em dois lobos dobrados e um domínio ATP entre eles; seu lobo C se liga à região rica em prolina que contém dois motivos PxxP (PR-I, PR-II) que se ligam a diferentes proteínas (Chauhan; Khan, 2021; Martínez; Navajas; Lietha, 2020). O domínio FAT consiste na junção de quatro lobos e é responsável pela interação com outras proteínas de adesão focal, como a paxilina (Lietha et al, 2007).

A ativação da FAK se inicia por meio de estímulos externos, como por exemplo a ligação de fatores de crescimento, como EGFR e PDGFR, e integrinas ao domínio FERM, liberando-o e permitindo a autofosforilação do resíduo Tirosina 397 (Y397) com posterior recrutamento da Src quinase, que interage com os domínios homólogos SRC 2 (SH2) e 3 (SH3). A proteína Src fosforila os resíduos tirosina 576 e tirosina 577 no *loop* de ativação da FAK, induzindo à atividade catalítica completa da FAK. A fosforilação do *loop* de ativação impede as interações intramoleculares responsáveis pelo dobramento de FERM, por consequência impedindo sua autoinibição (Chauhan; Khan, 2021; Frame et al, 2010; Lietha et al, 2007; Martínez; Navajas; Lietha, 2020; Santos et al, 2011) (Fig. 4B).

Figura 4 – Estrutura esquemática da FAK (A) e modelo de ativação da FAK (B)



Legenda: PRR: Região Rica em Prolina

Fonte: (A) Elaborado pela autora (2025) de acordo com Chuang et al, 2022 (B) Frame et al, 2010.

Imagem com alterações.

FAK está localizada no complexo de adesão focal (CAF), formado por três regiões. A região proximal é formada de integrinas e é responsável pela sinalização – e é onde a FAK está; a região intermediária é a região de transdução de força enquanto a última é a região regulatória, formada por actina (Martínez; Navajas; Lietha, 2020). Em situações de adesão focal, FAK interage com a fosfatilinositol 2 (PIP2), levando à sua ativação pelo mecanismo previamente descrito. A FAK também interage com outras proteínas, como a proteína ligada ao fator de crescimento 2 (Grb2), integrante da via MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)/ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*); GTPases Rho e p130 Cas, relacionadas à motilidade das células; fosfolipase C γ (PLC γ), PI3K e p53, muitas das quais ocorrem por meio da fosforilação dos resíduos de tirosina presentes na FAK (Chauhan; Khan, 2021).

Apesar de se localizar principalmente no citoplasma, a FAK é capaz de se translocar para o núcleo, onde regula a atividade de fatores de transcrição e estabiliza complexos de proteínas oncogênicas e supressores tumorais, levando à sua ubiquitinação e degradação proteossomal, promovendo o crescimento das células (Pomella et al, 2022). A proteína apresenta sinais de exportação nuclear (NES) no domínio quinase e sinais de localização celular (NLS) no lobo F2 FERM, ocasionando em sua mudança do citoplasma para o núcleo. Essa movimentação acontece em situações como estresse, inibição da atividade quinase e destacamento de células da MEC – neste caso, a FAK se solta do CAF e vai para o núcleo (Chuang et al, 2022; Zhou; Yi; Tang, 2019).

2.3.2. FAK e câncer

2.3.2.1. Proliferação e sobrevivência

Vários estudos reportaram a super expressão de FAK em diferentes cânceres humanos com funções variadas, desde a regulação de angiogênese à manutenção de células-tronco tumorais (Pomella et al, 2022). A amplificação do loco gênico de *PTK2* – gene responsável pela transcrição da FAK – é implicado como um dos mecanismos dessa expressão elevada, além da atividade de promotores como Nanog, fator nuclear κ -B (NF- κ B), Argonauta 2 (AGO 2) e o *enhancer* do ativador de poliomavírus 3 (PA3), dos quais AGO2 e *PTK2* estão localizados em 8q24.3, mutado em vários cânceres (Chuang et al, 2022; Sulzmaier; Jean; Schlaeper, 2014).

A expressão de FAK pode ser inibida pelo supressor tumoral p53, que se liga diretamente ao promotor de *PTK2*. Ao mesmo tempo, a proteína quinase regula a atividade de p53 por meio de degradação proteossomal. Após adentrar o núcleo, FAK se liga à região de transativação do domínio N-terminal de p53 por meio da região N-terminal de FERM, em que F1 interage com p53 e F3 com a ubiquitina E3 ligase *Mouse double minute 2* (MDM2); a região

de localização nuclear KAKTLR em F2 também participa da interação, apesar de não se ligar. O complexo MDM2 leva à ubiquitinação e consequente degradação proteossomal de p53, impedindo a apoptose. Esta ação da FAK é independente de atividade quinase (Chuang et al, 2022; Lim et al, 2008; Zhou; Yi; Tang, 2019). Tomando em consideração essas informações, pode-se inferir que o balanço entre p53 e FAK afeta a sobrevivência das células, conforme discorreram Cance e Golubovskaya (2008):

[...] deve haver um delicado equilíbrio celular entre as abundâncias dessas proteínas [p53 e FAK] para evitar que a célula sofra morte celular apoptótica [...]Por exemplo, em uma célula maligna na qual a FAK é mais abundante do que em uma célula normal, haveria mais FAK disponível para se ligar à p53 e impedi-lo de reprimir a expressão de FAK, levando assim ao acúmulo de FAK na célula [...].Este ciclo de *feedback* positivo, tomado em conjunto com a degradação direcionada de p53 mediada por FAK, teria amplas implicações para aumentar a sobrevivência celular, independentemente da atividade quinase de FAK.

Entretanto, este não é o único mecanismo pelo qual a FAK é capaz de promover a sobrevivência das células. Sua inibição leva à perda de adesão e apoptose em células tumorais por um mecanismo dependente de Caspase-8 e FADD; a proteína também é capaz de se ligar à proteína RIP e abolir sua função pró-apoptótica (Chuang et al, 2022; Golubovskaya, 2014). A FAK também atua pela via PI3K/Akt/mTOR e estimula NF- κ B para induzir proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), causando tumorigênese e proliferação, respectivamente (Chuang et al, 2022).

A interação da FAK com as integrinas da MEC promove proliferação das células. Em situações de rigidez matricial ocorrem interações entre FAK, p130Cas, Rac GTPase e lamelipodina (Sulzmaier; Jean; Schlaeper, 2014). Outro mecanismo envolve a regulação da transcrição de ciclina D1, regulador do ciclo celular na passagem de G1 para S, em uma cascata envolvendo ERK e o inibidor de quinase dependente de ciclina (CDK) p27. A FAK também regula a ciclina D3, promovendo a proliferação das células por meio das vias PI3K/Akt/mTOR e da proteína quinase C (PKC) (Hao et al, 2009).

2.3.2.2. *Invasão e metástase*

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um dos processos envolvidos no desenvolvimento do câncer. Para que a TEM possa ocorrer, são necessários a diminuição de marcadores epiteliais, o aumento de marcadores mesenquimais e a presença de MMPs (Yoon et al, 2015). A FAK age nesses processos por meio da ativação de Src, interferindo na expressão de E-caderina – marcador epitelial – e do fator de crescimento transformador β (TGF- β), tendo

sido implicada em diferentes tipos de cânceres como fator principal para a TEM (Golubovskaya, 2014; Yoon et al, 2015). A presença das MMPs é crucial para a invasividade e metástase das células tumorais, uma vez que promovem a degradação da MEC.

Várias vias estão relacionadas à migração tumoral, como a via do complexo p130Cas/Cas/Crk, interações com o complexo Arp2/3, integrina $\beta 1$ e a via da PI3K (Chuang et al, 2022; Hao et al, 2009; Yoon et al, 2015). A modulação de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e fosforilação da caderina endotelial vascular (VEC) mediadas por FAK alteram a permeabilidade vascular, possibilitando a metástase de células tumorais.

2.3.2.3. *Angiogênese*

A FAK promove angiogênese agindo sobre as células endoteliais (CE) e sobre o VEGF. A proliferação e sobrevivência de CEs são fatores fundamentais no desenvolvimento vascular, tendo sido demonstrado que sua deleção em ratos levou a defeitos vasculares embrionários *in vivo* e *in vitro* (Golubovskaya, 2014; Sulzmaier; Jean; Schlaeper, 2014; Zhou; Yi; Tang, 2019). No núcleo, a FAK regula a transcrição de VEGFR2, componente central da angiogênese e linfangiogênese; a super regulação do VEGFR2 foi detectada no câncer de mama triplo negativo (Chuang et al, 2022; Zhou; Yi; Tang, 2019). Outrossim, a inibição FAK se associa a menor expressão de VEGF e angiogênese em células de câncer de mama (Golubovskaya, 2014; Sulzmaier; Jean; Schlaeper, 2014; Yoon et al, 2015) e sua deleção acarretou a redução de VEGF, redução de permeabilidade vascular, menor proliferação de CEs e apoptose (Sulzmaier; Jean; Schlaeper, 2014). A permeabilidade vascular é alterada pelo VEGF por meio da ativação de FAK, que se liga à VEC nas junções celulares e fosforila a β -catenina, facilitando sua dissociação, bem como da VEC, e conseqüentemente quebra das junções aderentes (Sulzmaier; Jean; Schlaeper, 2014). VEGF também estimula a fosforilação da FAK, aumentando a formação de CAFs e induzindo a fosforilação da proteína pela Src em CEs (Golubovskaya, 2014).

2.3.2.4. *Microambiente tumoral*

O microambiente tumoral (MAT) é um ambiente complexo de células heterogêneas, células imunes e fatores de suporte, como a MEC e citocinas, que circundam o tumor (Chuang et al, 2022). A FAK possui a capacidade de remodelar o MAT para favorecer a progressão tumoral. Uma dessas formas é o aumento da permeabilidade vascular, que propicia o controle da migração de linfócitos (Zhou; Yi; Tang, 2019). FAK interage com citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) que induz sua transcrição por meio de NF- κ B e

causa sua atividade catalítica, levando a ativação das vias de MAPKs com transcrição de interleucina 6 (IL-6) e secreção proteica (Golubovskaya, 2014; Zhou; Yi; Tang, 2019). A interação FAK nuclear/TNF α também ocasiona a expressão do fator de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1) dependente de GATA4; a inibição de FAK nuclear cria um complexo FAKifnCHIP (proteína de interação com HsP 70) que degrada GATA4, impossibilitando a ativação de VCAM-1 (Chuang et al, 2022; Zhou; Yi; Tang, 2019).

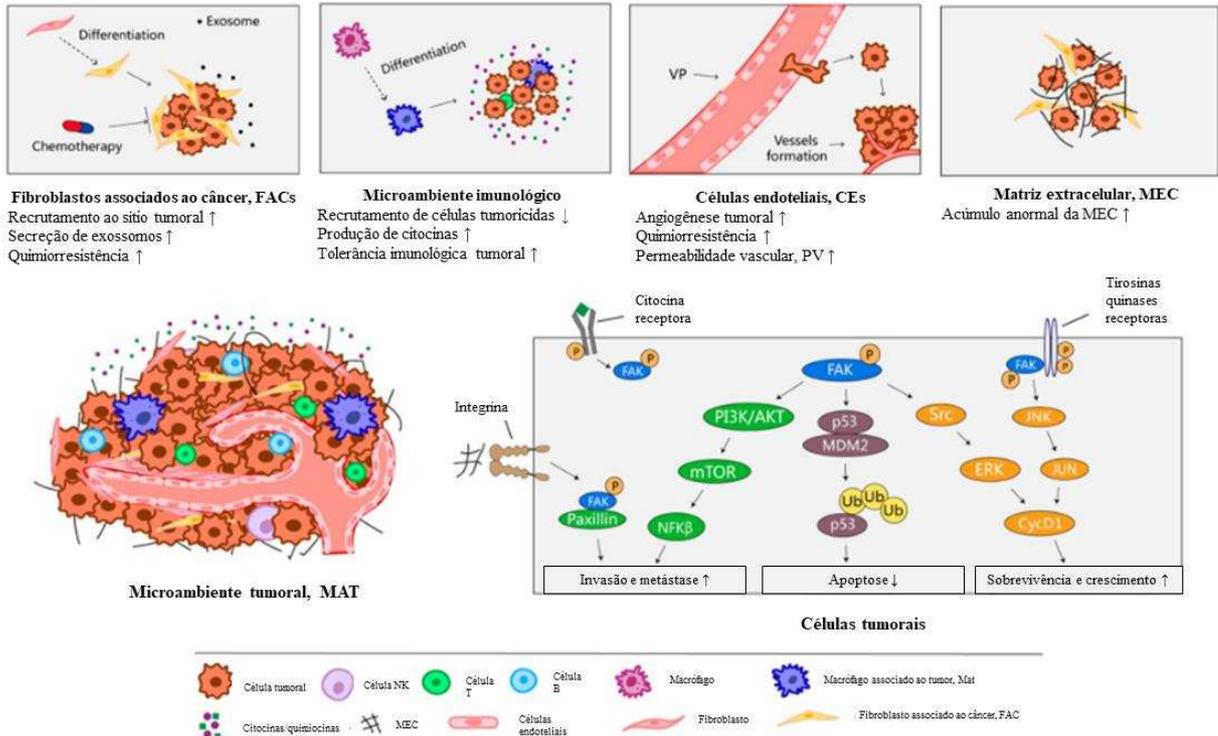
A FAK ainda é capaz de interferir na apresentação e processamento antigênicos. Canel et al (2023) reportaram o papel da FAK na evasão imune no câncer pancreático, em que a perda da FAK levou à resposta antitumoral de TCD8 capaz de restringir o crescimento tumoral, bem como elevou o número de células expressando interferon γ (IFN- γ), citocina inflamatória envolvida na apresentação antigênica de CD8. Adicionalmente, FAK diminui a infiltração de TCD8 no câncer pancreático, criando um MAT imunossuprimido e altamente inflamatório (Chuang et al, 2022; Jiang et al, 2016).

2.3.2.5. Resistência à terapia

Como descrito acima, a FAK é responsável por mecanismos multifacetados de evasão do sistema imune que impactam na eficácia das células T antitumorais (Dawson et al, 2021) e consequentemente medeiam a resistência à imunoterapia. A deleção de FAK no carcinoma de células escamosas resultou em maior infiltração de TCD8 e regressão tumoral, resultado obtido também com o tratamento de células de câncer pancreático e de mama com diferentes inibidores da FAK. Outros estudos evidenciaram que depleção da FAK em células T sensibilizou-as a antígenos de baixa afinidade, melhorando a resposta imune. Além disso, inibidores da FAK podem aumentar a conjugação de células T a células dendríticas, uma vez que a tirosina quinase as destaca desses conjugados, importantes para a resposta imune (Dawson et al, 2021).

Além da imunoterapia, FAK também se encontra associada à resistência ao paclitaxel e à cisplatina em células de câncer de ovário (Chuang et al, 2022). Em células de melanoma, a inativação da via Ras-RAF-MEK acarreta a ativação de FAK por fosforilação mediada por ERK, resultando em remodelação da MEC e conferindo resistência ao uso de inibidores BRAF e MEK (Chuang et al, 2022; Dawson et al, 2021). A figura 5 esquematiza as múltiplas funções da FAK no câncer.

Figura 5 – Múltiplas ações da FAK no câncer



Fonte: Wu Y. et al, 2021. Imagem com alterações.

2.3.3. FAK no GBM

Diversos estudos reportaram a expressão elevada de FAK no GBM, como Natarajan, Hecker e Gladson (2003), que observaram que, em seis de seis biópsias de glioblastoma, todas apresentavam aumento de FAK enquanto as amostras de células cerebrais saudáveis não exibiam o mesmo padrão (Natarajan; Hecker; Gladson, 2003).

A infiltração de gliomas depende sobretudo da permeabilidade vascular – que é altamente influenciada pela FAK via VEGF. Lee e colaboradores (2010) realizaram um experimento no qual deletaram a proteína de ratos, o que resultou em vasculatura normalizada com menor permeabilidade e diminuição do crescimento tumoral, bem como a ausência de expressão da FAK endotelial levou à remodelação da BHE por alterações na função e estrutura das pontas astrocíticas (Lee et al, 2010).

A motilidade e invasibilidade de células de GBM se associa à FAK por meio de citocinas da micróglia, conforme avaliado por Nuñez et al (2021). Em seus estudos, os autores demonstraram que PDGF, EGF, SDF-1, IL-6 e IL-8 provenientes da micróglia estavam ligados ao aumento de fosforilação e expressão proteica de tirosina quinase rica em prolina 2 (Pyk2) – proteína análoga à FAK – e FAK, promovendo a invasão e estimulando a migração, a mitose e a viabilidade das células (Nuñez et al, 2021). Ainda com relação à invasão das células,

Golubovskaya e colegas (2013) bloquearam o sítio de autofosforilação da FAK, resultando em menor invasividade e aumento da perfusão de antineoplásicos (Golubovskaya et al, 2013). Em estudo com células CL-2 e CL-3 e um modelo murino de GBM, Ortiz-Rivera et al (2023a) demonstraram que a inibição da FAK pelo PF 562.271 em associação ao tratamento com TMZ aumentou a sensibilidade ao tratamento, diminuiu a invasividade e reduziu as margens tumorais, efeitos que não eram observados na monoterapia com TMZ (Ortiz-Rivera et al, 2023a).

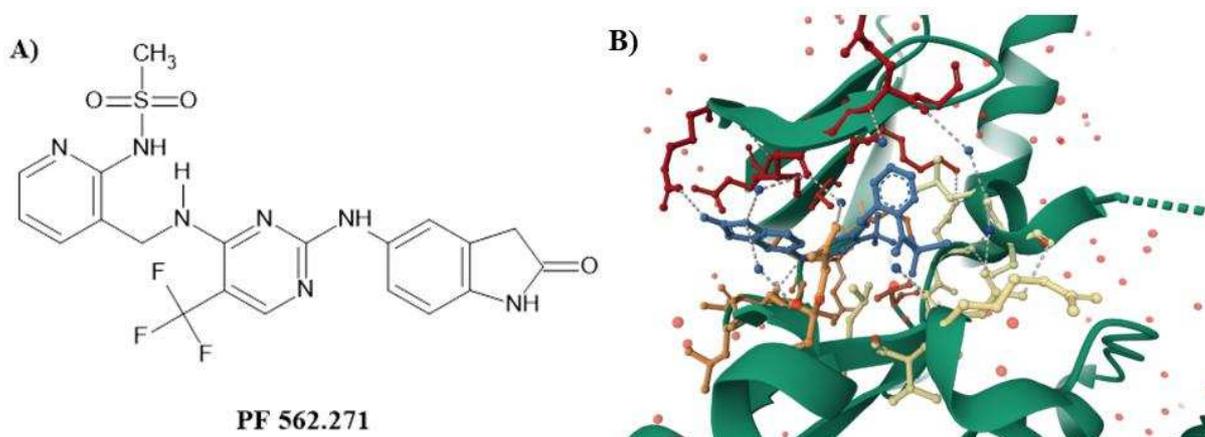
Tomadas em conjunto, as informações previamente descritas demonstram o potencial da FAK como importante alvo terapêutico no câncer, sobretudo no GBM.

2.3.4. **Inibidor da FAK PF 562.271**

Os avanços nos estudos sobre o papel da FAK no câncer possibilitaram a criação de inibidores da FAK (iFAK) por inúmeras empresas, alguns se encontrando em fase de estudo clínico enquanto outros ainda estão na fase pré-clínica ou em desenvolvimento. São moléculas químicas geralmente pequenas com a capacidade de bloquear a fosforilação da FAK e, por conseguinte, a progressão tumoral, sendo capazes de atingir o núcleo e inibir as ações da FAK nuclear (Zhou; Yi; Tang, 2019). Os iFAK podem ser divididos em quatro grupos: inibidores competitivos de ATP, inibidores de FERM, inibidores de FAT e inibidores alostéricos (Spallarossa et al, 2022).

Os inibidores de ATP compõem a maioria dos iFAK. A presença de uma pirimidina em sua estrutura faz com que sejam capazes de estabelecer uma ligação com o domínio quinase e com o motivo DFG na alça de ativação, impedindo a fosforilação da FAK (Spallarossa et al, 2022). O VS 6062, também conhecido como PF 562.271 (PF), é uma diaminopirimidina desenvolvida pela Pfizer que se encontra na Fase I de desenvolvimento clínico e age principalmente no bloqueio de ATP, podendo também bloquear a Pyk2 (Fig. 6). Sua estrutura surgiu a partir do PF 573.228 por meio de *design* racional (Chauhan; Khan, 2021; Pang et al, 2021; Wu et al, 2022).

Figura 6 – Estrutura do inibidor da FAK PF 562.271 (A) e sua ligação ao sítio ativo da proteína (em azul) (B)



Fonte: (A) Elaborado pela autora (2025); (B) *Protein Data Bank* (ID: 3BZ3)

Vários estudos demonstraram a atividade do PF em diferentes tipos de câncer. Stokes et al (2011) relataram os efeitos do PF em modelos animal e *in vitro* de câncer pancreático no qual foram observados redução da proliferação, invasão e metástase, além de alteração do MAT; Pan e colaboradores (2023) reportaram a inibição de proliferação e migração de células de câncer de ovário de alto grau pelo PF; Hu et al (2017) avaliaram o composto no osteossarcoma *in vitro* e *in vivo* e observaram redução de volume tumoral, angiogênese e inibição de apoptose. Com relação ao GBM, Roberts e colegas (2008) descreveram seus efeitos *in vivo* em ratos transplantados com células de GBM U87MG, evidenciando sua seletividade e potência; Ortiz-Rivera e colaboradores (2023b) demonstraram que a administração do PF antes da ressecção cirúrgica aumentou a sobrevivência e retardou a recidiva tumoral *in vivo*; Rolón-Reyes et al (2015) observaram que o PF reverteu o efeito da micróglia na migração de células de GBM *in vitro* e *in vivo* em combinação a outros tratamentos. Além destes, inúmeros outros estudos demonstram o potencial do PF como agente antineoplásico – entretanto, sua farmacocinética não linear levou à descontinuação dos estudos (Chauhan; Khan, 2021; Hao et al, 2009; Pang et al, 2021; Wu et al, 2022).

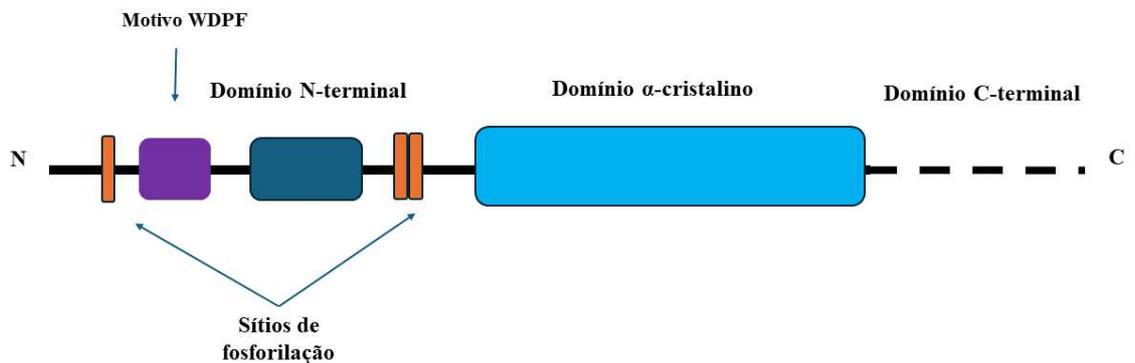
Embora a utilização de iFAK no câncer seja promissora, existem limitações quanto ao seu desenvolvimento. Consoante van Nimwegen e van de Water (2007), existem dois grandes obstáculos nesse processo. O primeiro diz respeito à inibição do domínio quinase da FAK: sua atividade catalítica pode não ser necessária para as vias de sinalização, além do fato de que várias tirosinas quinases apresentam grande conservação de aminoácidos no domínio catalítico; o segundo problema é a função adaptadora da FAK, na qual, quando sua ligação a outras

proteínas é impedida, outras quinases podem assumir seu papel e ativar as vias-alvo a serem bloqueadas.

2.4. α B-CRISTALINA (HSPB5)

As *small heat shock proteins* atuam na defesa do organismo protegendo proteínas de agregação durante situações de estresse. São formadas por um domínio α -cristalino responsável por sua dimerização e por ser a unidade básica das sHSPs, uma extensão N-terminal que influencia na formação de oligômeros e na atividade de chaperona, e uma C-terminal que os estabiliza e torna as sHSPs solúveis (Sun; MacRae, 2005) (Fig. 7). A α B-cristalina é uma sHSP de 22kDa que é ativada sob condições de estresse, nas quais forma estruturas multiméricas para manter proteínas em estados intermediários dobrados. É expressa principalmente na lente dos olhos, onde auxilia na manutenção da transparência, mas pode ser encontrada em outros tecidos, como cérebro, ovários, ossos, coração, entre outros (Bhat et al, 1999; Zhang et al, 2019).

Figura 7 – Estrutura esquemática da α B-cristalina



Fonte: Elaborado pela autora (2025) de acordo com Zhang et al, 2019.

A α B-cristalina está altamente expressa em vários cânceres. Cheng et al (2023) reportaram que a α B-cristalina é um componente essencial do MAT, capaz de influenciar a infiltração imune e servindo como biomarcador prognóstico e de infiltração em muitas malignidades neoplásicas (Cheng et al, 2023), sendo reconhecida como uma proteína antiapoptótica. Ela interage com as proteínas da família Bcl-2, Bax e Caspase-3, regulando-as negativamente e impedindo sua movimentação para a mitocôndria, inibindo a apoptose induzida por estresse. Também foi reportado que α B-cristalina é capaz de inibir a apoptose ativada pela via do p53 ao inativar Ras (Zhang et al, 2019); de forma similar, a FAK também

interage com a via do p53, inibindo a apoptose por ação independente de quinase, como mencionado previamente.

Um dos principais cânceres em que a α B-cristalina está envolvida é o câncer de mama. Moyano e colaboradores (2006) demonstraram que a elevada expressão da proteína induz carcinogênese *in vitro* e *in vivo*. Chelouche-Lev e colegas (2004) realizaram experimento em camundongos imunodeficientes e em tecidos humanos, observando que a alta expressão de α B-cristalina se correlacionava com o envolvimento linfonodal no último caso. Nos cânceres colorretal, gastrointestinal e de ovário a expressão de α B-cristalina foi relacionada à pior prognóstico e maiores chances da ocorrência de metástases, exceto para o colorretal (Dai et al, 2022; Tao et al, 2019; Tan et al, 2019).

Wisniewski e Goldman (1998) demonstraram que a α B-cristalina está associada a filamentos intermediários em uma linhagem celular de glioblastoma, formando as fibras de Rosenthal, presentes na doença de Alexander, uma doença neurodegenerativa, e também foi associada a células de GBM altamente infiltrativas e resistentes à apoptose (Goplen et al, 2010). De fato, a super expressão de α B-cristalina em células de glioblastoma nodular aumentou sua invasividade e gerou alterações fenotípicas a nível celular e molecular, o que apenas foi reduzido com a deleção de CD44 (Chen et al, 2023).

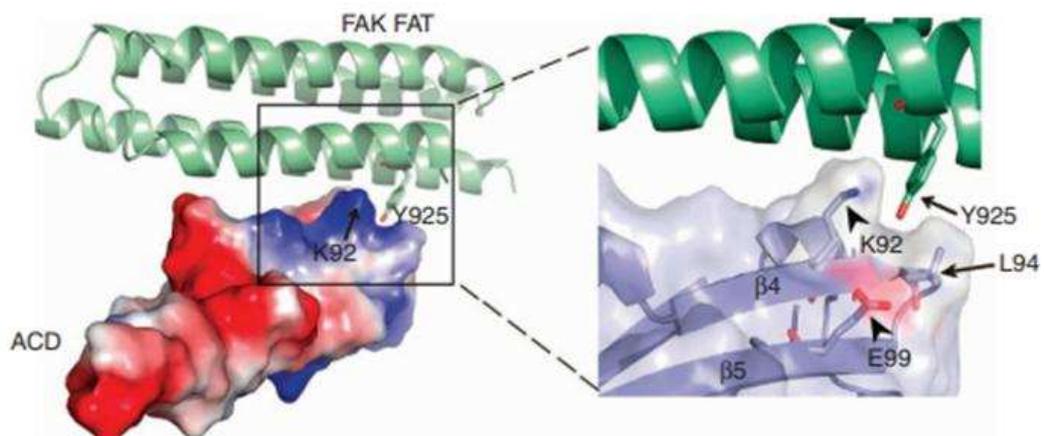
No SNC, a micróglia e os astrócitos estão envolvidos na neuroinflamação. A micróglia secreta vários mediadores inflamatórios, ativando os astrócitos, que por sua vez ativam a micróglia – e quando a ativação se torna excessiva, tem-se o processo de neurodegeneração. Experimentos em modelos murinos de encefalomielite autoimune experimental demonstraram que a α B-cristalina é secretada em exossomos pelos astrócitos, inibindo a ativação da micróglia (Guo et al, 2018). Os níveis de α B-cristalina são elevados por citocinas inflamatórias, afetando também os exossomos, o que pode se relacionar à resistência terapêutica e agressividade do GBM (Kore; Abraham, 2014).

O desenvolvimento de compostos para a inibição de sHSPs levou à criação de três mecanismos: o uso de moléculas pequenas ou peptídeos aptaméricos, atuação sobre o RNA mensageiro das sHSPs e nanopartículas, muitos voltados à HSPB1. Com relação à α B-cristalina, autores desenvolveram inibidores capazes de bloquear a interação α B-cristalina/VEGF, diminuindo sua secreção em células cancerosas mamárias. Todavia, a presença de sHSPs em diversos tecidos, alguns dos quais dependem de sua atividade, e os sistemas de *feedback* entre elas e seus fatores de transcrição se tornam limitações para o tratamento (Caporossi et al, 2021).

2.5. INTERAÇÃO FAK/ α B-CRISTALINA

A interação inédita entre FAK e α B-cristalina foi observada por Pereira e colaboradores (2014) em miócitos cardíacos de ratos submetidos a estresse mecânico. Os autores descreveram que, sob condições de estresse, a FAK se associa rapidamente à α B-cristalina por meio de seu domínio FAT, o que protege a FAK da degradação pela calpaína. Os autores sugeriram que a interação entre as proteínas é importante para a sobrevivência das células cardíacas. A região de interação foi determinada no estudo e as sequências de resíduos de aminoácidos específicos de ambas as proteínas foram elucidadas (Fig. 8). A região de interação indica que as folhas β 4 e β 8 presentes no domínio α -cristalino (ACD) de α B-cristalina reconhece um sítio específico no domínio FAT de FAK (Pereira et al, 2014). Recentemente, nosso grupo de pesquisa reportou a mesma interação em células de GBM. Nesse estudo, demonstrou-se que o tratamento de células de glioblastoma U87MG com os peptídeos que correspondiam ao domínio ACD da α B-cristalina e ao domínio FAT de FAK reduziram a viabilidade das células, induziram apoptose e mudanças morfológicas na linhagem U87MG (Folly et al, 2024).

Figura 8 – Interação entre FAK e α B-cristalina pela formação do complexo FAT-ACD



Fonte: Imagem adaptada de Pereira et al, 2014.

Sabendo-se da importância dessa interação para a sobrevivência das células em diferentes modelos de estudo (Folly et al, 2024; Pereira et al, 2014), o presente estudo pretende avaliar o efeito da inibição da ativação da FAK nos processos de sobrevivência e migração das células de glioblastoma, bem como o efeito dessa inibição na interação entre as proteínas FAK/ α B-cristalina.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inibição da ativação da FAK nos processos de sobrevivência e migração das células de glioblastoma, bem como o efeito dessa inibição na interação entre as proteínas FAK/ α B-cristalina.

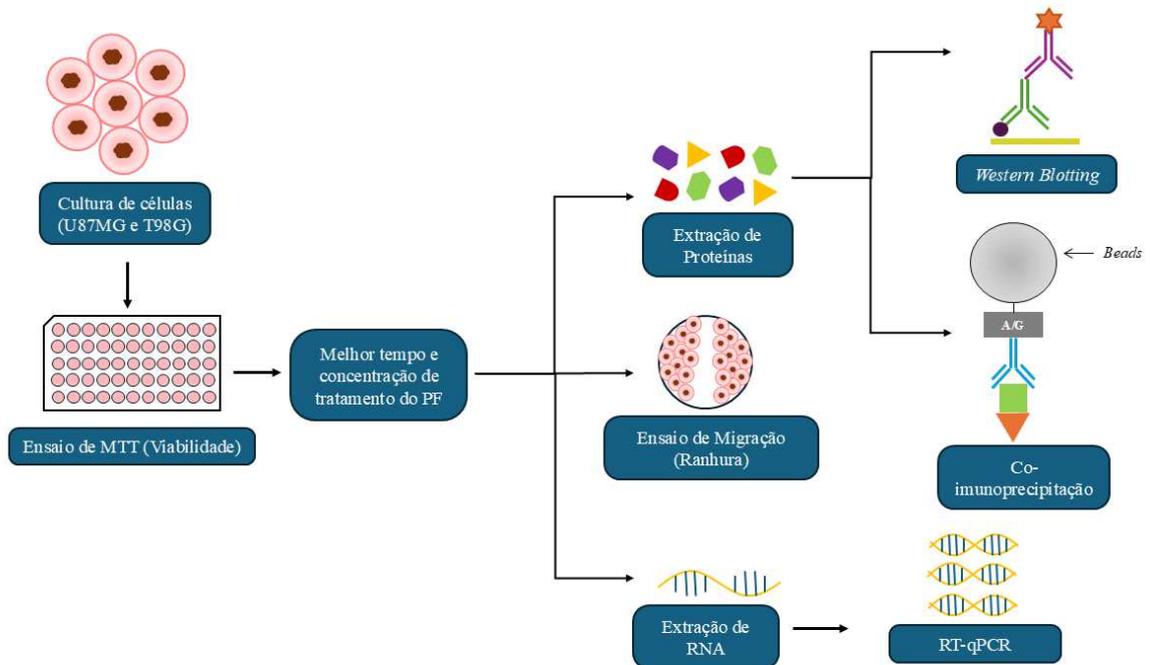
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a viabilidade das células de glioblastoma após o tratamento com o inibidor de FAK PF 562.271;
- 2) Avaliar a atividade de FAK após o tratamento das células de glioblastoma com o inibidor de FAK PF 562.271;
- 3) Avaliar a expressão proteica de α B-cristalina após o tratamento das células de glioblastoma com o inibidor de FAK PF 562.271;
- 4) Avaliar a expressão gênica diferencial de FAK, α B-cristalina e Caspase-3 após o tratamento com o inibidor de FAK PF 562.271;
- 5) Avaliar a interação entre as proteínas FAK/ α B-cristalina após o tratamento das células de glioblastoma com o inibidor de FAK PF 562.271;
- 6) Avaliar a migração das células de glioblastoma após o tratamento com o inibidor de FAK PF 562.271.

4. METODOLOGIA

O fluxograma dos métodos utilizados encontra-se na Figura 9 abaixo.

Figura 9 – Fluxograma da metodologia



Fonte: Elaborada pela autora (2025)

4.1. CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas as linhagens celulares U87MG e T98G. A primeira foi originalmente cedida pelo Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI) pertencente à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), provenientes de um paciente homem de idade desconhecida (U-87 ATCC® HTB-14). As células da linhagem de glioblastoma T98G foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) provenientes de um paciente homem, caucasiano, de 61 anos (T98G ATCC® CRL-1690). Ambas as linhagens foram cultivadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) (LONZA, 12-702F) e meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Vitrocell Embriolife, D0069) contendo 1% de Penicilina/Estreptomicina (LONZA, 21F095302), 1% de piruvato (LONZA, 13-115E), 1% de aminoácidos (LONZA, BE13-114E) e 20% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia, 10-BIO500) previamente inativado por aquecimento em banho-maria a 56°C por 30 minutos.

As células foram acondicionadas em garrafas de cultura de 25cm³ e 75cm³ em estufa com 95% de O₂ suplementado com 5% de CO₂ a 37°C até atingirem 90% de confluência, quando foram destacadas utilizando solução de tripsina 0,25% (Sigma Aldrich T4049) e centrifugadas a 4° C, 1500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi homogeneizado em meio de cultura; as células foram contadas em câmara de Neubauer (Hausser Scientific 3100) com corante azul de tripan (Sigma Aldrich, 15250-061) para o cálculo de viabilidade. Posteriormente, as células foram plaqueadas conforme ensaio em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina.

4.2. ENSAIO DE VIABILIDADE (MTT)

A avaliação da viabilidade das células foi realizada pela técnica de MTT conforme Mosmann, 1983. A técnica consiste na redução do sal tetrazólico [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolbrometo] pelas enzimas mitocondriais de células ativas, convertendo-o em formazan e transformando a coloração do meio de amarelo para púrpura, sendo a quantidade de formazan gerada proporcional à concentração de células viáveis (Mosmann, 1983). As células foram incubadas por 6, 12 e 24 horas (U87MG) ou apenas por 24 horas (T98G) em placas de 96 poços contendo 2x10⁴ células por poço. A incubação foi feita nas mesmas condições da cultura. O tratamento com PF 562.271 foi realizado nas concentrações de 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM e 100 µM para a U87MG e 50 µM, 75 µM, 100 µM, 200 µM e 400 µM para a T98G. Como controle negativo, foi utilizado Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, D8418), diluente do PF; sua diluição foi realizada da mesma forma que a utilizada para o composto de teste. Como controle positivo foi utilizado TMZ na concentração de 400 µM. A escolha da concentração de 400 µM de TMZ para o tratamento das células, baseou-se em estudos anteriores que avaliaram a viabilidade das células *in vitro* de células gliais humanas e caninas utilizando diferentes doses de TMZ. Neste estudo, os autores demonstraram que a dose mais efetiva para diminuir a viabilidade da linhagem U87MG foi de 400 µM (Tresch et al, 2021).

Decorrido o tratamento, foram adicionados 20µL de solução de MTT (Sigma Aldrich, M5655) 5mg/mL seguido de incubação a 37°C em 5% de CO₂ por 4 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas à temperatura ambiente por três minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi retirado para a adição de 200µL de DMSO, com incubação posterior das placas por 30 minutos nas mesmas condições anteriores. A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de microplaca (ThermoFisher Multiskan FC 51119000) a 570 nm, a partir da qual as médias

para cada tratamento foram calculadas e subtraídas do branco. O controle DMSO foi considerado como 100% de viabilidade. A partir dos cálculos, foi determinada a melhor concentração de ação do PF para cada linhagem, que foi utilizada nos ensaios seguintes.

4.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Foram plaqueadas 1×10^6 células em placas de 90 mm e incubadas por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Após plaqueamento, as células foram tratadas com a melhor concentração de PF (observada no ensaio de MTT) por 24 horas. Em seguida, as placas foram acondicionadas em gelo, o meio foi retirado e foi adicionado PBS em quantidade suficiente para lavagem. Adicionou-se tampão de extração RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP40; 0,25% Deoxicolato de Sódio; 5mM Fluoreto de Sódio; 2mM Ortovanadato de Sódio; 100µg/ml PMSF; 0,1 mg/ml aprotinina) e as células foram removidas com auxílio de *scrapers*. Os lisados celulares foram incubados em gelo por 30 minutos antes de serem centrifugados a 11000 rpm por 20 minutos a 4°C. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método do ácido bicinchonínico (BCA) consoante Smith et al, 1985. Após quantificação, as amostras foram acrescidas de solução da amostra (0,0625M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) e aquecidas a 95° por cinco minutos, permanecendo armazenadas em biofreezer -20°C até sua utilização.

4.4. WESTERN BLOTTING

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

A membrana foi bloqueada por 2 horas com solução de bloqueio de soro albumina bovina (BSA) 5% em tampão TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6) seguida de incubação com anticorpo primário *overnight* a 4°C e anticorpo secundário *anti-mouse* (GE Amersham NA934V) ou *anti-rabbit* (GE Amersham NA931V) por 45 minutos. Após cada incubação, foram realizadas três lavagens com TBS-T de 10 minutos sob agitação.

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

Quadro 1 – Especificações dos anticorpos primários utilizados

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

Legenda: BSA: Soro Albumina Bovina

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

4.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

4.5.1. Extração de RNA Total

Para extração do ácido ribonucléico (RNA) total, as células foram cultivadas como já descrito anteriormente. A metodologia de extração de RNA e quantificação das amostras de RNA total foi realizada conforme descrito abaixo.

As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^6 células em placas de petri de 90mm. Em seguida, iniciou-se os tratamentos com PF, TMZ e DMSO. As células foram removidas das placas com auxílio de *scrapers*, transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 1500 rpm a 4°C por 10 minutos. O precipitado formado foi utilizado para extração de RNA. As amostras

foram transferidas para novo microtubo e homogeneizadas em 1 mL do reagente trizol gelado. As amostras foram incubadas e homogeneizadas por 5 minutos 15-30° C em bancada e depois centrifugadas a 11000 rpm 10 minutos, 4°C.

O sobrenadante foi transferido para novo microtubo. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio, homogeneizado e, após a centrifugação (11000 rpm, 4° C, por 10 minutos), foi separada a fase aquosa (superior) contendo o RNA total. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. Para precipitar o RNA total foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas novamente em temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugadas a 11000 rpm por 10 minutos a 4° C. O RNA formou um precipitado em forma de gel no fundo e nas paredes do tubo. Para lavagem do RNA, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado uma vez utilizando etanol 75%. A amostra foi misturada em vórtex e centrifugada a 6500 rpm por 5 minutos a 4° C. O precipitado foi seco por 30 minutos em temperatura ambiente por meio de inversão do microtubo. O RNA foi dissolvido em 30 µL água livre de RNase e estocado a -80°C.

4.5.2. **Quantificação das amostras de RNA Total**

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

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

Em que:

A₂₆₀: corresponde ao valor de absorbância da amostra ao comprimento de onda de 260 nm;

F_c: corresponde ao fator de conversão que para RNA é 40;

F_d: corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura.

A qualidade do RNA foi analisada com base na razão da absorbância A_{260nm} / A_{280nm}.

4.5.3. **Análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real**

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada incubando-se 2 µg de RNA total extraído a partir da cultura de células T98G com iniciadores randômicos (Randon Primer 250ng - Invitrogen), 50 U da enzima Super Script III™ *Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e os ciclos de 37°C por 60 minutos e 95°C por 5 minutos.

A qRT-PCR foi realizada em sistema 7500 *Fast Real-Time* (Applied Biosystems®), utilizando SYBR *green* (FSUSGMMRO Roche). O fluoróforo SYBR *green* é um corante que

se liga na alça menor da dupla fita de DNA emitindo luz fluorescente. A fluorescência é mensurada à medida que os produtos de amplificação são gerados. Quanto maior o número de duplas fitas de DNA formadas durante a reação de PCR, maior a emissão de fluorescência. A presença de DNA dupla fita na solução é capaz de aumentar essa emissão em até 10 vezes para uma mesma concentração de SYBR *green*.

Os primers foram desenhados utilizando Primer Express *Software* (PerkinElmer Life Sciences) e validados através da análise das curvas de dissociação e modelo de titulação. Para a reação de qRT-PCR foram utilizados 30 ng de cDNA, 400 nM de primers (*forward* e *reverse*) e qPCRBio SYBR Green Mix 2X (PCR Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata. As condições da PCR foram: 95°C por 2 min (1 ciclo), 95°C durante 5 segundos, 60°C por 30 segundos (40 ciclos). Os resultados foram avaliados pelo método do CT (*Cycle threshold*) comparativo (User Boletim n ° 2, PerkinElmer Life Sciences) sendo os valores comparados pelas eficiências de cada par de oligonucleotídeos previamente padronizados no laboratório. Os produtos (*amplicons*) obtidos durante a RT-qPCR foram detectados através da curva de amplificação gerada ao longo da reação denominada de ciclo limiar da fase logarítmica da amplificação ou CT. O CT reflete o número do ciclo no qual a fluorescência gerada na reação atravessa o limiar ou linha de base e é inversamente proporcional à concentração de DNA ou RNA da amostra analisada. Assim, uma unidade de CT equivale ao dobro do produto amplificado de cópias iniciais de *amplicons*. O gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi usado como normalizador e a amostra tratada com DMSO foi utilizada como controle.

O quadro 2 mostra a sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR.

Quadro 2 – Sequência de nucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR

| Genes | Sequência (5'-3') |
|-----------------------------|-------------------------|
| <i>GAPDH</i> senso | GTTCGTCATGGGTGTGAACC |
| <i>GAPDH</i> antissenso | CCAGGGGTGCTAAGCAGTTG |
| <i>FAK</i> senso | ATAGAACTTGGACGATGTATTGG |
| <i>FAK</i> antissenso | TGACGCATTGTTAAGGCTTC |
| <i>CASPASE-3</i> senso | GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG |
| <i>CASPASE-3</i> antissenso | GCATCGACATCTGTACCAGACC |
| <i>CRYAB</i> senso | AGGTGTTGGGAGATGTGATTGA |
| <i>CRYAB</i> antissenso | GGATGAAGTAATGGTGAGAGGGT |

Fonte:Elaborado pela autora (2025).

4.6. CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO

Os extratos proteicos (aproximadamente 500 μ g de proteína total) foram incubados com 10 μ l de anticorpo anti- α B-cristalina, e aproximadamente 40 μ l de Proteína A/G-Sepharose 6MB (PROTGA-RO Roche) foram adicionadas a cada amostra, mantendo-as sob agitação leve a 4°C durante 16 horas. Após centrifugação por 1 minuto a 800 rpm a 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o precipitado submetido a 5 lavagens com tampão de lavagem para imunoprecipitado (100mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA 0,5% Triton X-100, 2mM Ortovanadato de Sódio). Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se ao precipitado aproximadamente 40 μ l de tampão da amostra 1x. O precipitado foi submetido a SDS PAGE e o ensaio de *Western Blotting* foi realizado com anticorpos anti-FAK e anti- α B-cristalina.

4.7. ENSAIO DE RANHURA *IN VITRO* (MIGRAÇÃO CELULAR)

O ensaio de ranhura foi realizado com base em Justus et al (2014). As células T98G foram tripsinizadas e semeadas em placas de 60mm. Após 24 horas para adesão, as células foram tratadas com PF 200 μ M, DMSO e TMZ 400 μ M e incubadas por 24h a 37°C conforme previamente descrito. Decorrido o período de incubação, as monocamadas foram arranhadas, utilizando uma ponta de micropipeta estéril (1000 μ l), criando uma fenda sem células, sob um ângulo de cerca de 90 graus para manter a largura da fenda limitada. O meio foi removido e as placas lavadas com PBS para remover as células no sobrenadante.

A área da ranhura foi fotografada utilizando microscópio invertido antes da adição da droga (tempo 0), bem como após o tempo de tratamento, utilizando uma objetiva que permitiu a visualização de ambas as bordas da ferida com aumento de 40x; para cada placa, foram tiradas fotos de dois pontos distintos da fenda, e os pontos foram marcados com caneta marcadora de ponta ultrafina na superfície externa superior da placa, para obtenção do mesmo campo durante a aquisição das imagens antes e após o tratamento. O *software* Image J foi utilizado para medir, em pixels, a área da ranhura.

O fechamento da ranhura (%) foi quantificado a partir da mudança percentual da área da ranhura, seguindo-se a equação abaixo:

$$\% \text{fechamento da ranhura} = [(A(0) - A(t)) / A(0)] \times 100$$

Em que A (0) corresponde à área de ranhura antes da adição dos tratamentos, e A(t) à área após decorridas 24h de tratamento.

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

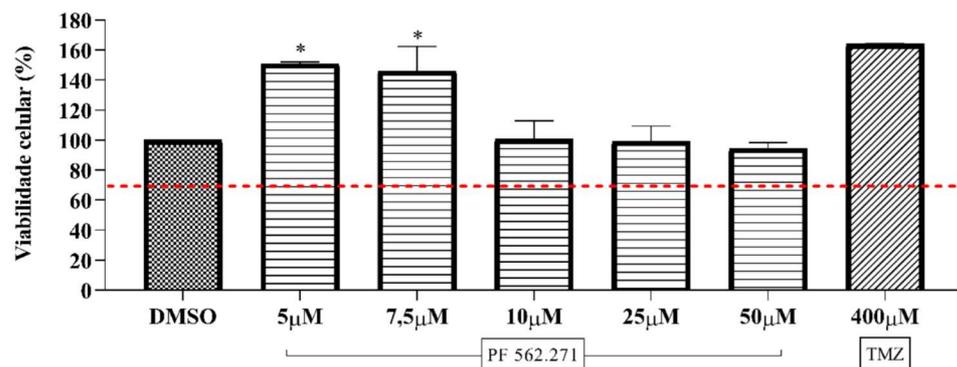
As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 8 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Foram usados regressão linear e ANOVA com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para os ensaios de viabilidade, RT-qPCR e migração; o teste de Dunnett foi utilizado como *post hoc* para ANOVA. Para a linhagem T98G, foi feito o cálculo da concentração inibitória de 50% das células (CI_{50}).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA FAK NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

Os resultados dos ensaios de viabilidade das células U87MG foram obtidos em dois experimentos independentes. Para o tratamento das células de glioblastoma por 6 horas, não houve redução da viabilidade das células nas concentrações testadas (Fig. 10). Em 12 horas, houve diminuição da viabilidade em aproximadamente 35% nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M (Fig.11).

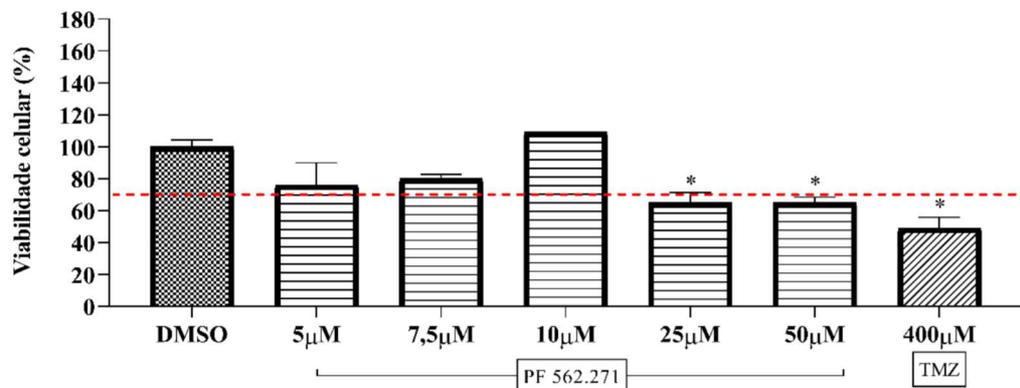
Figura 10 – Avaliação de dose-resposta de PF em células U87MG (6 horas)



Legenda: Linha vermelha: ponto de redução da viabilidade em $\geq 30\%$; *: vs DMSO ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 11 – Avaliação de dose-resposta de PF em células U87MG (12 horas)

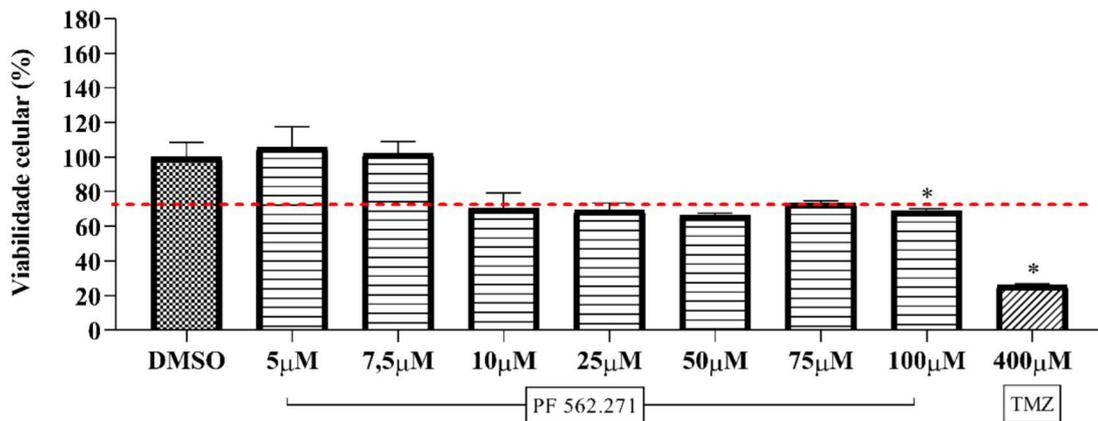


Legenda: Linha vermelha: ponto de redução da viabilidade em $\geq 30\%$; *: vs DMSO ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Em 24 horas, a redução da viabilidade das células foi de aproximadamente 32% para a concentração de 100 μ M (Fig. 12). A partir dos resultados obtidos neste ensaio, foi construída uma curva de regressão para determinar a taxa de redução da viabilidade. Conforme a curva, a cada 1 μ M, a viabilidade das células U87MG é reduzida 0,3581 vezes (Fig. 13).

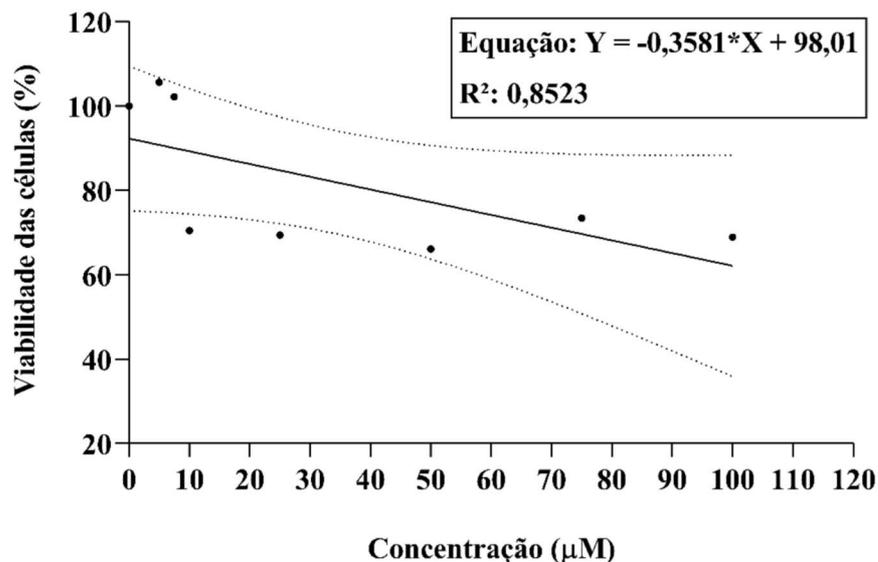
Figura 12 – Avaliação de dose-resposta de PF em células U87MG (24 horas)



Legenda: Linha vermelha: ponto de redução da viabilidade em $\geq 30\%$; *: vs DMSO ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Figura 13 – Curva de regressão viabilidade x concentração de PF (U87MG)

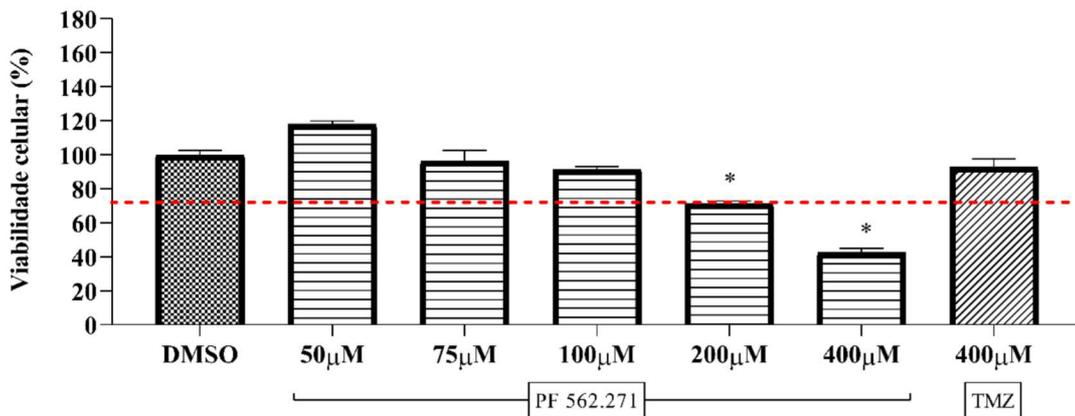


Legenda: As linhas pontilhadas representam as barras de erros (significância de 95%)

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Para as células T98G, foram realizados três experimentos independentes com o tratamento por 24h. Não foram realizados ensaios em tempos de 6h e 12h porque observou-se melhores resultados no tempo de 24h para as células U87MG. Os dados obtidos demonstraram que houve redução na viabilidade de 29% e 58% para as concentrações de 200 μ M e 400 μ M, respectivamente (Fig. 14). A curva de regressão demonstra que, para cada 1 μ M, a viabilidade das células T98G reduziu 0,1845 vezes (Fig. 15).

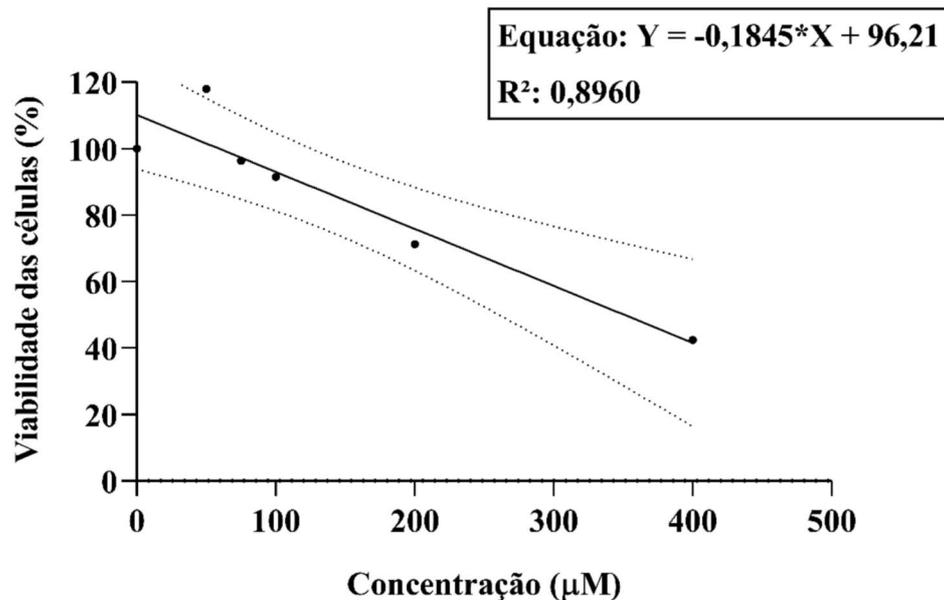
Figura 14 – Avaliação de dose-resposta de PF em células T98G (24 horas)



Legenda: Linha vermelha: ponto de redução da viabilidade em $\geq 30\%$; *: vs DMSO ($p < 0,05$)

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 15 – Curva de regressão viabilidade x concentração de PF (T98G)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A U87MG e a T98G estão dentre as linhagens celulares mais comumente utilizadas para o estudo do glioblastoma (Zalles; Towner, 2021). Em nossos ensaios observou-se que as duas linhagens se comportaram de maneira diferente para o tratamento com o inibidor de FAK. O tratamento das células de glioblastoma U87MG com 100 μ M de PF reduziu 32% da viabilidade das células. Já na linhagem T98G o tratamento com 100 μ M de PF não apresentou redução significativa da viabilidade, apenas no tratamento com 200 μ M de PF observou-se redução significativa da viabilidade celular. Essa diferença na concentração necessária para a redução da viabilidade das células pode ser uma característica inerente das linhagens celulares. De fato, uma das principais diferenças das linhagens reside na resistência à TMZ: enquanto a U87MG apresenta sensibilidade, T98G é descrita como resistente ao fármaco, (Lee, 2016), comportamento que pôde ser observado nos resultados dos ensaios de viabilidade (Figs. 12 e 14).

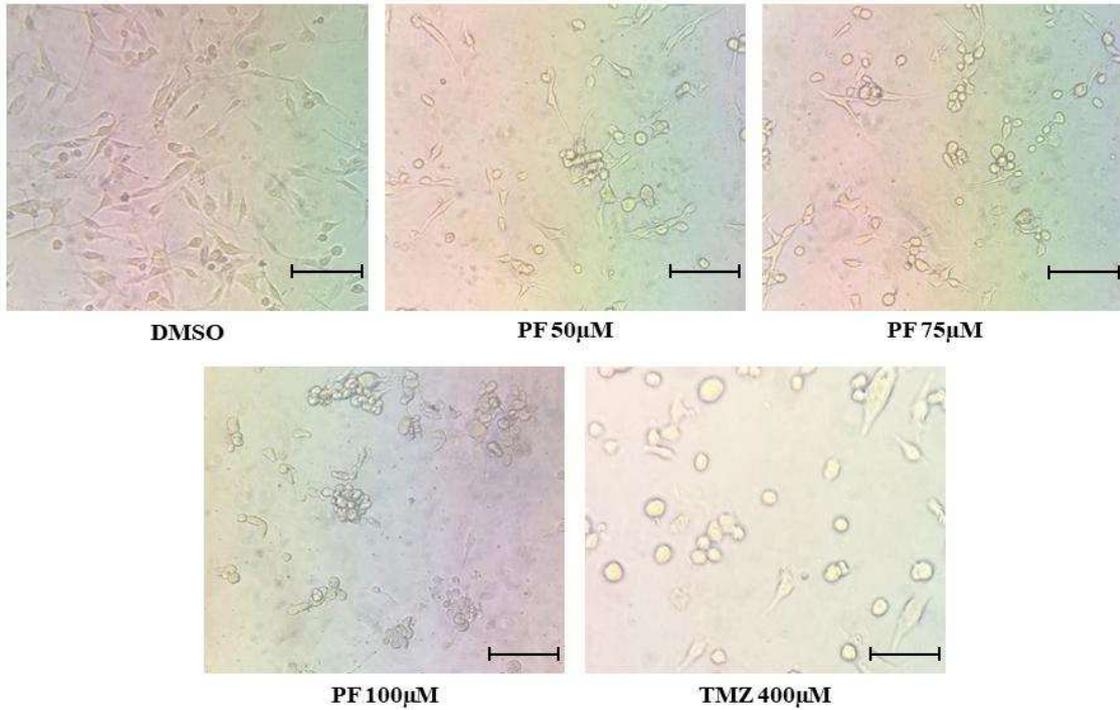
Em estudo com a T98G, Pinevich e colegas (2022) reportaram que apenas a dose máxima de 5 mM de TMZ foram capazes de inibir a proliferação das células, o que pode ser atribuído aos altos níveis de expressão do *MGMT* encontrados em células naturalmente resistentes à TMZ. O *MGMT* é o gene da enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase responsável por reparos do DNA; uma vez que o mecanismo de ação da TMZ consiste na alquilação da dupla fita de DNA pela metilação na posição O⁶ da guanina, a elevada expressão de *MGMT* está diretamente ligada à sua resistência (Lee, 2016; Pinevich et al, 2022).

Contudo, deve-se levar em consideração que no experimento de Pinevich foi utilizado o Temodal[®], medicamento que contém a TMZ em conjunto com outras substâncias que podem afetar a sobrevivência das células (Pinevich et al, 2022). A formação de O⁶-metilguanina não é a única forma de ação da TMZ – na verdade, ela forma N³-metiladeninas em maior quantidade, lesão também tóxica para as células que é reparada exclusivamente pela alquilpurina-DNA-N-glicosilase (APNG) (Agnihotri et al, 2012), cuja super expressão se associou à resistência ao fármaco e a pior prognóstico em pacientes com GBM quando combinada à presença de *MGMT* (Agnihotri et al, 2012). Diante dos resultados obtidos em nosso trabalho, sugere-se que a linhagem U87MG também é mais sensível ao tratamento com o inibidor de FAK quando comparado a linhagem T98G.

A Figura 16 ilustra a morfologia das células U87MG no controle DMSO e após os tratamentos com PF nas concentrações de 50, 75, 100 μ M e com TMZ (400 μ M). Na Figura 17, observa-se a morfologia das células T98G no controle DMSO e após os tratamentos com PF nas concentrações de 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M e com TMZ. Em ambas as linhagens, observou-

se alteração morfológica e redução na quantidade de células após os tratamentos com PF de maneira dependente de dose (Figs. 10, 11, 12, 14), o que é corroborado por Roberts et al (2008).

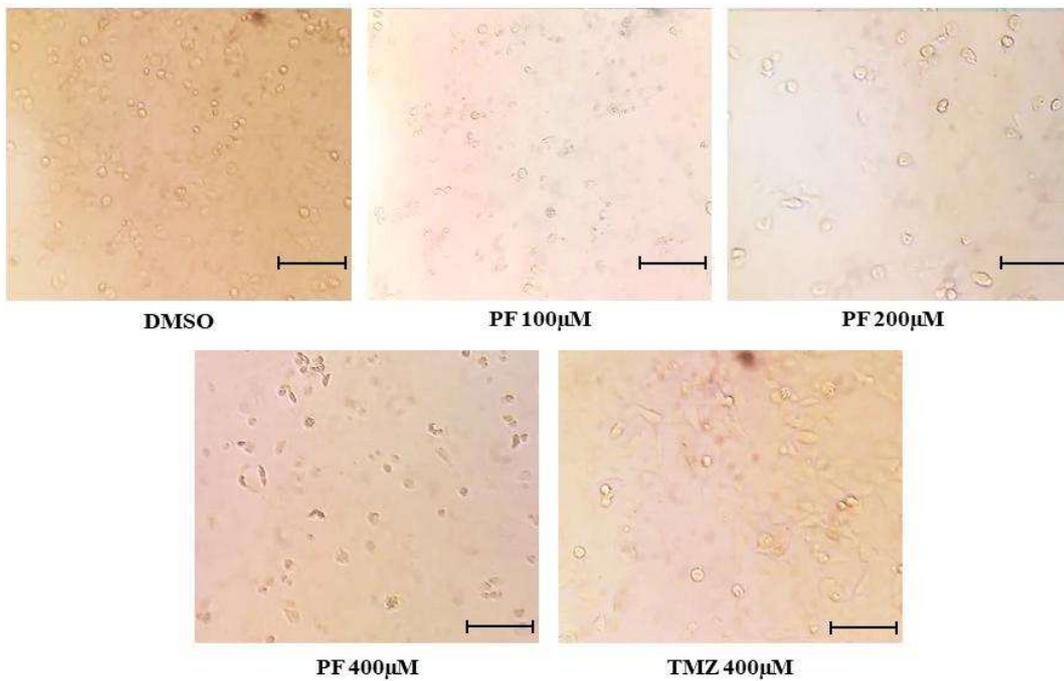
Figura 16 – Viabilidade das células U87MG após tratamentos com DMSO, PF e TMZ (24 horas).



Legenda: barra: aumento 20x

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

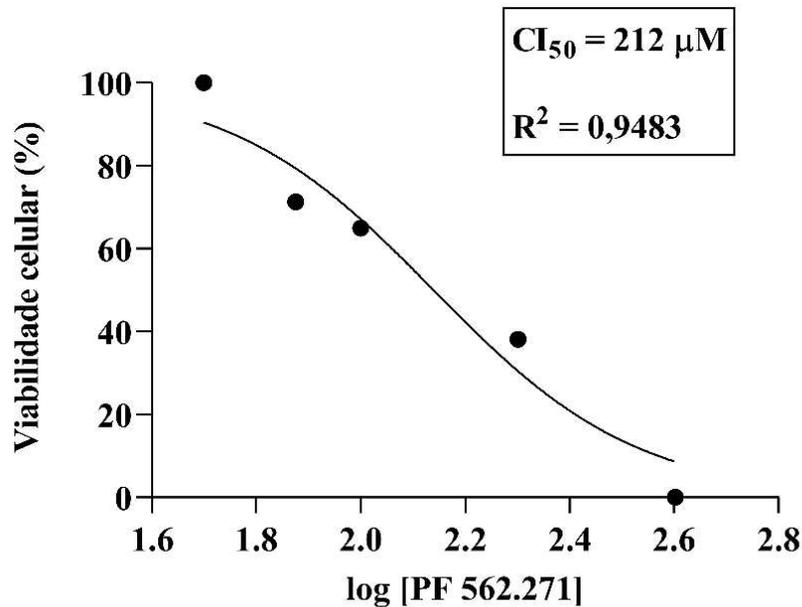
Figura 17 – Viabilidade das células T98G após tratamentos com DMSO, PF e TMZ (24 horas)



Legenda: barra: aumento 20x

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A partir dos resultados da T98G, foi calculada a CI_{50} (Fig. 18), que foi de 212 μM . Não foi realizado o cálculo de CI_{50} para a linhagem U87MG, uma vez que as concentrações utilizadas no ensaio de MTT não reduziram a viabilidade das células abaixo de 50%, o que tornou o cálculo com coeficiente de determinação (R^2) baixo, tornando o dado obtido não confiável. Para os ensaios de viabilidade celular, foram considerados os tratamentos que reduzissem a viabilidade em pelo menos 30%; assim, foi escolhida a concentração do PF de 200 μM , por não ter sido excessivamente citotóxica. Também é importante ressaltar que para os demais ensaios foi utilizado apenas a linhagem T98G, visto que a linhagem U87MG apresentou dificuldades de manutenção para a realização dos demais ensaios.

Figura 18 – CI₅₀ da T98G

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DA FAK NA ATIVIDADE DE FAK E EXPRESSÃO DE α B-CRISTALINA

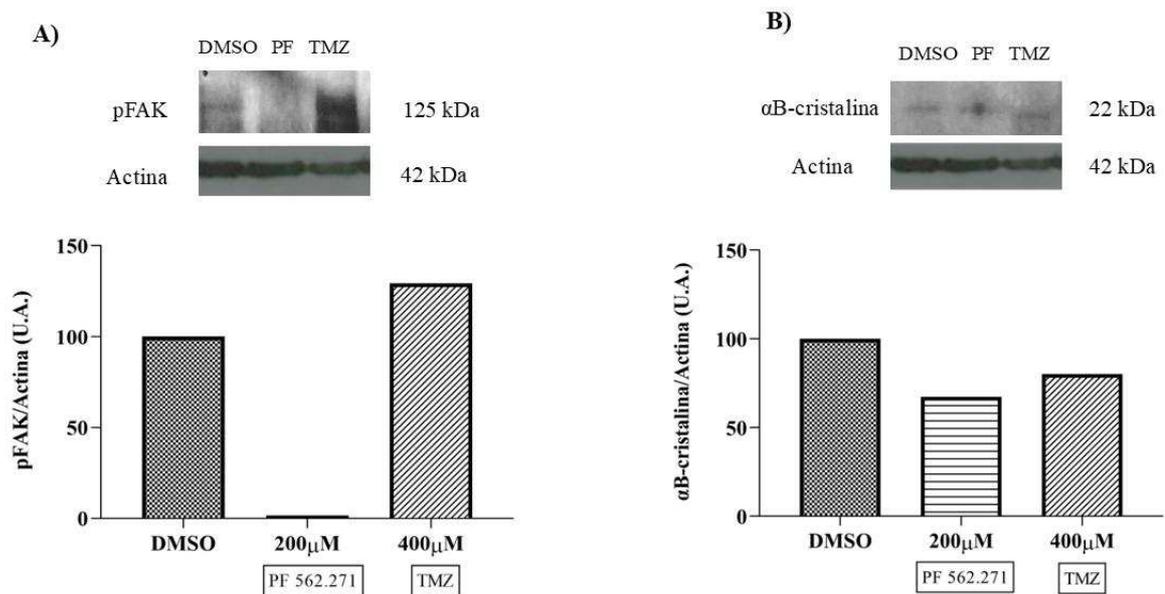
Para avaliar o efeito do tratamento das células de glioblastoma com PF, lisados proteicos controles (DMSO) e tratados com PF (200 μ M) e TMZ (400 μ M) foram utilizados em ensaios de *Western Blotting*. Na fig. 19A, é possível observar que a fosforilação de FAK no resíduo Y397 foi drasticamente reduzida em torno de 98% mediante o tratamento com PF, exibindo o comportamento esperado para o composto, ou seja, inibição da fosforilação da FAK (Wu et al, 2022). Interessantemente, foi observado aumento da fosforilação de FAK no lisado proteico tratado com TMZ de 29%, podendo-se sugerir que o composto ativa as células, sendo um mecanismo de sobrevivência destas.

A fig. 19B demonstra que houve redução em torno de 33% da expressão proteica de α B-cristalina com o tratamento com PF e de aproximadamente 20% com a TMZ. Sabendo-se que o tratamento com PF reduziu a atividade de FAK, pode-se sugerir que a redução dessa atividade interfere na expressão de α B-cristalina, o que torna as células de glioblastoma mais susceptíveis a morte.

A α B-cristalina é uma sHSP que atua como chaperona e antioxidante em condições de estresse, além de ser antiapoptótica (Cai et al, 2024; Zhang et al, 2019). Mutações no gene *CRYAB* estão relacionadas ao desenvolvimento de cânceres, nos quais sua expressão elevada

promove a proliferação, invasão e progressão tumorais ao inibir a apoptose e regular vias ligadas ao ciclo celular (Zhang et al, 2019).

Figura 19 – Avaliação da fosforilação (A) pFAK e da expressão proteica de (B) α B-cristalina



Legenda: U. A.: Unidades Arbitrárias

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DA FAK NA EXPRESSÃO GÊNICA DE FAK, α B-CRISTALINA E CASPASE-3

Por meio dos ensaios de qRT-PCR foi avaliada a expressão gênica de *CRYAB*, *PTK2* (FAK) e *CASPASE-3* (Fig. 20). A concentração de RNA total variou entre 67ng e 72ng/ μ L e a qualidade do RNA para cada tratamento foi avaliada por meio da razão de absorvância 260nm/280nm que foi de 1,5 para o DMSO, 1,350 para o PF e 1,336 para a TMZ.

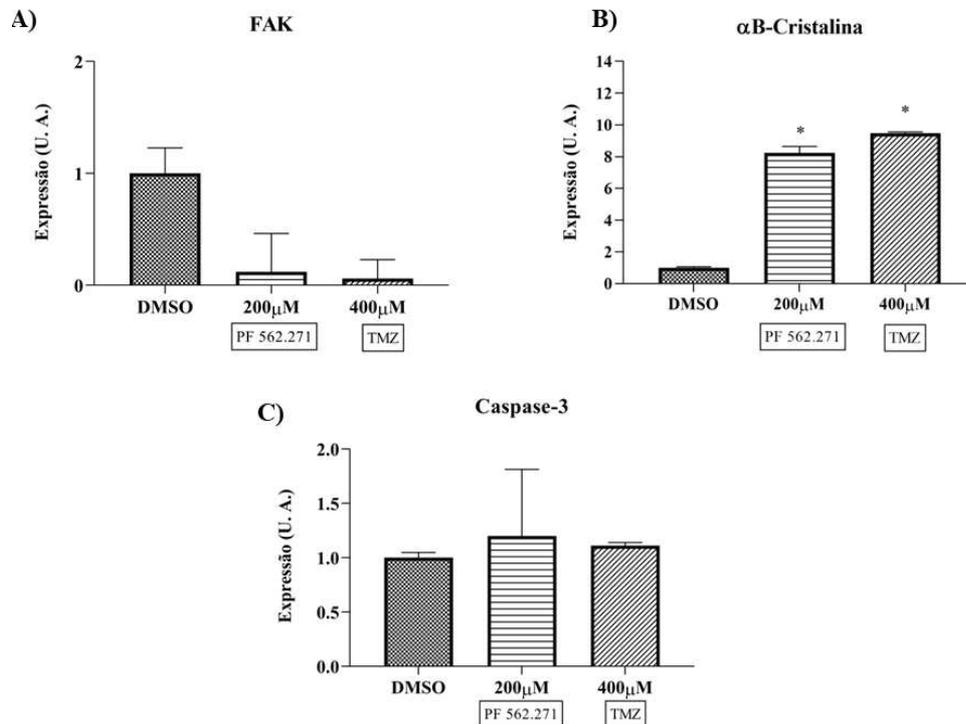
Foi realizado um único experimento com triplicatas para cada tratamento (DMSO, PF, TMZ); os resultados estão expressos em \log_{10} . A partir dos dados obtidos, é possível observar que não houve diferença significativa na expressão da FAK (Fig. 20A). Conjuntamente com os dados obtidos pelo ensaio de *Western Blotting* sugere-se que PF inibe a atividade de FAK e não altera a sua expressão. A expressão da Caspase-3 também não demonstrou alteração. Algumas das formas pelas quais a α B-cristalina impede a apoptose é a inibição da ativação de Caspase-3 por meio de TRAIL e a inibição da maturação de Caspase-3 (Kamradt et al, 2005; Kamradt

et al, 2001). A Caspase-3 é uma caspase efetora que participa das vias intrínseca e extrínseca da apoptose, sendo ativada pela caspase-9 ou -8, e levando à apoptose pela proteólise de alvos celulares importantes (Kamradt et al, 2001).

A α B-cristalina teve sua expressão aumentada em torno de 8 vezes no tratamento com PF, e 9 vezes no tratamento com TMZ (Fig. 20B). A principal explicação reside no fato de a α B-cristalina ser uma sHSP anti-apoptótica, logo aumentando sua expressão gênica em situações de estresse, como previamente discutido (Cai et al, 2024). Sabendo-se disso e a partir dos dados obtidos acredita-se que a inibição da ativação de FAK no tratamento com PF promoveu a morte das células – conforme demonstrado nos ensaios de MTT – que é uma condição de estresse, levando ao aumento da expressão gênica de α B-cristalina – demonstrado nos ensaios de qPCR – na tentativa de sobreviverem.

A expressão do RNA mensageiro (mRNA) da α B-cristalina difere dos níveis de expressão proteicos observados no ensaio de *Western Blotting* (Fig. 19B), resultado semelhante ao reportado por Tang et al (2015), que avaliou a expressão proteica e de mRNA de α B-cristalina e Hsp70 murinas *in vivo e in vitro* sob influência de estresse térmico; em ambos os casos, foi possível observar que apesar dos níveis de mRNA estarem aumentados, os níveis proteicos não seguiam o mesmo padrão, indicando possíveis alterações traducionais (Tang et al, 2015). Assim, acredita-se que apesar de ocorrer aumento da expressão gênica de α B-cristalina, alterações traducionais podem ter levado à redução da expressão proteica da proteína, o que pode estar contribuindo para a redução da viabilidade das células.

Figura 20 – Avaliação da expressão gênica diferencial de *FAK* (A), *CRYAB* (B) e *CASPASE-3* (C) após tratamento das células T98G com PF



Legenda: *: vs DMSO ($p < 0,05$); U. A.: Unidades Arbitrárias.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

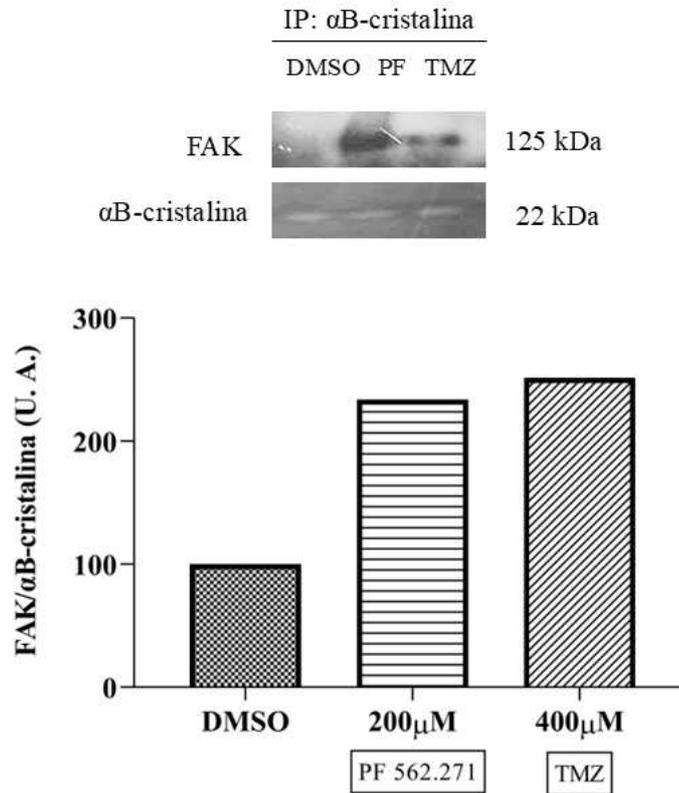
5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA FAK NA INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS FAK E α B-CRISTALINA

Os resultados do ensaio de co-imunoprecipitação estão demonstrados abaixo (Fig. 21). É possível observar que a interação FAK/ α B-cristalina ocorre na presença de PF e TMZ, com aumento significativo no tratamento com PF, ao passo que no controle DMSO o mesmo não aconteceu. Tal resultado está em acordo com Pereira e colaboradores (2014), que reportaram que a interação FAK/ α B-cristalina ocorre em situações de estresse; pode-se observar ainda que a interação ocorre independentemente da fosforilação de FAK, uma vez que o PF a inibe (Fig. 21).

A interação FAK/ α B-cristalina é importante para a sobrevivência das células de glioblastoma (Folly, et al., 2024), contudo a fosforilação da FAK parece ser crucial para a manutenção da viabilidade das células de glioblastoma, visto que o tratamento das células de

glioblastoma com PF reduziu a viabilidade das células mesmo diante da presença da interação. Além disso, a interação FAK/ α B-cristalina ocorreu tanto na presença de PF quanto de TMZ, indicando que a mesma não depende da fosforilação de FAK para ocorrer.

Figura 21 – Avaliação da interação entre FAK e α B-cristalina após tratamento com PF



Legenda: U. A.: Unidades Arbitrárias.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

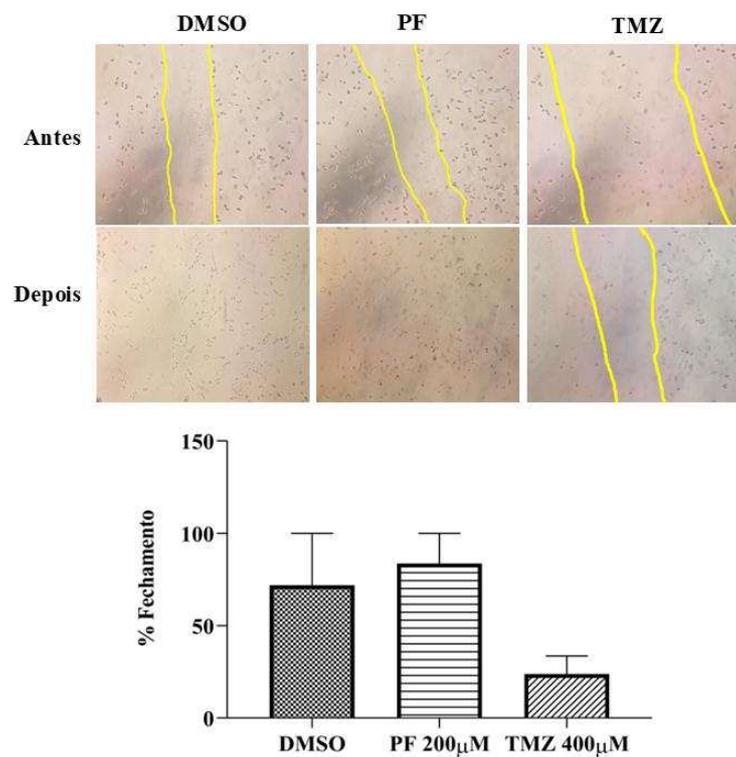
5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA FAK NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

Para avaliar a migração das células T98G, foram realizados dois testes de ranhura, cujos resultados encontram-se na Figura 21. A análise estatística não indicou diferença significativa dos tratamentos (PF e TMZ) para o controle (DMSO), nem entre os tratamentos.

Em complexos de adesão, a autofosforilação de FAK leva ao recrutamento das Src quinases, que interagem com a FAK, originando uma cascata de sinalização que ativa as demais moléculas do complexo de adesão (Cance; Golubovskaya, 2008). Horton et al (2016) observaram que a ausência da fosforilação do complexo FAK-Src não alterava a composição dos complexos de adesão – contudo, as vias de sinalização de adesão, migração e proliferação

foram reduzidas (Horton et al, 2016). De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que as células T98G foram capazes de migrar mediante o tratamento com PF; o que pode ser justificado pela ação de outras proteínas relacionadas a adesão e que passem a realizar o papel da FAK, bem como a ausência da fosforilação de FAK não estar relacionada à composição do complexo de adesão. Com relação à TMZ, as células T98G apresentam resistência natural ao composto, evidenciada pela expressão de *MGMT* (Pinevich et al, 2022).

Figura 22 – Avaliação da migração das células T98G após tratamento com PF



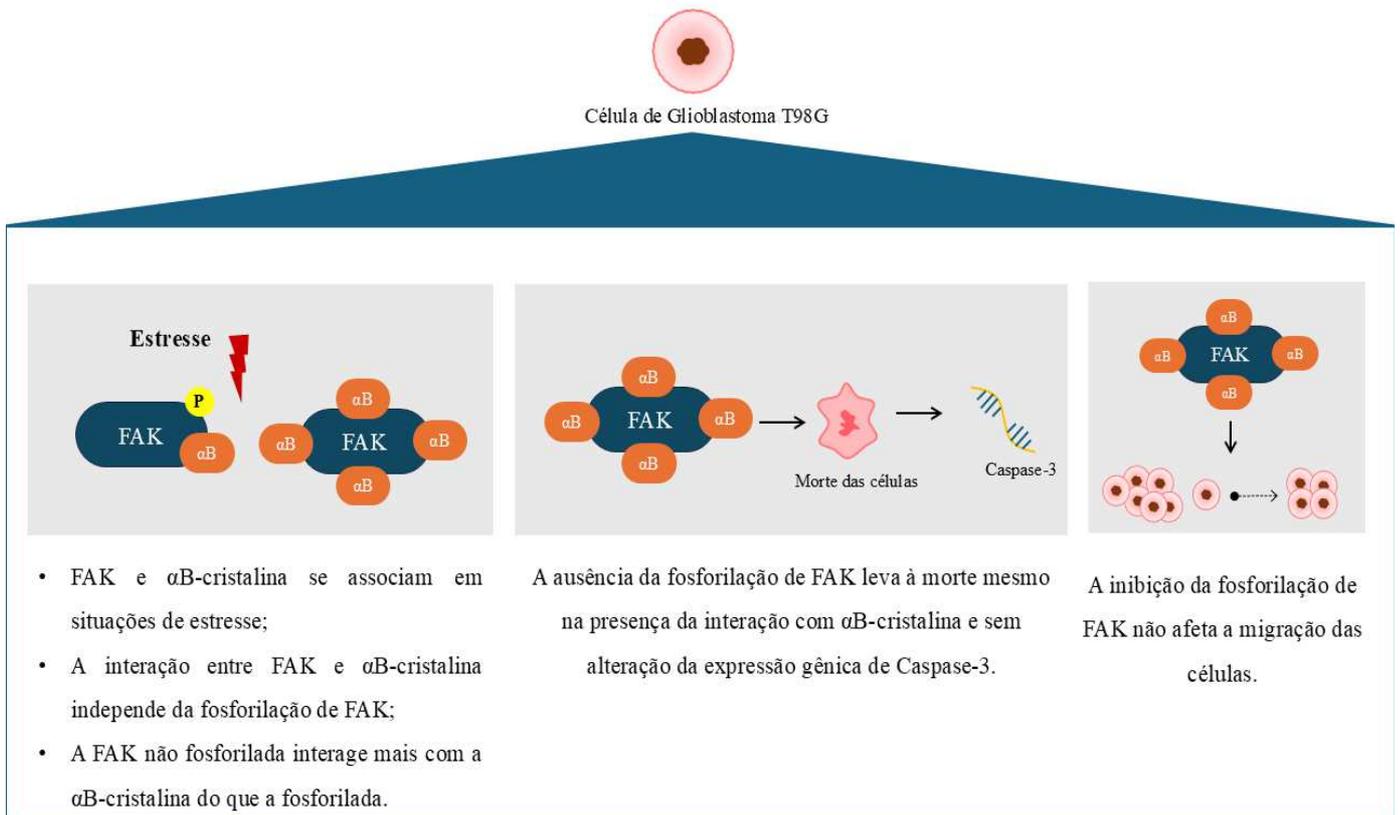
Imagens: Aumento de 40x.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que a inibição da fosforilação de FAK não afeta sua interação com a α B-cristalina, logo, a interação não é dependente da atividade quinase de FAK; ao mesmo tempo, a fosforilação da tirosina quinase demonstrou-se crucial para a sobrevivência das células T98G mesmo na presença de FAK/ α B-cristalina, que já foi constatada como sendo importante para a sobrevivência das células de glioblastoma (Folly et al, 2024). A inibição da fosforilação de FAK reduziu drasticamente a viabilidade das células T98G sem afetar a expressão gênica de FAK e Caspase-3, nem sua

migração, indicando que a ausência de fosforilação age de forma independente em cada evento. Tais resultados estão dispostos na Figura 23.

Figura 23 – Principais resultados do trabalho



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

6. CONCLUSÃO

Os experimentos realizados demonstraram que a inibição da fosforilação de FAK pelo composto PF 562.271 em células de Glioblastoma Multiforme *in vitro* diminuiu consideravelmente sua viabilidade sem afetar a expressão de FAK e Caspase-3. A migração também não foi afetada mediante inibição da fosforilação de FAK; destarte, a fosforilação de FAK apresenta diferentes efeitos na sobrevivência e migração das células T98G, demonstrando ações independentes para cada evento.

A interação entre FAK e α B-cristalina não foi afetada mediante a inibição da fosforilação de FAK, indicando que a interação não depende da atividade quinase da proteína – contudo, a ausência da fosforilação de FAK reduziu a viabilidade das células T98G mesmo na presença da interação, o que demonstra que a fosforilação de FAK é crucial para a sobrevivência das células.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo demonstram o efeito da inibição da ativação da FAK na interação com a α B-cristalina e na sobrevivência e migração de células de GBM, indicando-a como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da doença. Futuramente, pretende-se repetir os ensaios de RT-qPCR a fim de se confirmar os resultados obtidos, além de complementá-los por meio da análise da expressão proteica de FAK, Caspase-3 clivada e PARP clivada, dois marcadores de apoptose.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. et al. Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 253–266, 2012.
- AGUIRRE-CRUZ, L. et al. Epidemiología descriptiva y cambios en la frecuencia de tumores astrocíticos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México. **Salud Pública de México**, v. 62, n. 3, p. 255-261, 2020.
- ALEXANDER, B. M.; CLOUGHESY, T. F. Adult Glioblastoma. **JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY**, v. 21, n.35, p. 2402-2409, 2017.
- BHAT, S. P. et al. Ectopic expression of α B-crystallin in Chinese hamster ovary cells suggests a nuclear role for this protein. **European Journal of Cell Biology**, v. 78, n. 2, p. 143–150, 1999.
- BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 4 abr. 2024.
- BRENNAN, C. W. et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 462–477, 2013.
- CAI, H.-B. et al. Single cell sequencing revealed the mechanism of CRYAB in glioma and its diagnostic and prognostic value. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1336187, 2024.
- CANCE, W. G.; GOLUBOVSKAYA, V. M. Focal Adhesion Kinase Versus p53: Apoptosis or Survival? **Science Signaling**, v. 1, n. 20, 2008.
- CANEL, M. et al. FAK suppresses antigen processing and presentation to promote immune evasion in pancreatic cancer. **Gut**, v. 73, n. 1, p. 131–155, 2023.
- CAPOROSSI, D. et al. AlphaB-crystallin and breast cancer: role and possible therapeutic strategies. **Cell Stress and Chaperones**, v. 26, n. 1, p. 19–28, 2021.
- CHAUHAN, A.; KHAN, T. Focal adhesion kinase—An emerging viable target in cancer and development of focal adhesion kinase inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 97, n. 3, p. 774–794, 2021.
- CHELOUCHE-LEV, D. et al. α B-crystallin as a marker of lymph node involvement in breast carcinoma. **Cancer**, v. 100, n. 12, p. 2543–2548, 2004.
- CHEN, A. T. et al. Cross-platform analysis reveals cellular and molecular landscape of glioblastoma invasion. **Neuro-Oncology**, v. 25, n. 3, p. 482–494, 2023.
- CHENG, L. et al. The role of CRYAB in tumor prognosis and immune infiltration: A Pan-cancer analysis. **Frontiers in Surgery**, v. 9, p. 1117307, 2023.
- CHUANG, H.-H. et al. FAK in Cancer: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1726, 2022.

- DAI, A. et al. Effects of the CRYAB gene on stem cell-like properties of colorectal cancer and its mechanism. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 18, n. 5, p. 1328, 2022.
- DANDY, W. E. REMOVAL OF RIGHT CEREBRAL HEMISPHERE FOR CERTAIN TUMORS WITH HEMIPLEGIA. **Journal of the American Medical Association**, v. 90, n. 11, p. 823, 17 mar. 1928.
- DAVIS, M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 20, n. 5, p. S2–S8, 2016.
- DAWSON, J. C. et al. Targeting FAK in anticancer combination therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 5, p. 313–324, 2021.
- DUNN, G. P. et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. **Genes & Development**, v. 26, n. 8, p. 756–784, 2012.
- FABIAN, D. et al. Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. **Cancers**, v. 11, n. 2, p. 174, 2019.
- FOLLY, M. L. D. C. et al. Interaction between FAK/ α B-crystalline is important for viability of the glioblastoma cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. e23380, 2024.
- FRAME, M. C. et al. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 802–814, 2010.
- FRESNAIS, M. et al. Approaching Sites of Action of Temozolomide for Pharmacological and Clinical Studies in Glioblastoma. **Biomedicines**, v. 10, n. 1, p. 1, 2021.
- GOLUBOVSKAYA, V. M. et al. Pharmacologic Blockade of FAK Autophosphorylation Decreases Human Glioblastoma Tumor Growth and Synergizes with Temozolomide. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 162–172, 2013.
- GOLUBOVSKAYA, V. Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials. **Frontiers in Bioscience**, v. 19, n. 4, p. 687, 2014.
- GOPLEN, D. et al. α B-Crystallin Is Elevated in Highly Infiltrative Apoptosis-Resistant Glioblastoma Cells. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 4, p. 1618–1628, 2010.
- GOUSIAS, K.; THEOCHAROUS, T.; SIMON, M. Mechanisms of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 564, 2022.
- GUO, Y. et al. Extracellular α B-crystallin modulates the inflammatory responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 508, n. 1, p. 282–288, 2018.
- HANIF, F. et al. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, 2017.
- HAO, H. et al. Focal adhesion kinase as potential target for cancer therapy (Review). **Oncology Reports**, v. 22, n. 05, 2009.
- HORTON, E. R. et al. Modulation of FAK and Src adhesion signaling occurs independently of

- adhesion complex composition. **Journal of Cell Biology**, v. 212, n. 3, p. 349–364, 1 fev. 2016.
- HU, C. et al. Antitumor effect of focal adhesion kinase inhibitor PF 562271 against human osteosarcoma *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Science**, v. 108, n. 7, p. 1347–1356, 2017.
- JIANG, H. et al. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. **Nature Medicine**, v. 22, n. 8, p. 851–860, 2016.
- JUSTUS, C. R. et al. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 88, 1 jun. 2014.
- KAMRADT, M. C.; CHEN, F.; CRYNS, V. L. The Small Heat Shock Protein α B-Crystallin Negatively Regulates Cytochrome c- and Caspase-8-dependent Activation of Caspase-3 by Inhibiting Its Autoproteolytic Maturation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16059–16063, 2001.
- KAMRADT, M. C. et al. The Small Heat Shock Protein α B-crystallin Is a Novel Inhibitor of TRAIL-induced Apoptosis That Suppresses the Activation of Caspase-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11059–11066, 2005.
- KANG, C.-C. et al. Single-Cell Western Blotting after Whole-Cell Imaging to Assess Cancer Chemotherapeutic Response. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 20, p. 10429–10436, 2014.
- KHABIBOV, M. et al. Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). **International Journal of Oncology**, v. 60, n. 6, p. 69, 2022.
- KORE, R. A.; ABRAHAM, E. C. Inflammatory cytokines, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, upregulated in glioblastoma multiforme, raise the levels of CRYAB in exosomes secreted by U373 glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 3, p. 326–331, 2014.
- LAH, T. T.; NOVAK, M.; BREZNIK, B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 60, p. 262–273, 2020.
- LAKOMY, R. et al. Real-World Evidence in Glioblastoma: Stupp’s Regimen After a Decade. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 840, 2020.
- LEE, J. et al. Conditional Deletion of the Focal Adhesion Kinase FAK Alters Remodeling of the Blood–Brain Barrier in Glioma. **Cancer Research**, v. 70, n. 24, p. 10131–10140, 2010.
- LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 3, p. 198–210, 2016.
- LIETHA, D. et al. Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. **Cell**, v. 129, n. 6, p. 1177–1187, 2007.
- LIM, S.-T. et al. Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation. **Molecular Cell**, v. 29, n. 1, p. 9–22, 2008.
- LOUIS, D. N. et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2021.

- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 2012.
- MARTÍNEZ, P.; LÓPEZ NAVAJAS, P.; LIETHA, D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 179, 2020.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOYANO, J. V. et al. α B-Crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 261–270, 2006.
- NABORS, L. B. et al. Central Nervous System Cancers, Version 3.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 18, n. 11, p. 1537–1570, 2020.
- NAKADA, M. et al. Aberrant Signaling Pathways in Glioma. **Cancers**, v. 3, n. 3, p. 3242–3278, 2011.
- NATARAJAN, M.; HECKER, T. P.; GLADSON, C. L. FAK Signaling in Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Tumors: **The Cancer Journal**, v. 9, n. 2, p. 126–133, 2003.
- NUÑEZ, R. E. et al. Microglial Cytokines Induce Invasiveness and Proliferation of Human Glioblastoma through Pyk2 and FAK Activation. **Cancers**, v. 13, n. 24, p. 6160, 2021.
- OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p. 1133–1143, 2021.
- OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Research**, n. 64, p. 6892–6899, 2004.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764–772, 2013.
- OLIVEIRA, J. D.; WOLF, J. M.; GRIVICICH, I. Caracterização epidemiológica das neoplasias do sistema nervoso central em pacientes da região Norte do Brasil. **Clinical & Biomedical Research**, 2023.
- ONISHI, M. et al. Angiogenesis and invasion in glioma. **Brain Tumor Pathology**, v. 28, n. 1, p. 13–24, 2011.
- ORTIZ-RIVERA, J. et al. The PYK2 inhibitor PF-562271 enhances the effect of temozolomide on tumor growth in a C57Bl/6-Gl261 mouse glioma model. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 161, n. 3, p. 593–604, 2023a.
- ORTIZ-RIVERA, J. et al. Pyk2/FAK Signaling Is Upregulated in Recurrent Glioblastoma Tumors in a C57BL/6/GL261 Glioma Implantation Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 17, p. 13467, 30 ago. 2023b.
- OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016—2020. **Neuro-Oncology**, v. 25, n.

Supplement_4, p. iv1–iv99, 2023.

PAN, Q. et al. FAK inhibitor PF-562271 inhibits the migration and proliferation of high-grade serous ovarian cancer cells through FAK and FAK mediated cell cycle arrest. **Medical Oncology**, v. 40, n. 8, p. 215, 2023.

PANG, X.-J. et al. Drug Discovery Targeting Focal Adhesion Kinase (FAK) as a Promising Cancer Therapy. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4250, 2021.

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

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

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

RAPÔSO, C; VITORINO-ARAÚJO, J.L.; BARRETO, N. Molecular Markers of Gliomas to Predict Treatment and Prognosis: Current State and Future Directions. In: Gliomas. Debinski W (Editor). Exon Publications, Brisbane, Australia, 2021, p.171-183.

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

ROLÓN-REYES, K. et al. Microglia Activate Migration of Glioma Cells through a Pyk2 Intracellular Pathway. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0131059–e0131059, 22 jun. 2015.

SANTOS, A. M. et al. FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 102–110, 2011.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 8 jan. 2020.

SILVA, C. N. et al. Analysis of the Epidemiological Profile of Glioblastomas in Brazil Between 2012 and 2021: evidence and challenges for public health. **JBNC - Jornal Brasileiro De Neurocirurgia**, v. 35, n. 1, p. 66–74, 2024.

SINGH, N. et al. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. **Cancer Drug Resistance**, n.4, p. 17-43, 2021.

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

SPALLAROSSA, A. et al. The Development of FAK Inhibitors: A Five-Year Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6381, 7 jun. 2022.

STEPANENKO, A. A. et al. Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells. **Cancer Cell International**, v. 16, n. 1, p. 36, 2016.

- STOKES, J. B. et al. Inhibition of Focal Adhesion Kinase by PF-562,271 Inhibits the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer Concomitant with Altering the Tumor Microenvironment. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 11, p. 2135–2145, 2011.
- STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, n. 352, p. 987-996, 2005.
- STUPP, R. et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 318, n. 23, p. 2306, 2017.
- SULZMAIER, F. J.; JEAN, C.; SCHLAEPFER, D. D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 9, p. 598–610, 2014.
- SUN, Y.; MACRAE, T. H. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 21, p. 2460–2476, 2005.
- TAN, A. C. et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 4, p. 299–312, jul. 2020.
- TAN, L. et al. High α B-crystallin and p53 co-expression is associated with poor prognosis in ovarian cancer. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 6, p. BSR20182407, 2019.
- TANG, S. et al. Expression profiles of heat shock protein 27 and α B-crystallin and their effects on heat-stressed rat myocardial cells in vitro and in vivo. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 2, p. 1633–1638, 17 dez. 2015.
- TAO, X. et al. Expression of CRYAB with the angiogenesis and poor prognosis for human gastric cancer. **Medicine**, v. 98, n. 45, p. e17799, 2019.
- TOUAT, M. et al. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 7, p. 1457–1472, 2017.
- TRESCH, N. S. et al. Temozolomide is additive with cytotoxic effect of irradiation in canine glioma cell lines. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 6, p. 2124–2134, 2021.
- TYKOCKI, T.; ELTAYEB, M. Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 54, p. 7–13, 2018.
- VALADARES, A. D. et al. Perfil Anatomopatológico e Imuno-histoquímico de Gliomas de Pacientes da Região de Maringá-PR. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 3, 2021.
- VAN NIMWEGEN, M. J.; VAN DE WATER, B. Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 597–609, 2007.
- WELLER, M. et al. Glioma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15017, 2015.
- WEN, P. Y, KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults. **N Engl J Med**, n. 359, p.492-507, 2008.
- WISNIEWSKI, T.; GOLDMAN, J. E. α B-Crystallin is Associated with Intermediate Filaments in Astrocytoma Cells. **Neurochemical Research**, v. 23, n. 3, p. 385-392, 1998.

WU, W. et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. **Pharmacological Research**, v. 171, p. 105780, 2021.

WU, X. et al. Recent progress on FAK inhibitors with dual targeting capabilities for cancer treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 151, p. 113116, 2022.

WU, Y. et al. Focal adhesion kinase inhibitors, a heavy punch to cancer. **Discover Oncology**, v. 12, n. 1, p. 52, 2021.

YOON, H. et al. Understanding the Roles of FAK in Cancer: Inhibitors, Genetic Models, and New Insights. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 63, n.2, p.114-128, 2015.

ZALLES, M; TOWNER, R.A. Pre-Clinical Models and Potential Novel Therapies for Glioblastomas. In: **Gliomas**. Debinski W (Editor). Exon Publications, Brisbane, Australia, 2021, p.1-13.

ZHANG, J. et al. Progression of the role of CRYAB in signaling pathways and cancers. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 12, p. 4129–4139, 2019.

ZHOU, J.; YI, Q.; TANG, L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 250, 2019.