



GLIOBLASTOMA MULTIFORME: UMA REVISÃO DA PATOGENIA, TRATAMENTO E INOVAÇÃO CIENTÍFICA PARA TESTES *IN VITRO*

LAÍS MACÊDO MACIEL; CAIO VICTOR BARROS GONÇALVES DA SILVA; ALINE KAROLINE CAMPELO DE SOUZA; MANUELLE ALVES MIRANDA; MAYZA JENNIFER DA SILVA GOMES

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e é ainda mais mortal quando se atinge o tecido nervoso. Nessa perspectiva, o glioblastoma multiforme (GBM), pertencente ao grupo de gliomas, é um tumor maligno primário e incurável. Os pacientes com GBM apresentam cefaléia, déficits neurológicos, confusão, perda de memória, alterações de personalidade ou com convulsões. Desse modo, incessantes pesquisas são feitas com o fito de mitigar o sofrimento desses pacientes e aumentar a sobrevida. Nesse contexto, o objetivo desta revisão de literatura, foi trazer o uso de novas formas de pesquisa para elucidação da patogenia e testes farmacológicos com o uso dos *scaffolds* de quitosana-ácido hialurônico, na análise da reatividade das células cancerígenas as formas atuais e novas de terapias, em um microambiente tumoral mais próximo da realidade. A pesquisa foi realizada utilizando as palavras chave "*scaffolds*", "temozolamida", "biomarcadores" e "astrocitoma grau IV", consultando-se as plataformas Pubmed, Nature e Springer, numa ampla de países, em busca de abordagem da patogenia, tratamento, biomarcadores e novas terapias. Os dados encontrados na literatura trazem uma análise da patogenia do glioblastoma, que se baseia em mutações TP53 em glioblastomas secundários e primário com o receptor de EGF (EGFR) superexpresso. Além disso, os dados encontrados trouxeram uma inovação, no uso de *scaffolds* 3D porosos com quitosana-ácido hialurônico, para mimetizar o microambiente tumoral, permitindo assim a pesquisa *in vitro* mais realista para fármacos e para um entendimento do mecanismo tumorigênese. Nesse sentido, foi observado que, um aumento no teor de polímero levou a uma maior densidade, menor porosidade e maior módulo de compressão. Com isso, representam uma ferramenta útil para a cultura *in vitro* de células GBM. Por fim, é válido afirmar que novas pesquisas tem sido relevantes na busca de inovações para teste de fármacos e comparação dos atuais protocolos.

Palavras-chave: "Tumor cerebral"; "*Scaffolds*"; "Quitosana"; "Temozolamida"; "Ácido hialurônico".

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Sendo um problema para vida de muitos. A doença surge da transformação de células normais em células tumorais em um processo de vários estágios, levando a um tumor maligno. O glioblastoma multiforme (GBM) é um tumor cerebral maligno primário e altamente invasivo, cresce e se espalha rapidamente, criando pressão intracraniana. Com sobrevida mundial de apenas 15 meses para os pacientes, se mostrando como um problema de saúde pública. Logo, novas formas de tratamento precisam ser desenvolvidas. Atualmente, com o advento de novas tecnologias, pode-se desenvolver formas de estudo *in vitro* com eficiência, mimetizando o cérebro, para

pesquisar novas terapias farmacológicas, melhorar a qualidade de vida dos pacientes, e ainda elucidar de forma mais ampla a etiopatogenia da doença. Além disso, o entendimento do microambiente tumoral do GBM traz uma melhor visão da transformação celular possível metástase (Jacob e Dinca 2009; Ferlay J et al. 2020).

Em vista disso, o objetivo desta revisão de literatura, foi demonstrar a relevância epidemiológica do GBM e a necessidade de novas formas de tratamentos para elucidação da patogenia, com auxílio de novas técnicas como o uso dos *scaffolds* de quitosana-ácido hialurônico, na análise da reatividade das células cancerígenas as formas atuais e novas de terapias, em um microambiente tumoral mais próximo da realidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão sistemática com as palavras-chave "*scaffolds*", "temozolamida", "biomarcadores" e "astrocitoma grau IV", consultando-se as plataformas Pubmed, Nature e Springer, numa ampla de países. Foram encontrados 50 publicações, dos quais 22 foram selecionadas, os critérios de inclusão, foram artigos de língua inglesa, dos últimos 20 anos, com abordagem da patogenia, tratamento, epidemiologia, biomarcadores e novas terapias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Epidemiologia, mortalidade e qualidade de vida dos pacientes

A idade é fator no desenvolvimento de doenças como o câncer. Portanto, a idade afeta significativamente a incidência de Glioblastoma multiforme, onde a grande maioria dos casos ocorre em pessoas com mais de 40 anos. Para 47,9% dos pacientes, a idade do diagnóstico de GBM foi maior que 65 anos, e 46,3% tinham entre 40 e 64 anos (Li et al. 2018).

A incidência global inferior a 10 por 100.000 pessoas, apesar de raro, seu prognóstico é ruim com sobrevida de 14-15 meses após o diagnóstico, tornando um problema de saúde pública. Os gliomas malignos são a razão de 2,5% das mortes por câncer e são a terceira principal causa de morte por câncer em pessoas de 15 a 34 anos. Além disso, a proporção de incidência de GBM é maior em homens do que em mulheres. Ademais, o ocidente tem maior incidência de gliomas do que os países menos desenvolvidos, pode esta relacionada a subnotificação de casos de gliomas, acesso limitado aos cuidados de saúde e diferenças nas práticas de diagnóstico. Alguns estudos mostraram que os negros são menos propensos, e a incidência de GBM é maior em outros grupos étnicos, como, asiáticos, latinos e brancos (Thakkar et al. 2014).

Clinicamente, os pacientes com GBM podem apresentar cefaléia, déficits neurológicos, confusão, perda de memória, alterações de personalidade ou com convulsões. O comprometimento do funcionamento neurocognitivo, resultando em dificuldades, ocorre em quase todos os pacientes com tumores cerebrais, eventualmente, compromete sua independência. Esse comprometimento tem relação com vários fatores, incluindo o próprio tumor, epilepsia relacionada ao tumor, tratamento e fatores relacionados ao paciente (idade, sofrimento psicológico) (Palmer et al. 2021; Henriksson, Asklund, e Poulsen 2011).

Nos últimos anos, de 2019 a 2022, o mundo vivenciou uma pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, o que também afetou o tratamento e a qualidade de vida dos pacientes com GBM no Brasil e provavelmente no resto no mundo (Lu, Stratton, e Tang 2020; Batistella et al. 2021).

3.2 Fatores de risco, patogenia e resistência

O desenvolvimento do glioblastoma multiforme tem relação com causas ambientais exógenas, como a exposição a radiação terapêutica ou de alta dose, fatores como cloreto de vinilo ou pesticidas, fumo, refinação de petróleo e emprego na fabricação de borracha sintética. Fatores adicionais, como exposição a campos eletromagnéticos residenciais e formaldeído. Um pequeno subgrupo (5%) de pacientes com gliomas, está associado a algumas síndromes hereditárias (Farrell e Plotkin 2007).

Glioma é um termo genérico usado para descrever tumores cerebrais primários. O glioblastoma multiforme (GBM) é o glioma mais comum em adultos, cerca de 60% de todos os tumores cerebrais em adultos. Atualmente, são classificados de acordo com sua suposta célula de origem e características histológicas de malignidade. Recentemente a OMS adotou uma nova abordagem, ao integrar marcadores moleculares no processo diagnóstico (Louis et al. 2021; Alifieris e Trafalis 2015)

O GBM, é geralmente descrito em duas formas clínicas diferentes, GBM primário e GBM secundário. GBM primário, é a forma mais comum (cerca de 95%) e surge tipicamente de novo, dentro 3-6 meses, em pacientes mais velhos. O GBM secundário surge de astrocitomas anteriores de baixo grau em pacientes mais jovens. Mutações TP53 foram consideradas comuns em glioblastomas secundários, diferente do glioblastoma primário que obteve superexpresso o receptor de EGF (EGFR). Enquanto as formas primárias e secundárias apresentam algumas diferenças moleculares, as formas finais o resultado é praticamente o mesmo, pois os mesmos caminhos são afetados e respondem de forma semelhante ao tratamento padrão atual. Levando ao aumento da atividade do receptor de tirosina quinase (TKR) e a ativação das vias RAS e PI3K. O GBM principal muitas vezes tem receptor do fator de crescimento epidérmico amplificado e mutado (EGFR) que codifica EGFR alterado (EGFvIII), que pode induzir células vizinhas a se transformarem em fenótipos semelhantes a GBM. Microvesículas carregando EGFRvIII, podem transferir o receptor oncogênico para induzir a atividade de EGFRvIII na célula. Enquanto o GBM secundário, aumenta a sinalização através do receptor PDGF-A. Novamente, GBM primário têm comumente amplificação do gene MDM2 (codifica inibidor de p53), mutações PTEN e deleções homocigóticas de CDKN2A. Por fim, a progressão do glioma de baixo grau para alto grau está associada à inativação do gene do retinoblastoma (RB1) e aumento atividade do *human double minute 2* (HDM2) (Watanabe et al. 1996).

A perda do controle do ciclo celular está envolvido na patogênese. Isso porque as células passam por vários processos coordenados em seu ciclo de vida. A regulação do ciclo celular através de pontos de checagem é a chave para o crescimento e diferenciação normais. No entanto, o checkpoint G1 que faz a passagem da fase G1 para fase S do ciclo celular, tem sido um foco de pesquisa em GBMs, envolvendo as ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDK). A grande maioria dos GBMs mostra alteração em pelo menos um componente dessa via chamada p16INK4a/CDK-4/Retinoblastoma 1 (RB1). Normalmente, a ciclina D1 ativa CDK-4, que fosforila RB1, um oncogene, e causa a liberação do fator de transcrição E2F, que inicia a transição G1/S. Em 78% dos pacientes com glioblastoma, a expressão de RB é regulada negativamente.(Cancer Genome Atlas Research Network 2008; Sherr e Roberts 1999).

As células transformadas usam vários mecanismos para contornar a vigilância imunológica. As células endoteliais associadas ao GBM criam uma barreira imunológica ao redor do microambiente do tumor, modulando os checkpoints imunológicos. Uma proteína de checkpoint imunológico chamada CD200 foi associada a esse processo. CD200 causa supressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL2 e IFN γ .

Outro mecanismo imunossupressor utilizado pelo GBM é a supressão da função das células dendríticas (DC) que desempenha um papel integral no início da resposta imune adaptativa, pela captação e apresentação de antígenos e co-estimulação de células T. Os

microambientes de glioblastoma contêm fatores que podem potencialmente suprimir a função da DC; fator de crescimento beta (TGF- β) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). Com esses tipos de adaptações, os GBMs conseguem permanecer fora do alcance do sistema imunológico e continuar a proliferar (Xiong et al. 2016).

A deficiência de reparo de danos no DNA (DDRd) cria alterações de nucleotídeos previsíveis e rastreáveis no código genético do tumor, tornando-se um fator crucial no desenvolvimento de resistência à terapia e recidiva do tumor. Consequentemente, compreender e tirar proveito dos DDRds pode ajudar a desenvolver novas estratégias terapêuticas (Dean, Fojo, e Bates 2005).

3.3 Diagnóstico e tratamento com auxílio de biomarcadores

A ressonância magnética (RM) é a forma de diagnóstico padrão, em imagens dos tumores cerebrais, onde se define os limites das lesões, incluindo tamanho, forma e localização dos tumores. Junto a isso, o uso de tecnologia adjunta como ressonância magnética com contraste dinâmico, imagem de perfusão, próton espectroscopia de ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons. Os atuais tratamentos do GBM incluem ressecção máxima (difusamente infiltrativa desses tumores dificulta a ressecção), radioterapia com terapias concomitantes e adjuvantes, como temozolamida (TMZ) ou pastilhas de carmustina. Há ainda o tratamento dos sintomas, o uso de medicamento, como, anticonvulsivante, tratamento para edema cerebral, infecções, depressão, disfunção cognitiva, fadiga e tromboembolismo venoso. Além disso, quando se tem uma progressão, bevacizumabe é comumente utilizado contra o fator de crescimento endotelial vascular circulante (VEGF), recentemente combinado com lomustina.

As células tumorais dependem de mecanismos de reparo de DNA residual para lidar com o estresse endógeno induzido pelo aumento do metabolismo celular, estresse mitótico e hipóxia, bem como estresse exógeno induzido por quimioterapia e radioterapia. As estratégias de tratamento para o glioblastoma dependem da indução de danos no DNA. A radiação ionizante (IR) funciona principalmente infligindo quebras de fita dupla, danos à base e quebras de fita simples, já a TMZ, um agente quimioterápico alquilante, induz N7-metilguanina e N3-metiladenina. O dano ao DNA causado por essas terapias é frequentemente reparado por vias multiproteicas, como recombinação homóloga, junção de extremidade não homóloga ou reparo por excisão de base, com exceção de um mecanismo de reparo via O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) que funciona como uma única via de proteína. A combinação de TMZ com radioterapia foi aceita como a “terapia padrão” para GBM em todo o mundo, nomeada de “Protocolo Stupp”.

Apesar das formas existentes de terapêuticos agressivos, a maioria dos pacientes sofre recorrência, pela heterogeneidade molecular dos tumores GBM e à penetração de agentes terapêuticos através da barreira hematoencefálica (BHE). Portanto, a resposta ao tratamento e o prognóstico são afetados, induzindo à resistência do tumor nos pacientes. No entanto, com métodos de sequenciamento atuais trouxeram à identificação de biomarcadores moleculares para GBM que permite uma elucidação da patogênese molecular. Consequentemente, biomarcadores diagnósticos permitem uma classificação mais precisa do tumor. Com isso, os biomarcadores prognósticos informam sobre um provável resultado do câncer e biomarcadores preditivos facilitam o manejo do paciente, auxiliando a adaptação de tratamento individualizado. Existem testes comumente feitos, com algumas moléculas, como, isocitrato desidrogenase (IDH), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), VEGF, proteína supressora de tumor TP53, homólogo de fosfatase e tensina (PTEN), gene p16INK4a, células-tronco cancerígenas, MGMT.

A caracterização detalhada contribui para o desenvolvimento de uma nova geração de

terapias anti-GBM, como inibidores moleculares direcionados a receptores de fatores de crescimento, vacinas, conjugados de drogas à base de anticorpos e, mais recentemente, inibidores bloqueando os centros de controle imunológicos (Carlsson, Brothers, e Wahlestedt 2014; Szopa et al. 2017; Stupp et al. 2005).

3.4 Inovações *in vitro*

Atualmente, grupos de pesquisa de diferentes regiões estão em busca de novas terapias para aumentar a sobrevivência dos pacientes com a doença. Uma das pesquisas inovadoras vistas recentemente foi a utilização de *scaffolds* feitos com quitosana-ácido hialurônico, para mimetizar a rigidez variável na cultura de células de glioblastoma, melhorando a precisão do teste *in vitro* para terapias futuras. Os *scaffolds* 3D porosos com quitosana promovem a proliferação e o enriquecimento de células-tronco cancerígenas. A resposta das células tumorais do GBM às drogas colocadas no *scaffolds* com vários níveis de rigidez foi bastante relevante (Figura 1) (Erickson et al. 2018).

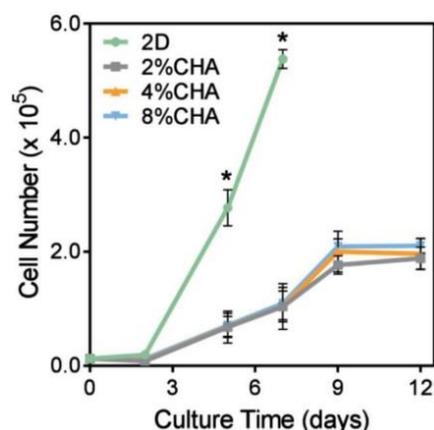


Figura 1: Cinética de crescimento de células. Fonte: Erickson et al. (2018).

Os *scaffolds* de PEC quitosana-ácido hialurônico (CHA) foram fabricados com conteúdo variável de quitosana, trazendo diferença na densidade total, porosidade, microestrutura e módulo de compressão do *scaffolds*. Quando os *scaffolds* foram utilizados para a cultura de células, as células formaram pequenos agregados de forma irregular em *scaffolds* de CHA a 2% e esferóides tumorais em *scaffolds* de CHA a 4% e 8%. De modo geral, um aumento no teor de polímero levou a uma maior densidade aparente, menor porosidade total, menor área de poros e maior módulo de compressão. Diferenças na morfologia celular e proliferação entre as condições de scaffold de CHA sugerem um efeito da rigidez da matriz em células GBM *in vitro*. O *scaffolds* de 8% de CHA formou esferas tumorais maiores com maior resistência a drogas e expressão elevada de resistência a drogas, hipóxia e genes relacionados à invasão (Erickson et al. 2018).

4 CONCLUSÃO

É possível perceber que as atuais terapias para o glioblastoma multiforme não tem oferecido uma qualidade de vida adequada e uma sobrevivência mundial relevante para os pacientes. Portanto, mostra-se necessário rever o uso dos atuais protocolos operacionais. Além disso, a utilização de novas ferramentas de testagem para novas terapias. Os *scaffolds* de CHA representam uma ferramenta útil para a cultura *in vitro* de células GBM permitindo a modelagem da relação entre as células GBM e o microambiente tumoral. Por fim, é válido

afirmar que o incentivo a novas pesquisas é imprescindível para a resolução do problema de saúde pública, que o GMB traz para o mundo.

REFERÊNCIAS

- Alifieris, Constantinos, e Dimitrios T. Trafalis. 2015. "Glioblastoma Multiforme: Pathogenesis and Treatment". *Pharmacology & Therapeutics* 152 (agosto): 63–82.
- Batistella, Gabriel Novaes de Rezende, Adrialdo José Santos, Manoel Antonio de Paiva Neto, Robson Ferrigno, Veridiana Pires de Camargo, João Norberto Stavale, e Marcos Vinicius Calfat Maldaun. 2021. "Approaching Glioblastoma during COVID-19 Pandemic: Current Recommendations and Considerations in Brazil". *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 79 (março): 167–72.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2008. "Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways". *Nature* 455 (7216): 1061–68.
- Carlsson, Steven K, Shaun P Brothers, e Claes Wahlestedt. 2014. "Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme". *EMBO Molecular Medicine* 6 (11): 1359–70.
- Dean, Michael, Tito Fojo, e Susan Bates. 2005. "Tumour Stem Cells and Drug Resistance". *Nature Reviews Cancer* 5 (4): 275–84.
- Erickson, Ariane E., Sheeny K. Lan Levengood, Jialu Sun, Fei-Chien Chang, e Miqin Zhang. 2018. "Fabrication and Characterization of Chitosan–Hyaluronic Acid Scaffolds with Varying Stiffness for Glioblastoma Cell Culture". *Advanced Healthcare Materials* 7 (15): 1800295.
- Farrell, Christopher J., e Scott R. Plotkin. 2007. "Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, von Hippel-Lindau, and Other Syndromes". *Neurologic Clinics, Brain Tumors in Adults* 25 (4): 925–46.
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: *International Agency for Research on Cancer*; 2020.
- Florczyk, Stephen J., Forrest M. Kievit, Kui Wang, Ariane E. Erickson, Richard G. Ellenbogen, e Miqin Zhang. 2016. "3D Porous Chitosan-Alginate Scaffolds Promote Proliferation and Enrichment of Cancer Stem-Like Cells". *Journal of materials chemistry. B, Materials for biology and medicine* 4 (38): 6326–34.
- Henriksson, Roger, Thomas Asklund, e Hans Skovgaard Poulsen. 2011. "Impact of therapy on quality of life, neurocognitive function and their correlates in glioblastoma multiforme: a review". *Journal of Neuro-Oncology* 104 (3): 639–46.
- Iacob, Gabriel, e Eduard B. Dinca. 2009. "Current Data and Strategy in Glioblastoma Multiforme". *Journal of Medicine and Life* 2 (4): 386–93.
- Li, Kai, Dan Lu, Yazhou Guo, Changwei Wang, Xiao Liu, Yu Liu, e Dezhong Liu. 2018. "Trends and Patterns of Incidence of Diffuse Glioma in Adults in the United States, 1973-2014". *Cancer Medicine* 7 (10): 5281–90.

- Louis, David N., Arie Perry, Pieter Wesseling, Daniel J. Brat, Ian A. Cree, Dominique Figarella-Branger, Cynthia Hawkins, et al. 2021. "The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary". *Neuro-Oncology* 23 (8): 1231–51.
- Lu, Hongzhou, Charles W. Stratton, e Yi-Wei Tang. 2020. "Outbreak of Pneumonia of Unknown Etiology in Wuhan, China: The Mystery and the Miracle". *Journal of Medical Virology* 92 (4): 401–2.
- Palmer, Joshua D., Gordon Chavez, Wesley Furnback, Po-Ya Chuang, Bruce Wang, Christina Proescholdt, e Chao-Hsiun Tang. 2021. "Health-Related Quality of Life for Patients Receiving Tumor Treating Fields for Glioblastoma". *Frontiers in Oncology* 11.
- Sherr, Charles J., e James M. Roberts. 1999. "CDK Inhibitors: Positive and Negative Regulators of G1-Phase Progression". *Genes & Development* 13 (12): 1501–12.
- Stupp, Roger, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J.B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. "Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma". *New England Journal of Medicine* 352 (10): 987–96.
- Szopa, Wojciech, Thomas A. Burley, Gabriela Kramer-Marek, e Wojciech Kaspera. 2017. "Diagnostic and Therapeutic Biomarkers in Glioblastoma: Current Status and Future Perspectives". *BioMed Research International* 2017: 8013575.
- Thakkar, Jigisha P., Therese A. Dolecek, Craig Horbinski, Quinn T. Ostrom, Donita D. Lightner, Jill S. Barnholtz-Sloan, e John L. Villano. 2014. "Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma". *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23 (10): 1985–96.
- Watanabe, K., O. Tachibana, K. Sata, Y. Yonekawa, P. Kleihues, e H. Ohgaki. 1996. "Overexpression of the EGF Receptor and P53 Mutations Are Mutually Exclusive in the Evolution of Primary and Secondary Glioblastomas". *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 6 (3): 217–23; discussion 23-24.
- Willis, A. L., F. Sabeh, X.-Y. Li, e S. J. Weiss. 2013. "Extracellular Matrix Determinants and the Regulation of Cancer Cell Invasion Stratagems". *Journal of Microscopy* 251 (3): 250–60.
- Xiong, Zhengming, Elisabet Ampudia-Mesias, Rob Shaver, Craig M Horbinski, Christopher L Moertel, e Michael R Olin. 2016. "Tumor-derived vaccines containing CD200 inhibit immune activation: implications for immunotherapy". *Immunotherapy* 8 (9): 1059–71.