

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANTONIELLE BEATRIZ BALDISSERA

RELEVÂNCIA DA TCTP E OS EFEITOS DA SERTRALINA EM  
NEUROBLASTOMA E GLIOBLASTOMA

CURITIBA

2023

ANTONIELLE BEATRIZ BALDISSERA

RELEVÂNCIA DA TCTP E OS EFEITOS DA SERTRALINA EM  
NEUROBLASTOMA E GLIOBLASTOMA

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, no setor de Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Senff Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Mauro Alves de Castro

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Baldissera, Antonielle Beatriz

Relevância da TCTP e os efeitos da sertralina em neuroblastoma e glioblastoma / Antonielle Beatriz Baldissera. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Senff Ribeiro.

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Alves de Castro.

1. Neuroblastoma. 2. Glioblastoma. 3. Proteína tumoral 1 controlada por tradução. 4. Sertralina. I. Ribeiro, Andrea Senff, 1977-. II. Castro, Mauro Antônio Alves. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de PósGraduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANTONIELLE BEATRIZ BALDISSERA** intitulada: **Relevância da TCTP e os efeitos da sertralina em neuroblastoma e glioblastoma.**, sob orientação da Profa. Dra. ANDREA SENFF RIBEIRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Junho de 2023.

Assinatura Eletrônica  
06/06/2023 23:11:52.0  
ANDREA SENFF RIBEIRO  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
06/06/2023 11:47:51.0  
DANIELA FIORI GRADIA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
06/06/2023 09:36:59.0  
SHERON CAMPOS COGO  
Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
06/06/2023 09:36:46.0  
FRANCISCO FILIPAK NETO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
12/06/2023 14:47:24.0  
SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbioce@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.  
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 299830

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 269830**

Dedico esse trabalho a minha família: Gui, Di, Django e Maria  
Rita, por me dar a certeza de nunca estar só.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu grande companheiro e amor, Guilherme. Obrigada por ser meu porto seguro, por sonhar comigo e por ter tanta paciência nos momentos que mais precisei. Você é um exemplo de profissional para mim e é um orgulho estar caminhando ao seu lado. Esse trabalho não seria finalizado sem todo seu apoio e amor, te amo.

A minha querida orientadora, Andrea Senff Ribeiro, que mesmo longe sempre esteve presente e acreditou em mim. Obrigada por todas as discussões, conselhos e por me acolher em momentos de dificuldade. Sou muito grata por ter convivido e aprendido tanto com você nesses 8 anos.

A Luiza Helena Gremski, a “mãezona” do LME. Obrigada Lu por todas as vezes que você escutou choros, reclamações e pela paciência em lidar com o caos. Obrigada por sempre ter uma palavra amiga e por sempre ajudar a encontrar uma solução para problemas que nem eram teus.

Ao professor Silvio Sanches Veiga por ter aberto as portas do LME para mim e por acreditar no meu trabalho. Agradeço por todas as discussões, pelas dicas e ideias durante o desenvolvimento do projeto.

Aos meus amados pais, Cesar e Luzia, que sempre estiveram ao meu lado e nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Tudo que eu já alcancei devo a vocês e por isso, esse trabalho é de vocês também.

A minha amada irmã, Lis, que sempre me incentivou a continuar, mesmo nos momentos de desânimo e por sempre acreditar em mim (mais do que eu mesma).

A minha amada sogrinha, Rose, por se preocupar comigo durante toda essa jornada, por todo apoio, amor e por me lembrar que a vida não é feita somente de estudos. Também agradeço meu amado sogrinho, Clé, por todo apoio e incentivo.

A minha grande amiga e companheira de experimentos, Hanna. Amiga, me faltam palavras para que eu consiga expressar o quanto sou grata por ter você na minha vida. Primeiramente gostaria de agradecer tua amizade, por

você sempre estar do meu lado, por comprar minhas brigas e por topa r minhas loucuras. Obrigada por todos os cafés, conselhos, brigas rs, por aguentar os choros via wpp, pelos bakpas, mas principalmente por sempre acreditar em mim e me dar a certeza de que eu tenho um ombro para chorar e alguém para contar nos melhores e piores momentos. Também agradeço imensamente todo seu companheirismo no laboratório nesses 4 anos. Obrigada por me ajudar com os animais, por “madrugar” no biológicas comigo, por aguentar os perrengues nos ensaios comportamentais, pelas idas na PUC atras de célula, pelos surtos com o -80º e células contaminadas, pelas limpezas feitas na base do ódio rs e por todas as discussões durante o desenvolvimento da pesquisa. Esse trabalho não seria o mesmo sem toda sua ajuda e amizade, muito obrigada.

Ao meu amado Rafinha, por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor, por me ensinar todos os dias algo novo e por me amar mesmo eu atrapalhando seus experimentos. Agradeço demais por ter você na minha vida.

Aos queridos companheiros de laboratório: Nyanne, por todas as dicas, por me ajudar com os animais e com os gráficos. Obrigada também por todas as risadas e momentos especiais fora do laboratório. Pedro Schluga, por todas as conversas e trocas, por tantas risadas e por sempre trazer humor nos dias pesados. João Lucas, pelo auxílio com os animais, por sempre estender a mão para me ajudar e pelos pepinos Ice da vida. Pedro Augusto, por todas as conversas científicas e as nada científicas. Também agradeço aos alunos de iniciação científica do laboratório que sempre foram muito prestativos. Dudinha, obrigada por todos os conselhos e por toda ajuda com os géis, especialmente nos últimos meses. Thais, pelos inúmeros momentos de desabafo no cultivo e por ajudar a cuidar das nossas células. Mari e Lucão, por todas as risadas, conversas e momentos de descontração quando mais precisei.

Aos técnicos da fisiologia, Debora, Hely e Fábio, por todo auxílio durante os experimentos e por todas as dicas.

A querida Giulia Fidelis, que se deslocou mais de uma vez de Santa Catarina até Curitiba para me ajudar com a cirurgia dos animais. Obrigada por

toda colaboração com esse trabalho e por todas as conversas. Agradeço também a Bruna Barros e a Hemelin Resende pelo auxílio na cirurgia.

Ao professor Dr. Ricardo Pinho, pelo conhecimento transmitido e por ter nos auxiliado a dar início ao projeto de glioblastoma.

A Bruna Rodrigues e a Sheron Cogo, por me ajudarem com as linhagens de neuroblastoma, por todas as nossas trocas e por sempre me acudir quando precisei.

A professora Selene Esposito, por me receber tão bem em seu laboratório, por todas as sugestões e ideias e por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Andreatini por abrir as portas do seu laboratório e sua aluna Vivian por me ensinar a realizar os experimentos de comportamento animal.

A secretaria do Programa de Biologia Celular e Molecular e a todos os servidores da Universidade Federal do Paraná.

A todos que contribuíram de maneira direta, ou indireta, com a realização desse trabalho.

Muito obrigada!



## RESUMO

A reversão tumoral, processo em que uma célula tumoral sofre, espontaneamente, uma reprogramação e perde em parte ou totalmente seu fenótipo maligno, apresenta grande potencial como nova abordagem terapêutica do câncer. Neste processo, as células revertentes diminuem drasticamente seu conteúdo da proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*), que se encontra altamente expressa nas células tumorais. Por estar relacionada com a reversão tumoral, e superexpressa em vários tumores, a TCTP vem sendo considerada como um alvo terapêutico para o câncer. A sertralina, antidepressivo inibidor da recaptção de serotonina, atua diretamente sobre a proteína diminuindo seus níveis intracelulares. Na literatura há poucos estudos que abordem o papel da proteína TCTP e o uso de sertralina nos tumores de neuroblastoma e glioblastoma. Assim, o objetivo do presente trabalho foi aprofundar o entendimento do papel biológico da TCTP nesses tumores e o papel do tratamento com sertralina na terapêutica antitumoral. Especificamente, avaliamos a TCTP e o tratamento com sertralina em linhagens de neuroblastoma e glioblastoma. Os parâmetros *in vitro* estudados foram viabilidade, níveis proteicos de TCTP, migração, proliferação e clonogenicidade celular. Os resultados obtidos apontam que as linhagens de neuroblastoma e glioblastoma são sensíveis ao tratamento com sertralina, apresentando redução nas características tumorais das células, além de apresentarem redução nos níveis intracelulares de TCTP. E foi avaliado o tratamento com sertralina *in vivo* em modelo murino de glioblastoma. Para o *in vivo* com tumor intracerebral foram feitas análises comportamentais dos animais e para o *in vivo* com tumor subcutâneo o tumor coletado foi utilizado para avaliar a quantidade intracelular de TCTP. Os ensaios comportamentais revelaram que os animais tratados com sertralina possuíam melhor desempenho motor e cognitivo do que os outros grupos. No modelo animal com tumor subcutâneo a sertralina inibiu o crescimento tumoral e os tecidos tumorais dos animais tratados com sertralina apresentaram menor quantidade de TCTP em comparação aos controles. Esses resultados apontam a relevância da proteína TCTP no processo de reversão do fenótipo maligno das células estudadas e sugere-se a sertralina como possível droga terapêutica para tumores de neuroblastoma e glioblastoma.

**Palavras-chave:** neuroblastoma; glioblastoma; Translationally Controlled Tumor protein; TCTP; tpt1; sertralina.

## ABSTRACT

Tumor reversion is a process in which a tumor cell spontaneously undergoes reprogramming and partially or completely loses its malignant phenotype. It has great potential as a new therapeutic approach to cancer. In this process, revertant cells drastically reduce their content of the TCTP protein (Translationally Controlled Tumor Protein), which is highly expressed in tumor cells. For being related to tumor reversion and overexpressed in several tumors, TCTP has been considered as a therapeutic target for cancer. Sertraline, a serotonin reuptake inhibitor antidepressant, acts directly on the protein, decreasing its intracellular levels. There are few studies in the literature that address the role of the TCTP protein and the use of sertraline in neuroblastoma and glioblastoma tumors. Thus, the aim of this study was to deepen the understanding of the biological role of TCTP in these tumors and the role of treatment with sertraline in antitumor therapy. Specifically, we evaluated TCTP and sertraline treatment in neuroblastoma and glioblastoma cell lines. The in vitro parameters studied were viability, protein levels of TCTP, cell migration, proliferation and clonogenicity. The results indicate that the neuroblastoma and glioblastoma cell lines are sensitive to treatment with sertraline, showing a reduction in the malignant characteristics of the cells, in addition to showing a reduction in the intracellular levels of TCTP. The treatment with sertraline in vivo in a murine model of glioblastoma was evaluated. For the in vivo test with intracerebral tumor, behavioral analyzes of the animals were performed and for the in vivo test with subcutaneous tumor, the collected tumor was used to evaluate the intracellular amount of TCTP. Behavioral tests revealed that animals treated with sertraline had better motor and cognitive performance than the other groups. In the animal model with subcutaneous tumor, sertraline inhibited tumor growth and tumor tissues from animals treated with sertraline showed a lower amount of TCTP compared to controls. These results indicate the relevance of TCTP protein in the process of reversion of the malignant phenotype of the studied cells and suggest sertraline as a possible therapeutic drug for neuroblastoma and glioblastoma tumors.

**Key-words:** neuroblastoma; glioblastoma; *Translationally Controlled Tumor protein*; TCTP; tpt1; sertraline.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática das proteínas interagindo com TPT1 / TCTP. ....	30
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo do ensaio de quimiosensibilização, métodos concomitante e pré tratamento.....	45
<b>Figura 3:</b> Desenho esquemático do ensaio in vivo realizado por meio de cirurgia intracerebral. ....	48
<b>Figura 4:</b> Caixa utilizada para realização dos experimentos comportamentais de campo aberto e memória. ....	50
<b>Figura 5:</b> Equipamento utilizado para realizar o teste Rotarod.....	50
<b>Figura 6:</b> Esquema do experimento de reconhecimento de novo objeto (NOR), dividido nas fases: habituação, treino, teste 1 e teste 2. ....	51
<b>Figura 7:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem CHLA-20 nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	55
<b>Figura 8:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem IMR-32 nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	55
<b>Figura 9:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem SH-SY5Y nos tempos de 24, 48 e 72 horas. ....	56
<b>Figura 10:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem SH-SY5Y diferenciada nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	57
<b>Figura 11:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na proliferação celular na linhagem CHLA-20 nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant).. ....	57
<b>Figura 12:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na proliferação celular na linhagem IMR-32 nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant). ....	58
<b>Figura 13:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na proliferação celular na linhagem SH-SY5Y nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant).....	59
<b>Figura 14:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na proliferação celular na linhagem SH-SY5Y diferenciada nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant).....	59
<b>Figura 15:</b> Ensaio de clonogenicidade em ágar mole na linhagem de neuroblastoma CHLA-20 (6000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias). ....	60

<b>Figura 16:</b> Ensaio de clonogenicidade em ágar mole na linhagem de neuroblastoma IMR-32 (6000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias).	61
<b>Figura 17:</b> Ensaio de clonogenicidade em ágar mole na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y (6000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias).	61
<b>Figura 18:</b> Ensaio de clonogenicidade em ágar mole na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciada (6000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias).	62
<b>Figura 19:</b> Avaliação do efeito da sertralina na migração celular na linhagem CHLA-20 (método scratch).	63
<b>Figura 20:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na migração celular na linhagem IMR-32 (método scratch).	63
<b>Figura 21:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na migração celular na linhagem SH-SY5Y indiferenciada (método scratch).	64
<b>Figura 22:</b> Avaliação do tratamento com sertralina na migração celular na linhagem SH-SY5Y diferenciada (método scratch).	64
<b>Figura 23:</b> Avaliação dos níveis proteicos de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas.	65
<b>Figura 24:</b> Avaliação dos níveis proteicos de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas.	65
<b>Figura 25:</b> Avaliação dos níveis de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas.	66
<b>Figura 26:</b> Avaliação dos níveis de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas.	66
<b>Figura 27:</b> Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico doxorrubicina na linhagem CHLA-20 (método MTT).	67
<b>Figura 28:</b> Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico doxorrubicina na linhagem IMR-32 (método MTT).	68
<b>Figura 29:</b> Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico doxorrubicina na linhagem SH-SY5Y indiferenciada (método MTT).	69
<b>Figura 30:</b> Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico doxorrubicina na linhagem SH-SY5Y indiferenciada (método MTT).	70

<b>Figura 31:</b> Tratamento com o ácido trans-retinóico (ATRA) e expressão de sinaptofisina. Avaliação das proteínas SINAPTOFISINA, TCTP e GAPDH (controle), após 7 dias de tratamento com ATRA na presença ou ausência de sertralina.....	71
<b>Figura 32:</b> Linhagem SH-SY5Y após 10 dias de tratamento com ácido transretinóico (ATRA) e/ou sertralina 0,5 e 1 uM. Imagens feitas em microscópio invertido.....	72
<b>Figura 33:</b> Imagens da linhagem SH-SY5Y 10 dias após o tratamento com ATRA. Figuras do controle (somente meio) e sertralina 1 µM, com ou sem ATRA, feitas em microscopio invertido. ....	72
<b>Figura 34:</b> Avaliação da viabilidade celular na linhagem GL-261 após tratamento com sertralina nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	73
<b>Figura 35:</b> Avaliação da proliferação celular na linhagem GL-261 após tratamento com sertralina nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant).. .....	74
<b>Figura 36:</b> Ensaio de clonogenicidade em ágar mole com a linhagem GL-261 (6000 células incubadas meio semi-sólido por 21 dias em presença de sertralina. .....	74
<b>Figura 37:</b> Avaliação da migração celular na linhagem GL-261 na presença de sertralina (método scratch).....	75
<b>Figura 38:</b> Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico temozolomida na linhagem GL-261 (método MTT).. ....	76
<b>Figura 39:</b> Avaliação dos níveis de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	76
<b>Figura 40:</b> Efeito da sertralina in vivo em modelo murino por via subcutânea.. .....	77
<b>Figura 41:</b> Análise de cruzamentos em teste de campo aberto após 10, 20 e 30 dias.....	80
<b>Figura 42:</b> Análise de elevações em teste de campo aberto após 10, 20 e 30 dias.....	81
<b>Figura 43:</b> Análise de produção de bolo fecal em teste de campo aberto após 10, 20 e 30 dias.....	81
<b>Figura 44:</b> Análise de locomoção, capacidade motora e equilíbrio (RotaRod) após 10, 20 e 30 dias.....	82

<b>Figura 45:</b> Análise de equilíbrio e capacidade motora (RotaRod) após 10, 20 e 30 dias.....	83
<b>Figura 46:</b> Análise da memória após 10, 20 e 30 dias (tempo de exploração).	84
<b>Figura 47:</b> Análise da memória após 10 dias (taxa de discriminação)..	85
<b>Figura 48:</b> Análise da memória após 20 dias (taxa de discriminação).	86
<b>Figura 49:</b> Análise da memória após 30 dias (taxa de discriminação).	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento do GBM.....	52
<b>Tabela 2:</b> Características das diferentes linhagens de neuroblastoma utilizadas neste trabalho.....	53
<b>Tabela 3:</b> Dados clínicos dos animais submetidos ao modelo experimental de glioblastoma. O peso está expresso em média e desvio padrão (DP).....	78
<b>Tabela 4:</b> Dados clínicos dos animais submetidos ao modelo experimental de glioblastoma. O escore clínico está expresso em média e desvio padrão (DP)...	79

## LISTA DE SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina
ANOVA	Análise de Variância
ASCT	Transplante autólogo de células-tronco
ASO	Oligonucleotídeos antisense
ATG16	Proteína associada a autofagia
ATP	Adenosina Trifosfato
ATRA	Ácido all-trans-retinóico
BAX	<i>BCL2 Associated X</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CDC42	<i>Cell division control protein 42</i>
CHLA-20	Linhagem celular de neuroblastoma
CNS	Sistema nervoso central
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E-CAD	E-caderina
EDTA	Ácido etilenodiamino
EMT	Transição epitelial mesenquimal
ER-	Receptor de estrogênio negativo
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>



GBM	Glioblastoma
GD2	<i>Disialoganglioside</i>
GL261	Linhagem Celular de glioblastoma murino
GSK3B	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HRF	Fator de liberação de histamina
HSP27	<i>Small heat shock protein 27</i>
IDRF	Fatores de risco definidos por imagem ( <i>image-defined risk factors</i> )
IGG	Imunoglobulina G
IMR-32	Linhagem celular de neuroblastoma
INRGSS	Sistema internacional de estadiamento do grupo de risco de neuroblastoma
ISRSS	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
KCL	Cloreto de Potássio
KDA	Quilodalton
KI67	Marcador de proliferação
LC3-II	Marcador de autofagia
MCL1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MRNA	RNA mensageiro
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
MTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MYCN	Proto-Oncogene
NACL	Cloreto de sódio
NB	Neuroblastoma
NOR	<i>Novel object recognition</i>
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas

P53	Proteína p53
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
P-GP	Glicoproteína-P
PI3K	Fosfoinosítido 3-quinase
PKR	Proteína quinase R
PLK1	Pólo- quinase 1
PSEN1	Presenilina-1
QRT-PCR	<i>Real-Time</i> Quantitative Reverse Transcription <i>PCR</i>
RPM	Rotação por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SHRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SH-SY5Y	Linhagem celular de neuroblastoma humano
SIAH1	<i>Siah E3 ubiquitin protein ligase 1</i>
siRNA	RNA de interferência
SNAI1	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 1</i>
SV40	<i>Polyomavirus simian virus 40</i>
TCTP	<i>Translationally controlled tumor protein</i>
TERT	<i>Transcriptase reversa da telomerase</i>
TGF-β1	<i>Transforming growth factor β1</i>
TMZ	Temozolomida
TPT1	gene que codifica a proteína TCTP
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRKA	<i>Tropomyosin <b>receptor</b> kinase A</i>
TSAP6	Tumor Suppressor-Activated Pathway 6
TTFIELDS	<i>Tumor-treating fields</i>

VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
WT	selvagem, nativo ( <i>Wild Type</i> )

## LISTA DE ABREVIÇÕES

DOXO	Doxorrubicina
MIN	Minutos
SER	Sertralina

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\text{g/mL}$	Grama por mililitro
$\text{mA}$	Miliampere
$\text{mg/kg}$	Miligramma por kilograma
$\text{mm}$	Milímetro
$\text{nm}$	Nanômetro
$\text{V}$	Volt
$\times g$	Força centrífuga relativa
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	23
2. Revisão bibliográfica.....	25
2.1. Câncer .....	25
2.2. TCTP .....	28
2.3. TCTP e câncer .....	32
2.4. TCTP e Sertralina .....	34
2.5. Neuroblastoma.....	36
2.6. Glioblastoma .....	39
3. Objetivos: .....	41
3.1. Objetivo geral:.....	41
3.2. Objetivos específicos: .....	41
4. Material e Métodos .....	42
4.1. Ensaio <i>In Vitro</i> .....	42
4.1.1. Cultivo Celular.....	42
4.1.2. Ensaio de viabilidade celular (Celltiter Glo).....	42
4.1.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) .....	42
4.1.4. Proliferação Celular .....	43
4.1.5. Migração Celular.....	43
4.1.6. Ensaio de Clonogenicidade.....	44
4.1.7. Quimiossensibilização.....	44
4.1.8. Diferenciação Celular .....	46
4.2. Extratos proteicos.....	46
4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	46
4.4. Ensaio de imunodeteccção ( <i>Western Blot</i> ).....	46
4.5. Ensaio <i>In Vivo</i> .....	47
4.5.1. Ensaio <i>in vivo</i> em modelo animal de Glioblastoma.....	47
4.5.2. Campo Aberto .....	49
4.5.3. RotaRod .....	50
4.5.4. Memória (NOR- <i>Novel Object Recognition</i> ).....	50
4.5.5. Indicador geral .....	51
4.6. Análise estatística.....	52
5. Resultados .....	53
6. Discussão.....	87

<b>7. Considerações finais</b> .....	99
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	100
<b>Anexo I- Certificado CEUA/BIO (nº 1460)</b> .....	126
<b>Anexo II- Certificado CEUA/BIO (nº 1296)</b> .....	127

## 1. Introdução

No Brasil, aproximadamente 523.000 casos de câncer foram registrados no ano de 2020 (Sung et al., 2021). Para os anos de 2023 até 2025 estima-se 704 mil novos casos no país. Dentro dessa estatística, o câncer de maior incidência é o de pele não melanoma, atingindo uma taxa de 31,3%, seguido pelos cânceres de mama (10,5%) e de próstata (10,2%) (Inca, 2022). O câncer apresenta-se como um problema de saúde pública devida as altas taxas anuais de incidência e mortalidade (Inca, 2016). Contudo, apesar do conhecimento crescente de pesquisas, muitos tipos tumorais ainda apresentam prognósticos ruins, opções de tratamento limitadas e muitas vezes ineficientes. Desta forma, abordagens terapêuticas mais eficientes e menos agressivas vem sendo estudadas e propostas, entre elas destaca-se a reversão tumoral.

A reversão tumoral é definida como o processo biológico no qual uma célula tumoral perde suas características de malignidade, adquirindo um comportamento próximo ao das células normais. Durante este evento, ocorre uma reprogramação celular, ainda não totalmente compreendida, envolvendo ativação e inativação de genes específicos e, provavelmente, modificações epigenéticas. Esse processo é complexo e fisiologicamente raro, contudo, é um evento que ocorre espontaneamente nas células tumorais (Telerman, A.; Amson, R. 2009; Tuynder et al., 2004). Estudos comparativos entre células revertentes e suas equivalentes tumorais revelaram que a proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) estava diferencialmente expressa nestas células (muito pouco expressa nas células revertentes). Posteriormente, evidenciou-se que essa proteína desempenha um importante papel no processo de reversão tumoral, além de ser considerada como um potencial alvo terapêutico (Amson, R.; Karp, J.E.; Telerman, A. 2013; Telerman, A.; Amson, R.; Hendrix, M.J. 2010; Kobayashi et al., 2019).

A TCTP é uma proteína altamente conservada, com 23 kDa, expressa em todos os organismos eucariotos. A proteína é dita multifuncional, já que está relacionada a diversas funções e processos celulares como: crescimento celular e desenvolvimento embrionário, síntese de proteínas, resposta imune, apoptose, alterações no DNA, regulação do ciclo celular, reversão tumoral, entre outros



(Acunzo et al., 2014). A alta expressão de TCTP já foi descrita em diferentes tumores: melanoma (Boia-Ferreira et al., 2017; Tuynder et al., 2004), mama (Amson et al., 2013; TUYNDER et al., 2002, Baldissera et al., 2023 *in press*), ovário (Lee et al., 2008), próstata (Baylot et al., 2012), pâncreas (Villafuerte et al., 2017), cólon (Bommer et al., 2017), leucemia mielóide aguda (Amson, R.; Karp, J.E.; Telerman, A. 2013) e leucemia mielóide crônica (Tuynder et al., 2002). A diminuição dos níveis de TCTP (*knockdown*) nas células tumorais resulta na supressão do fenótipo maligno. Ainda, essa redução de TCTP é capaz de inibir o crescimento de células tumorais e as induzir à apoptose (Amson, R.; Karp, J.E.; Telerman, A. 2013; Gnanasekar et al., 2009).

Algumas drogas são capazes de diminuir os níveis intracelulares de TCTP, como a sertralina, um antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina, que já foi estudada em diversos modelos tumorais (Tuynder et al., 2002; Tuynder et al., 2004; Boia-Ferreira et al., 2017; Wang et al., 2020). Em um estudo *ex-vivo* com células de leucemia mielóide aguda de pacientes foi mostrado que a inibição de TCTP pela sertralina levou as células tumorais à apoptose, e melhorou a resposta ao quimioterápico de escolha para o tratamento clínico (Ara-C) (Amson, R.; Karp, J.E.; Telerman, A. 2013).

Os tumores de glioblastoma são tumores que se destacam por serem altamente agressivos, apresentarem um prognóstico ruim e pela baixa sobrevivência do paciente após o diagnóstico. Pacientes com esse tipo tumoral geralmente apresentam dores de cabeça, tontura, deficiência cognitiva, além de estarem sujeitos a desenvolver mudanças na personalidade e comportamento (Catt, S.; Chalmers, A.; Fallowfield, L. 2008). Gu e colaboradores (2014) demonstraram que a expressão de TCTP é maior em tecidos de glioma, especialmente aqueles considerados de alto grau (III-IV), os quais incluem os glioblastomas. Além destes, outro tumor que apresenta relevância e já foi relacionado com a TCTP é o neuroblastoma, que se desenvolve durante o crescimento fetal ou nos primeiros anos de vida de crianças (Johnsen, J.I., Dyberg, C.; Wickström, M. 2019). Os estudos sobre TCTP nestes tumores mostram que a expressão da proteína é relevante para o fenótipo maligno e sua alta expressão está associada a um prognóstico ruim (Ramani, P.; Sowa-Avugrah, E.; May, M.T. 2015). Portanto, os pacientes podem obter benefícios a partir da abordagem da

reversão tumoral e do tratamento com sertralina nestes tumores, uma vez que sertralina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e a TCTP é um potencial alvo terapêutico (Tuynder et al., 2002; Amson et al., 2013). O estudo da TCTP tem grande relevância no contexto tumoral e da compreensão do funcionamento das células neoplásicas.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Câncer**

O câncer é definido como um termo que compreende um conjunto de mais de cem doenças que apresentam crescimento celular desordenado (Inca, 2020). Estas células tendem a dividir-se rapidamente, podendo formar tumores malignos, e acabar espalhando-se para outras regiões do corpo, no processo conhecido como metástase. No ano de 2018, a organização mundial da saúde (*World Health Organization*, 2020) estima que o câncer foi responsável por 9.6 milhões de mortes. Já em 2020, estima-se que houve aproximadamente 10 milhões de mortes por câncer, sendo considerado a segunda principal causa de morte em todo o mundo (*World Health Organization*, 2021).

O processo de transformação de uma célula normal em uma célula tumoral confere características marcantes que permitem a essa célula tornar-se tumorigênica e, por fim, maligna. A tumorigênese é um processo com várias etapas e cada etapa reflete alterações cruciais que impulsionam a transformação progressiva de células normais em versões altamente proliferativas e resistentes. Em 2000, Hanahan, D. e Weinberg, R.A. publicaram as características comuns a grande maioria dos tumores, seis alterações na fisiologia celular que estão relacionadas ao crescimento maligno: 1) autossuficiência em sinais de crescimento, 2) insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, 3) evasão de morte celular programada (apoptose), 4) potencial replicativo ilimitado, 5) capacidade de manter a angiogênese e 6) invasão e metástase tecidual. Em 2011, em uma atualização, os autores incluíram novos aspectos da tumorigênese: evitar destruição pelo sistema imune (7), instabilidade genômica e mutação (8), inflamação pelo tumor (9) e reprogramação do metabolismo energético (10) (Hanahan, D.; Weinberg, R.A.

2011). Após onze anos, mais quatro características foram adicionadas como “*hallmarks*” do câncer: desbloqueio da plasticidade fenotípica (11), reprogramação epigenética (12), microbiomas polimórficos (13) e células senescentes (14) (Hanahan, D. 2022).

Com o objetivo de encontrar novos tratamentos contra os diferentes tipos de câncer, algumas dessas características são utilizadas como alvo, buscando a eliminação das células tumorais. Nesta busca, a reversão tumoral surge como uma abordagem diferente: a reprogramação da célula tumoral. O estudo da reversão tumoral como um processo busca o entendimento dos mecanismos que levam uma célula tumoral a reverter suas características malignas.

A reversão tumoral é definida como o processo biológico no qual as células tumorais, devido a uma reprogramação celular, perdem em grande parte ou totalmente seu estado tumoral e maligno (características que sustentam o desenvolvimento tumoral). Este processo é um evento fisiologicamente muito raro, apenas 1 em cada  $10^7$  células revertem sua condição tumoral, mas que ocorre espontaneamente nas células de uma massa tumoral (Telerman, A.; Amson, R. 2009). Acredita-se que a reprogramação celular seja orquestrada por um “programa genético” que envolve um subconjunto de genes (Wernig et al., 2007). Existem alguns fatores, já identificados, que são capazes de inibir ou promover o processo de reprogramação celular, como a modulação da via PI3K/Akt: em células tumorais reprograma o metabolismo celular aumentando a atividade de transportadores de nutrientes e enzimas metabólicas, suportando assim as demandas anabólicas de células cancerosas (Hoxha, J. G.; Manning, B.D. 2020), a regulação negativa da presenilina-1 (PSEN1), Notch e SNAI1, e o aumento da síntese de E-caderina (Smith, Z.D.; Sindhu, C.; Meissner, A. 2016). Além disso, desempenham um papel fundamental nesse processo as vias que incluem PSEN1 e TCTP/TPT1 (Bizzarri, M.; Cucina, A.; Proietti, S. 2017).

O processo de reversão tumoral foi descrito pela primeira vez no início do século XX, pelo pesquisador Askanazy, em estudo com teratocarcinoma ovariano. Durante a pesquisa observou-se que em estágios iniciais as células tumorais apresentam-se como uma população homogênea e, com a progressão, os teratocarcinomas formam grandes tumores compostos de diferentes tecidos, inclusive tecido normal (Askanazy, M. 1907). O fato de que a partir de uma célula

tumoral, tecidos saudáveis normais (não malignos) podem ser formados representava uma evidência de que a reversão tumoral existe na fisiopatologia humana (Telerman, A.; Amson, R. 2009). Anos depois, Pierce, G.B. e Dixon, F.J. (1959) reforçaram a teoria de Askanazy, demonstrando que células tumorais eram capazes de diferenciar-se em tecidos benignos.

Em 1987, Briand e colaboradores estabeleceram uma nova linhagem celular em laboratório chamada de HMT-3522. A linhagem era originária de fibrose de mama e caracterizava-se por não apresentar tumorigenicidade e manter-se diploide após várias passagens. A utilização constante da linhagem fez com que os pesquisadores pudessem selecionar a partir dela duas novas linhagens, S1 (não tumoral) e T4-2 (tumoral). As duas linhagens foram cultivadas em cultura 3D com matrigel e observou-se que a linhagem S1 se reorganizava em estruturas acinares (organização tecidual saudável) enquanto as células T4-2 mostravam-se em estrutura extremamente desorganizada (crescimento descontrolado). A partir disto, o grupo verificou que um receptor de matriz extracelular, a integrina  $\beta 1$ , era mais expressa na linhagem T4-2 do que em S1. Utilizando anticorpos anti-integrina  $\beta 1$ , eles conseguiram diminuir a ligação deste receptor com o meio extracelular, desencadeando uma mudança morfológica na organização dessas células. As células T4-2 se organizaram em estruturas muito semelhantes às encontradas na linhagem S1. Ainda, este fenótipo observado em T4-2 tratadas era reversível quando as células eram dissociadas e os anticorpos removidos (Weaver et al., 1997).

Mais tarde, em 1968, foi descrito pela primeira vez o termo 'revertentes'. Pollack, B.Y.R.E., Green, H. e Todaro, G.J. (1968) utilizaram a linhagem de fibroblasto NIH3T3 e a infectaram com o vírus SV40 (poliomavírus). A partir disso, eles isolaram as células revertentes obtidas e observaram que essas células recuperaram a sensibilidade para inibição por contato, e mais importante, diminuíram a capacidade de formar tumores. Essas células 'revertentes' tornaram-se uma ferramenta útil para investigar a reversão tumoral e, logo, essas observações começaram a ser expandidas para diferentes modelos tumorais.

Em 2002, Tuynder e seus colaboradores estabeleceram modelos de reversão tumoral. Eles utilizaram cinco linhagens tumorais distintas (tumores sólidos e sanguíneos) e as infectaram com diferentes concentrações do agente

seletivo H1 parvovírus (vírus oncolítico). Após a seleção feita pelo vírus, as colônias sobreviventes foram isoladas. No ensaio de clonogenicidade, eles observaram que a linhagem de tumor de cólon, DLD-1, formou grande número de colônias, e já a sua revertente, CL-4, parecia ser dependente de ancoragem, já que foi capaz de formar poucas colônias. Assim, o uso dos modelos reversão se tornou importante para avaliar e comparar as células tumorais parentais e as células filhas derivadas que apresentavam um fenótipo maligno revertido, auxiliando a melhorar a compreensão do processo de reversão tumoral.

Com o objetivo de entender quais genes poderiam fazer parte do processo de reversão tumoral, foi feita a análise da expressão gênica das células tumorais e das revertentes isoladas. Cerca de 300 genes potencialmente envolvidos no processo foram descritos. Os principais genes diferencialmente expressos codificam as proteínas: TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) (Susini et al., 2008); SIAH1, uma E3-ligase e alvo transcricional de p53 (Amson et al., 1996; Nemani et al., 1996; Fiucci et al., 2004); presenilina 1 (Roperch et al., 1998) e TSAP6 (Amson et al., 1996; Lespagnol et al., 2008). Destas proteínas, a mais bem estudada é a TCTP, capaz de desempenhar um importante papel na reversão de tumores, além de ser considerada como um potencial alvo terapêutico no câncer. Quando a TCTP é inibida (por silenciamento ou drogas) as células perdem suas características tumorais (Telerman, A; Amson, R.; Hendrix, M.J. 2010; Tuynder et al., 2004). Assim, o estudo da reversão tumoral, por meio da elucidação de seus mecanismos moleculares e de potenciais alvos, pode permitir uma nova abordagem na terapêutica do câncer. A compreensão de como a célula tumoral pode adquirir o arsenal molecular para se reprogramar perdendo a malignidade permitiria o desenvolvimento de tratamentos antitumorais mais específicos, menos agressivos e mais efetivos (Telerman, A; Amson, R. 2009; Tuynder et al., 2004; Powers; Pollack, 2016).

## **2.2. TCTP**

A proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumour Protein*) foi identificada pela primeira vez em um tumor ascítico de rato (Bohm et al., 1989). E foi descrita há aproximadamente vinte anos por três grupos de pesquisa

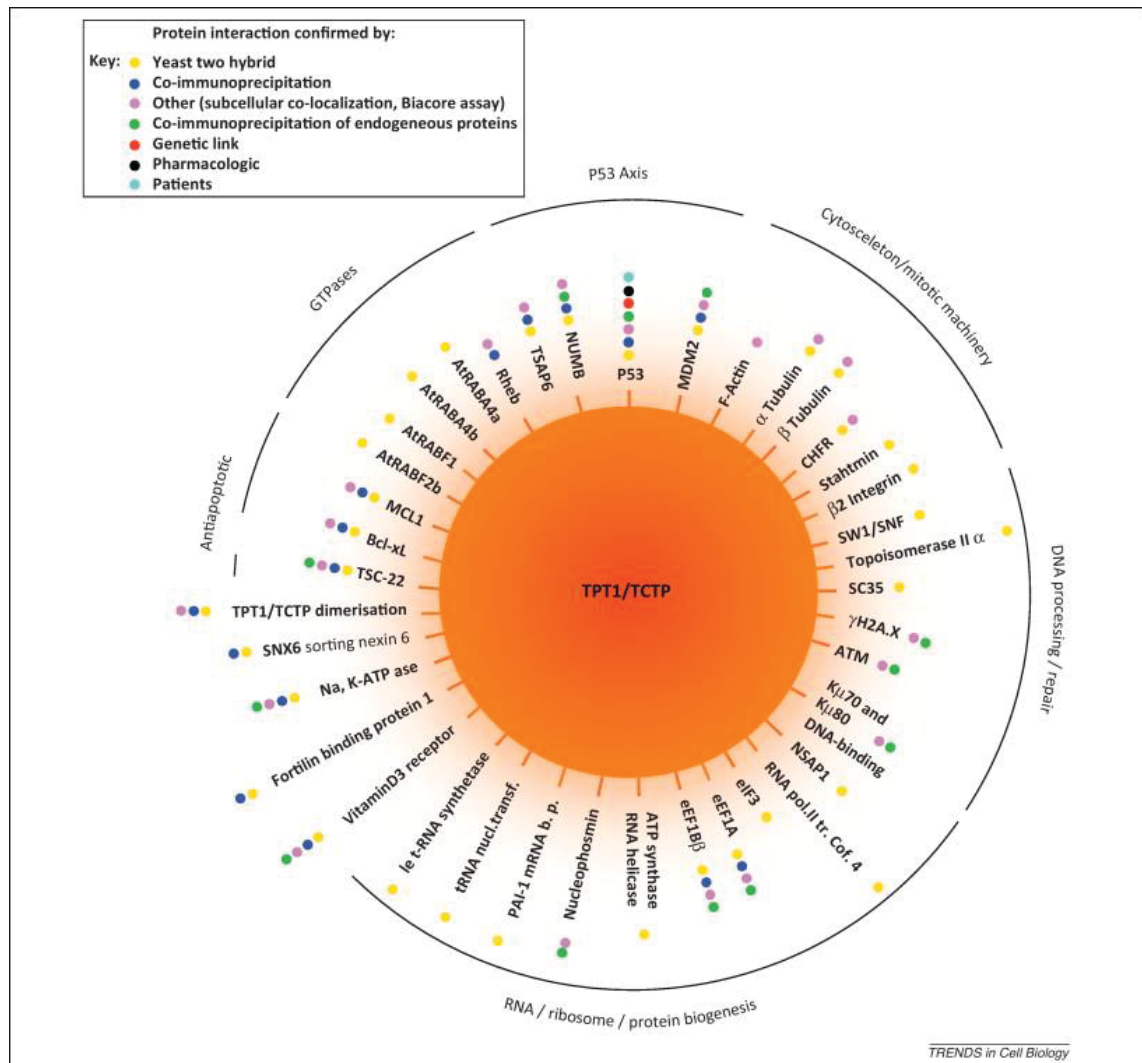
independentes envolvidos na busca de proteínas reguladas a nível traducional (Gachet et al., 1999). A TCTP é também conhecida como fator de liberação de histamina (HRF), Tpt1 (gene que codifica TCTP), p23 ou fortilina, e é altamente conservada em organismos eucarióticos como fungos, leveduras, plantas, camundongos e humanos (Telerman, A.; Amson, R. 2009, Bommer, U.A. 2017, Bommer, U.A.; Telerman, A. 2020). O alinhamento de sequências de TCTP de mais de 30 espécies diferentes mostra um alto grau de conservação durante um longo período de evolução (Thaw et al., 2001).

A TCTP é encontrada no citoplasma (Arcuri et al., 2004) e no núcleo (Li, F.; Zhang, D.; Fujise, K. 2001). A expressão de TCTP já foi investigada em mais de 500 tecidos e tipos celulares. Foi possível observar que os níveis de expressão variam entre diferentes tipos de tecidos (Bommer, U.A.; Thiele, B.J. 2004), além de existir uma preferência de expressão em tecidos mitoticamente ativos (Thiele et al., 2000). A TCTP é encontrada em vários tecidos normais, mesmo que tenha sido nomeada inicialmente como uma proteína de tumor.

A TCTP é codificada pelo gene *tpt1*, inicialmente estudado em coelhos. O *tpt1* é organizado em cinco íntrons e seis éxons, totalizando aproximadamente 3820 pares de base (Stapleton, H.; Kirkham, M.; Thomas, G. 2002). A TCTP apresenta massa molecular aparente de 23 kDa (Brioudes et al., 2010). O nível de mRNA de *tpt1* depende do tipo celular, estágio de desenvolvimento e estímulos extracelulares (Koziol, 2012). Apesar dos mecanismos moleculares de regulação da expressão não serem totalmente compreendidos, há consenso de que a proteína TCTP é altamente regulada tanto no nível traducional como transcricional (Bommer et al., 2002; Bommer, U.A.; Thiele, B.J. 2004; Acunzo et al., 2014). Inúmeros experimentos estabeleceram que os níveis de TCTP são altamente regulados em resposta a inúmeros sinais extracelulares e condições celulares. Algumas condições de estresse, como inanição (Bommer et al., 2002; Bonnet et al., 2000), choque térmico, metais pesados, estresse de cálcio (Xu, A.; Bellamy, A.R.; Taylor, J.A. 1999) ou sinais pró-apoptóticos / citotóxicos (Oikawa et al., 2002; Sinha et al., 2000) resultam em regulação positiva ou negativa dos níveis de TCTP. A estrutura da proteína é formada por três  $\alpha$ -hélices e nove folhas  $\beta$  que formam núcleos hidrofóbicos.



A proteína TCTP pode desempenhar diversas funções, participa de diferentes processos biológicos e possui muitos parceiros moleculares (Figura 1), e por esse motivo é chamada de proteína multifuncional (Amson et al., 2013).



**Figura 1:** Representação esquemática das proteínas interagindo com TPT1 / TCTP. **Fonte:** AMSON et al, 2013.

Entre as diversas funções destaca-se o papel crucial da TCTP para o desenvolvimento normal. O *knockdown* de TCTP em *Drosophila* causa letalidade em larvas no primeiro estágio tardio e resulta em tamanho reduzido das células, do número de células e do tamanho do órgão (Hsu et al., 2007). Em camundongos, os animais *knockout* para TCTP morrem durante a embriogênese (Gachet et al., 1999, Susini et al., 2008). Recentemente, Chen e colaboradores

(2020) mostraram a importância da TCTP para o desenvolvimento cerebral de camundongos. Os animais com *knockout* de TCTP apresentaram retardo no desenvolvimento cerebral e acabaram morrendo no estágio perinatal.

No ciclo celular, Gachet et al. (1999) demonstraram que a TCTP se liga à tubulina e associa-se com microtúbulos durante fases específicas do ciclo celular, separando-se do fuso na transição das fases metáfase-anáfase. Essa descoberta foi corroborada por Yarm, F.R. (2002) que demonstrou que a TCTP é fosforilada pela proteína PLK1 em dois resíduos de serina (serina 46 e 64), levando a separação da TCTP do fuso mitótico.

Em 1995, a TCTP foi identificada como um fator de liberação de histamina (MacDonald et al., 1995), além de atuar ativando mastócitos e basófilos que desencadeiam a liberação de histamina (Kashiwakura et al., 2012). A proteína também é considerada alvo para terapias contra asma e alergias devido aos seus efeitos pro-inflamatórios extracelulares (Macdonald et al., 1995; Kashiwakura et al., 2012).

A TCTP apresenta função antiapoptótica, ligando-se diretamente aos membros da família Bcl2, Bcl-xL e Mcl1 (Zhang et al., 2002; Liu et al., 2005; Yang, et al., 2005). As proteínas Bcl2, Bcl-xL e Mcl1 são proteínas antiapoptóticas pertencentes a família Bcl2. Essas proteínas inibem a apoptose principalmente pela ligação e inibição de proteínas da família Bcl2 pró-apoptóticas (Alberts et al., 2017). Recentemente, foi mostrado que a TCTP contém um domínio similar a BH3 e forma heterocomplexos com Bcl-xL potencializando a função anti-apoptótica de Bcl-xL (Thébault et al., 2016). Ainda, a TCTP antagoniza a função da proteína pró-apoptótica Bax. Acredita-se que a TCTP se ancora na membrana mitocondrial e inibe a dimerização de Bax (Susini et al, 2008).

A TCTP é capaz de formar complexos proteicos com outras proteínas alterando a atividade destas, como é o caso das bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPases, responsáveis pela homeostase iônica e pelo potencial de membrana celular. O mRNA da TCTP pode formar estruturas secundárias de dupla fita (*hairpins*), os



quais são capazes de interagir com alguns componentes celulares. Nesse caso, as estruturas secundárias do mRNA de *tpt1* podem ativar uma proteína quinase denominada PKR (Bommer et al., 2002), que está envolvida na regulação e diferenciação celular, na resposta a estresse, na apoptose e no mecanismo de defesa celular antiviral (Jagus, R.; Joshi, B.; Barber, G.N. 1999).

Thaw et al., (2001) e Gnanasekar et al., (2009) propuseram que a TCTP apresenta atividade molecular de chaperona. Sabe-se que a expressão de TCTP é conhecida por ser altamente regulada em resposta a uma grande variedade de condições de estresse. Gnanasekar e colaboradores (2009) mostraram que a TCTP protege as células do choque térmico, agindo potencialmente como uma chaperona molecular. Além disso, a superexpressão da proteína é capaz de proteger as células da morte celular induzida por choque térmico.

O papel da TCTP na autofagia também foi investigado por vários grupos de pesquisa. Os resultados apontam que a proteína TCTP consegue modular a autofagia. Bae e colaboradores (2017) demonstraram que a TCTP regula positivamente a autofagia pela via AMPK/mTORC, além de interagir com a proteína autofágica, ATG16. Também foi visto que a TCTP reduzida é capaz de promover o fluxo autofágico por meio da modulação das primeiras etapas da autofagia e a maturação do autofagossomo. Em ensaios *in vivo*, animais *knockout* de *tpt1* heterozigoto mostraram que a autofagia é aumentada devido à expressão haploinsuficiente de *tpt1* (Bae et al., 2017).

### **2.3. TCTP e câncer**

A relevância da TCTP para formação de tumores surgiu de duas linhas convergentes de investigação (Amson et al, 2013). A primeira refere-se ao gene *tsap6* (alvo de transcrição direta de P53), o qual codifica uma proteína de domínio transmembrana (6 domínios), capaz de regular o metabolismo do ciclo celular e apoptose. A proteína TSAP6 interage com a TCTP, sendo capaz de regular a secreção de TCTP por meio de uma via não clássica, por exossomos (Amson et al., 1996; Grandchamp et al., 2016). A segunda linha de investigação foi a que estudou as bases moleculares da reversão tumoral, através da derivação de células revertentes de linhagens celulares de leucemia e tumores

sólidos (Telerman et al., 1993; Tuynder et al., 2002; Tuynder et al., 2004). O estudo da expressão diferencial de genes entre as células tumorais parentais e as revertentes indicou que a TCTP representava o gene cuja expressão era a mais diminuída nas células revertentes (Tuynder et al., 2002). Trabalhos posteriores evidenciaram que a redução dos níveis de TCTP era capaz de desencadear um efeito antitumoral (Tuynder et al., 2002; Tuynder et al., 2004).

A relevância da proteína TCTP já foi apontada em diferentes tipos tumorais: melanoma (Tuynder et al., 2004; Boia-Ferreira et al., 2017), mama (Lucibello et al., 2015; Tuynder et al., 2002), ovário (Chen et al., 2015; Lee et al., 2008), pulmão (Sun et al., 2019), próstata (Baylot et al., 2012; Baylot et al., 2018), pâncreas (Villafuerte et al., 2017), cólon (Bommer et al., 2017), vesícula biliar (Zhang et al., 2017), carcinoma hepatocellular (Liu et al., 2020), leucemia mielóide aguda (Amson et al., 2013), leucemia mielóide crônica (Tuynder et al., 2002) e glioma (Gu et al., 2014).

Em células humanas de leucemia e tumores sólidos, a inibição de TCTP levou à apoptose *in vitro* e *in vivo*, inibindo a progressão tumoral (Tuynder et al., 2002). Também, em células de carcinoma pulmonar humano, a inibição de TCTP induziu a expressão de P53 e a apoptose (Rho et al., 2011). Em 2011 foi mostrado que a proteína TCTP e P53 tem uma inibição recíproca, em um eixo que envolve MDM2 (Amson et al., 2011). Assim, P53 consegue se ligar ao elemento responsivo de P53 presente no promotor de TCTP, levando a repressão transcricional de TCTP. Da mesma forma, TCTP inibe a auto-ubiquitinação de MDM2, levando a degradação de P53 mediada por MDM2 (Amson et al., 2011).

Estudos mostram que a regulação negativa da TCTP utilizando oligonucleotídeos antisense (ASO) ou siRNA (RNA de interferência) em linhagens celulares tumorais de próstata induzem as células à apoptose e ao bloqueio do ciclo celular (Baylot et al., 2012). Em câncer epitelial de ovário, a TCTP está altamente expressa em tecido tumoral quando comparado com tecido normal, além de promover a proliferação celular na linhagem HO8910 (Chen et al., 2015).

A TCTP está envolvida no processo de migração, invasão e metástase celular (Bae et al., 2015). Já foi demonstrado por Ma e colaboradores (2010) que a superexpressão de TCTP em células de adenocarcinoma de cólon leva a metástase, enquanto a depleção da proteína reduz de maneira significativa a metástase tumoral. Também já foi identificado um aumento de TCTP nas metástases em pacientes com hepatocarcinoma (Chan et al, 2012). Estudos mostram que a estabilização da TCTP pela proteína anti-apoptótica Mcl-1 e pela proteína Hsp27, evitam a degradação da TCTP em condições específicas, como em câncer de próstata (Baylot et al, 2012). Descobertas recentes mostram a TCTP como um indutor de EMT (transição epitélio-mesenquimal) pela via GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3  $\beta$* ) em linhagem celular renal (Bae et al., 2015). Ainda, a TCTP foi alvo de TGF- $\beta$ 1 (*Transforming growth factor  $\beta$ 1*) como um regulador chave de EMT na linhagem celular tumoral de pulmão, A549 (Mishra et al., 2018).

Em câncer de vesícula, a TCTP também foi associada com metástase e um pior prognóstico. Quando há diminuição da proteína, há inibição da migração e invasão das células tumorais da vesícula biliar (Zhang et al., 2017). Em tumor de pulmão, o *knockout* de TCTP reduz a capacidade migratória e invasiva das células A549. Ainda, há aumento da expressão de E-caderina e p53. Porém, quando a TCTP está superexpressa, há aumento na migração e invasão celular, e redução da expressão de E-caderina e p53 (Sun et al., 2019).

#### **2.4. TCTP e Sertralina**

Após validar a TCTP como um alvo em tumores, o objetivo de Tuynder e colaboradores (2004) foi encontrar drogas capazes de diminuir os níveis de TCTP. Considerando que a proteína apresenta função de liberação de histamina, os pesquisadores realizaram um *screening* com anti-histamínicos e diferentes moléculas que possuíam estrutura similar a estes compostos. As drogas avaliadas foram: perfenazina, tioridazina, sertralina, clorpromazina, paroxetina e flupentixol. Entre as drogas estudadas, descobriu-se que a sertralina e a tioridazina reduziram os níveis intracelulares de TCTP em diferentes linhagens celulares tumorais (MDA-MB-231: tumor de mama e U937: leucemia). A sertralina (18 mg/kg) inibiu o desenvolvimento tumoral *in vivo* em modelo animal

xenográfico inoculado com MDA-MB-231 (linhagem de mama do subtipo triplo negativo). Além disso, nesse estudo também foi demonstrado o potencial da sertralina em diferentes linhagens de melanoma humano (WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28 e Hs852T). Após o tratamento foi possível observar o efeito citopático *in vitro* da sertralina, concomitante com a diminuição da quantidade de TCTP nas células (Tuynder et al, 2004).

O antidepressivo sertralina, também chamado de Zoloft (nome comercial), é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRSs) (Pratt, L.A.; Brody, D.J.; Gu, Q. 2011) e pertence a um dos grupos de medicamentos mais comumente prescritos para transtornos psiquiátricos (Moore, T.J.; Mattison, D.R. 2017). Esse grupo de inibidores inibe de forma potente e seletiva a recaptação de serotonina, resultando em potencialização da neurotransmissão serotoninérgica (Strawn, J.R.; Geraciotti, L.; Rajdev, N. 2019; Xu et al., 2006; Toh et al., 2009). Na literatura há estudos que mostram que usuários que utilizam altas doses de inibidores seletivos de recaptação de serotonina apresentam diminuição significativa do risco de desenvolver tumores (câncer de mama, cólon retal, pulmão). Entre os inibidores com esse potencial, destaca-se a sertralina (Wernli et al, 2009; Coogan, P.F.; Strom, B.L.; Rosenberg, L. 2009). Isso demonstra que o uso da sertralina pode ser uma possibilidade terapêutica muito interessante na terapia combinada.

Amson e colaboradores (2011) mostraram que a droga se liga diretamente à TCTP. Por meio dessa ligação, a sertralina antagoniza a função da TCTP no eixo P53-MDM2. Dessa maneira, a TCTP ligada à sertralina não induz à ubiquitinação de P53 por MDM2, restaurando os níveis de P53, o que explicaria como a droga induz as células tumorais à apoptose. Estudos já demonstraram que o aumento da expressão de TCTP em carcinoma de pulmão foi capaz de reverter a apoptose mediada por P53, enquanto o *knockdown* aumentou a apoptose (Rho et al., 2011). Outros autores também demonstraram que a TCTP está relacionada com P53, inibindo a apoptose mediada por P53 (Chen et al., 2011). No estudo realizado por Amson e colaboradores (2013) utilizando a sertralina, revelou-se que a droga induziu um aumento acentuado na quantidade de P53 e, simultaneamente, uma diminuição de TCTP em células tumorais.

Em leucemia mieloide aguda, a sertralina demonstrou ser capaz de induzir a morte celular por apoptose e por autofagia. Além disso, a inibição da via autofágica pode atenuar parcialmente a apoptose induzida pela sertralina e a inibição do crescimento celular (Xia et al, 2017). Da mesma forma, em tumores de pulmão, o tratamento concomitante de sertralina e erlotinibe (fármaco utilizado para o tratamento de câncer de pulmão) promove, de maneira eficaz, o fluxo autofágico nessas células. Esse co-tratamento também regula a via AMPK/mTOR em células NSCLC (câncer de pulmão de células não pequenas) (Jiang et al., 2018).

Os tratamentos mais utilizados para o tratamento do câncer atualmente incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia a laser, terapia hormonal, imunoterapia, transplante de célula tronco e terapia combinada (National Cancer Institute, 2023). Destas, a quimioterapia é uma opção bastante frequente (Mansoori et al., 2017). Porém, células tumorais podem adquirir resistência a drogas quimioterápicas, e 90% das falhas da quimioterapia estão associadas a resistência a drogas, permitindo invasão e metástase tumoral (Mansoori et al., 2017). Existem evidências que apontam o potencial da sertralina como droga quimiosensibilizadora. A utilização da sertralina tem um efeito potencializador do quimioterápico, tornando o quimioterápico mais efetivo.

Em tumores gástricos, a sertralina exibiu efeitos sensibilizantes moderados em células tumorais gástricas resistentes a drogas, por meio da indução de apoptose (Mu et al., 2021). Já em tumor pulmonar, a sertralina causa inibição do fluxo autofágico, levando ao aumento da expressão do receptor de morte 5 (DR5) em células de câncer de pulmão resistentes a TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Zinnah, K.M.A.; Seol, J.W.; Park, S.Y. 2020). Ainda, a sertralina se mostrou uma droga quimiosensibilizadora eficaz, tanto *in vitro* como *in vivo*, em adenocarcinoma de ovário (Drinberg et al., 2014).

## **2.5. Neuroblastoma**

Os neuroblastomas (NB) são tumores com origem nas células do sistema nervoso simpático (Park et al., 2019). Este tumor é considerado o tumor sólido

extracraniano mais comum em crianças, contabilizando aproximadamente 8% de todos os tumores infantis e 15% da mortalidade por câncer infantil (Brodeur et al., 2016). Geralmente, os NB se desenvolvem no abdômen e são frequentemente localizados na glândula adrenal (Mlakar et al., 2017; Twist et al., 2019). A taxa de sobrevida para pacientes que possuem neuroblastoma de risco baixo e intermediário é 100%, porém, para pacientes que apresentam alto risco, a taxa de sobrevida para 5 anos, é menor que 50% (Park et al., 2019).

Existem vários parâmetros prognósticos que são utilizados para classificar os tumores NB. Entre eles: o grau de diferenciação do tumor, presença ou não de estroma, índice de mitose-cariorrexe (MKI), idade do paciente, categoria histológica, status de amplificação do gene MYCN (tumores com o gene amplificado apresentam pior resultado para o paciente), ploidia do DNA e deleção do cromossomo 11q (Shimada et al., 1984; Valter, K, Zhivotovsky, B, Gogvadze, V.C. 2018).

O sistema Internacional de Estadiamento do Grupo de Risco de Neuroblastoma (INRGSS) é utilizado para separar os neuroblastoma em 4 estágios. O estágio L1 engloba tumores localizados e que não envolvem estruturas vitais definidas pelo IDRF (*Image-Defined Risk Factors*, fatores de risco definidos por imagem). O estágio L2 são tumores locoregionais que apresentam um ou mais fatores de risco definidos por imagem. O terceiro estágio M compreende a doença metastática distante, com exceção do estágio MS. O estágio MS abrange metástases que ocorre em pacientes mais novos que 18 meses. As metástases estão confinadas a pele, fígado e medula óssea (Monclair et al., 2009).

Os pacientes que fazem parte do grupo de baixo risco geralmente são tratados com terapia mínima, sendo que em alguns casos somente a cirurgia é suficiente e em outros, há regressão espontânea do tumor (Berlanga, P.; Cañete, A.; Castel, V. 2017). Pacientes que apresentam risco intermediário são tratados com quimioterapia moderada, podendo passar por cirurgia para remoção da massa tumoral remanescente (Johnsen, J.I.; Dyberg, C.; Wickström, M. 2019). Já em casos de grupo de risco, os pacientes são submetidos a três blocos de tratamento (Pinto et al., 2017). Inicia-se o tratamento com quimioterapia de indução e cirurgia com o objetivo de reduzir a massa tumoral e diminuir o risco

de metástases. O segundo bloco de tratamento envolve a administração de quimioterápico de alta dose acompanhada de transplante autólogo de células-tronco (ASCT) e radioterapia. A terceira parte, chamada de manutenção, envolve imunoterapia com anticorpo anti-disialogangliosídeo (GD2) com citocinas e terapia de diferenciação com retinol 11-cis (Coughlan et al., 2017; Smith V, Foster J. 2018). Dos pacientes de alto risco, 50% não respondem ao primeiro protocolo de terapia ou acabam tendo recaída após o tratamento (London et al., 2011). Devido à grande heterogeneidade do tumor, resistência a drogas e toxicidade associada aos tratamentos convencionais, o NB apresenta respostas ruins para o seu tratamento.

O neuroblastoma de alto risco caracteriza-se pela desregulação das vias de sinalização proliferativa (Cheung, N.K.V.; Dyer, M.A. 2013). Considerando a dependência da via da proliferação, uma estratégia na terapia desses tumores é inibir um dos principais componentes da maquinaria mitótica, como por exemplo, a polo-like kinase 1 (PLK1) (Lens, S.M.; Voest, E.E.; Medema, R.H. 2010; Strebhardt, K. 2006). Já foi demonstrado que quando há inibição da atividade de PLK1 ocorre uma diminuição significativa na viabilidade celular *in vitro* de células de neuroblastoma (Faisal et al., 2011). A TCTP é alvo da ação da quinase PLK1, que fosforila a TCTP nos resíduos serina 46 e serina 64 (Ackermann et al., 2011; GORLICK et al, 2014). A TCTP já foi descrita como potencial biomarcador da atividade de PLK1 *in vivo* (Cucchi et al., 2010) e desta forma, o neuroblastoma já foi associado com a proteína TCTP. Inibidores da PLK1 também foram avaliados em diferentes tumores: leucemia, mama, cérebro, fígado, pulmão, ovário, pâncreas, próstata e útero (Steehmaier et al., 2007).

Os neuroblastomas destacam-se pela ocorrência do fenômeno de regressão tumoral. A regressão tumoral é definida como a redução ou desaparecimento completo do tumor, primário ou metastático, sem intervenção terapêutica (Papac, R.J. 1998). Esse processo já foi observado em carcinoma renal, melanoma maligno e em linfomas, porém, em neuroblastoma tem maior prevalência (Papac, R.J. 1998).

Inicialmente foi visto que os pacientes que apresentam maior propensão de sofrer regressão espontânea são aqueles do grupo MS, que incluem crianças com menos de 1 ano e 6 meses, e apresentam um padrão de metástase (pele,



fígado e medula óssea) (Diede, S.J. 2014). Porém, hoje, sabe-se que essa regressão não é restrita ao estágio MS, e pode ocorrer em qualquer estágio, desde que o tumor seja biologicamente favorável (Cozzi et al., 2013). Os processos moleculares responsáveis por esse processo ainda são desconhecidos, porém, por meio de *screening* da massa tumoral e mapeamento genômico dos tumores MS, alguns mecanismos já foram descritos. Em tumores NB que regressam há baixa expressão de TERT (Hiyama et al., 2008), sugerindo que a crise do telômero pode estar associada a regressão tumoral (Matthay et al., 2016). Também foi visto que a alta expressão de TrkA (receptor de neurotrofina) é encontrada em tumores que tendem a regredir. Essa alta expressão está associada a características clínicas e biológicas favoráveis ao paciente (Nakagawara, A. 2001). A imunidade do paciente também pode estar associada a regressão do tumor. Assim, o estudo da TCTP relacionado com neuroblastoma pode apresentar novos dados e contribuir na busca de novas possíveis terapias.

## **2.6. Glioblastoma**

Os gliomas são tumores cerebrais primários, classificados de acordo com sua célula de origem presumida (Hanif et al., 2017). Os gliomas incluem tumores astrocíticos (astrocitoma, astrocitoma anaplásico e glioblastoma), oligodendrogliomas, ependimomas e gliomas mistos (Agnihotri et al, 2013). De acordo com WHO (2021) quatro grupos gerais de gliomas são reconhecidos: gliomas difusos (adulto), gliomas difusos de baixo grau (pediátrico), gliomas difusos de alto grau (pediátrico) e gliomas astrocíticos circunscritos. Os gliomas difusos (adulto) incluem o glioblastoma (Osborn et al., 2022).

O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral primário mais maligno e de ocorrência mais frequente em adultos. A incidência do tumor é de 2 a 3 casos a cada 100.000 pessoas, correspondendo a 51% dos gliomas malignos e 14,9% dos tumores cerebrais primários (Cunha, M.L.V; Mauldaun, M.V.C. 2019; Sherrod et al., 2019). Após os 40 anos de idade, há aumento na incidência do GBM, com um pico entre 75 e 80 anos, apresentando 15,3 casos para 100.000 mil pessoas (Alifieris, C.; Trafalis, D.T. 2015; Wick et al., 2018).



Apesar das diferentes terapias existentes contra GBM, ainda é uma doença agressiva com prognóstico extremamente ruim (Hanif et al., 2017), além dos pacientes geralmente possuírem sobrevida de 14 meses após detectado o tumor (Lefranc, F.; Kiss, R. 2008). A alta progressão do tumor deve-se em parte pelas células tronco tumorais que apresentam alta atividade tumorigênica (Wurth et al., 2013). As metástases extracranianas ocorrem em 0,5% dos casos devido a sobrevida restrita (Cunha, M.L.V; Mauldaun, M.V.C. 2019) e a recorrência é incidente para a maior parte dos pacientes (Kazmi et al., 2019; Alifieris, C.; Trafalis, D.T. 2015; Wick et al., 2018).

Os glioblastomas ocorrem quase exclusivamente no cérebro, porém, eles podem aparecer no tronco cerebral, cerebelo e medula espinhal. Além disso, 61% de todos os gliomas primários ocorrem nos quatro lobos do cérebro: frontal (25%), temporal (20%), parietal (13%) e occipital (3%) (*American Association of Neuroscience Nurses [AANN]*, 2014). A organização mundial de saúde (*WHO-World Health Organization*) classifica os gliomas utilizando critérios histopatológicos de I a IV. O glioblastoma é considerado um tumor de nível IV, devido suas características de agressividade, invasão e tipo indiferenciado de tumor (JOVCEVSKA; KOCEVAR; KOMEL, 2013).

O tratamento para glioblastoma é considerado um desafio clínico (Mrugala, M.M. 2013), apresentando dificuldades na eficácia devido a heterogeneidade dos tumores e a presença da barreira hematoencefálica. A cirurgia apresenta papel importante em GBM, pois fornece tecido para auxiliar no diagnóstico, além da remoção da massa gerar alívio na pressão intracranial e seus sintomas associados (Lukas et al., 2019). A radioterapia promove aumento na sobrevida dos pacientes e a radiação utilizada depende do volume da massa tumoral. Em relação a quimioterapia, vários agentes quimioterápicos vêm sendo testados para avaliar sua efetividade no tratamento de glioblastoma (Iacob, G.; Dinca, E.B. 2009). Das drogas testadas a temozolomida (TMZ), a carmustina e a lomustina apresentam vantagem em relação a outras drogas e têm sido utilizadas em muitos casos (Curado et al., 2007). Hoje, um dos tratamentos mais promissores inclui drogas que penetram adequadamente o CNS, como a temozolomida, alternando-se com campos elétricos chamados de TFields (Tumor-treating Fields) (Lukas et al., 2019).

Gu e colaboradores (2014) demonstraram que a transfecção de células U-251 (glioblastoma) e H-4 (neuroglioma) com TCTP resultou em aumento do crescimento e da proliferação celular *in vitro*. Da mesma forma, quando as células foram injetadas por via subcutânea em camundongos, a superexpressão de TCTP resultou em tumores com volume dramaticamente aumentados em comparação com os controles. Análises de imunodeteção (*western blot*) foram realizadas para caracterizar o padrão de expressão de TCTP em 45 gliomas e 22 tecidos cerebrais normais (Miao et al., 2013). Quando comparado, a expressão de TCTP é maior em tecidos tumorais. Além disso, em tecidos de glioma de alto grau (III-IV) os níveis de TCTP apresentam aumento significativo quando comparado com tecidos de grau baixo.

### **3. Objetivos:**

#### **3.1. Objetivo geral:**

Avaliar a relevância da proteína TCTP e sertralina no contexto tumoral do neuroblastoma (*in vitro*) e do glioblastoma (*in vitro* e *in vivo*).

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- 3.2.1.** Avaliar o conteúdo proteico intracelular de TCTP e os efeitos do tratamento com sertralina em linhagens de neuroblastoma (CHLA-20, SH-SY5Y diferenciada, SH-SY5Y, IMR32).
- 3.2.2.** Avaliar os efeitos da sertralina em linhagem de neuroblastoma (SH-SY5Y) durante do processo de diferenciação induzida por ácido retinóico.
- 3.2.3.** Avaliar o conteúdo de TCTP e os efeitos do tratamento com sertralina em linhagem de glioblastoma murino (GL261).
- 3.2.4.** Avaliar o conteúdo de TCTP e os efeitos do tratamento com sertralina em modelo animal de glioblastoma (GL261) subcutâneo, utilizando camundongos C57BL6.
- 3.2.5.** Avaliar os efeitos do tratamento com sertralina em modelo animal de glioblastoma (GL261) intracerebroventricular e seu comportamento durante o tratamento, utilizando camundongos C57BL6.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Ensaios *In Vitro***

#### **4.1.1. Cultivo Celular**

As linhagens de neuroblastoma CHLA-20 indiferenciada, SH-SY5Y indiferenciada, SH-SY5Y diferenciada e IMR-32; e de glioblastoma GL261, foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen), e suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco). No meio foi adicionado 40 mg/L de gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, USA). As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Os controles para os ensaios foram somente meio de cultura (DMEM + 10% SFB) e o solvente da sertralina (DMSO), sempre utilizado na maior concentração utilizada nos testes (0,01% v/v).

#### **4.1.2. Ensaio de viabilidade celular (Celltiter Glo)**

Para analisar a viabilidade celular das linhagens foram utilizadas duas metodologias baseadas em atividade metabólica, o ensaio de MTT e o kit Celltiter-glo (Promega). Para o ensaio utilizando o kit Celltiter-Glo, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, com  $8 \times 10^3$  células por poço. Após adesão, o meio foi trocado por meio sem soro fetal bovino. Após 12 horas, foi adicionado novo meio com 10% de SFB e o tratamento (sertralina: 0,5 e 1  $\mu$ M- concentrações previamente padronizadas) ou controles na placa. Após 24, 48 e 72 horas, a viabilidade das células foi mensurada por meio da quantificação de ATP por luminescência. Trinta minutos antes de adicionar o reagente, a placa foi retirada da incubadora e colocada no fluxo laminar para atingir a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 100  $\mu$ l do reagente (Celltiter-Glo) por poço. Os poços foram homogeneizados e protegidos da luz durante 10 minutos. Em seguida, foi realizado a leitura da luminescência no equipamento Tecan Infinite 200.

#### **4.1.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)**

Para o ensaio de MTT as células foram cultivadas em placas de 96 poços, com  $8 \times 10^3$  células por poço. Após adesão, o meio foi trocado por meio sem soro fetal bovino. Após 12 horas, foi adicionado novo meio com 10% de SFB e o

tratamento (sertralina: 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ) ou controles na placa. Após 24, 48 e 72 horas, a viabilidade das células foi quantificada através da atividade metabólica celular. Inicialmente o tratamento foi retirado, os poços foram lavados com PBS 1x, e em seguida, foi adicionado 100  $\mu\text{l}$  do reagente MTT (0,5 mg/ml). Após 2,5 horas, o reagente foi retirado da placa, e adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  de DMSO. Os poços foram homogeneizados e foi realizado a leitura em 550 nm no espectrômetro Meridian/EL x800.

#### 4.1.4. Proliferação Celular

Para o ensaio de proliferação celular, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com  $8 \times 10^3$  células por poço. Após adesão, o meio foi trocado por meio sem soro. Após 12 horas, foi adicionado novo meio com 10% de SFB e o tratamento na placa. Após 24, 48 e 72 horas, o tratamento foi removido dos poços. A placa foi vedada com parafilm e levada para o freezer  $-80^\circ\text{C}$ , onde permaneceu durante 24h, para promover a lise celular. Em seguida, as placas foram retiradas do freezer  $-80^\circ\text{C}$  e deixadas na bancada até atingir temperatura ambiente. Para determinar a densidade celular foi adicionado 200  $\mu\text{l}$  do reagente do kit CyQuant (ThermoFisher) em todos os poços. A placa foi incubada durante 3 minutos, em temperatura ambiente e protegida da luz. A leitura da fluorescência foi realizada no equipamento Tecan Infinite 200, com comprimento de onda de emissão em 520 nm e de excitação em 480 nm.

#### 4.1.5. Migração Celular

A metodologia utilizada para avaliar a migração celular foi o ensaio de *scratch/wound healing*. As células foram plaqueadas  $5 \times 10^5$ , com exceção das linhagens CHLA-20 e SH-SY5Y ( $6 \times 10^5$ ) em placa de cultura de 96 poços. Após adesão e o fundo da placa estar completamente forrado com as células, as células foram tratadas com mitomicina C (Sigma) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em meio sem SFB durante 2 horas (droga que inibe a proliferação celular). Após esse período foi feito um *scratch*, isto é, um risco na placa removendo as células (Rodriguez, L.G.; Wu, X.; Guan, J.L. 2005). Logo após o *scratch*, o meio foi removido, o poço lavado com PBS 1x e foi adicionado o tratamento. As células foram incubadas com sertralina nas concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , DMSO (0,01% v/v, controle), ou mantidas apenas em meio (controle) a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . As células foram

fotografadas nos tempos 0, 24 e 48 horas. A área livre de células (entre as duas margens do *scratch*) foi medida utilizando o programa *Image J* (Schindelin et al., 2012). As imagens capturadas foram utilizadas para determinar a migração das células.

#### **4.1.6. Ensaio de Clonogenicidade**

Para avaliar a capacidade de formação de colônias em meio semi-sólido (crescimento independente de ancoragem) foram utilizadas placas de 6 poços. Em cada poço da placa foi adicionado uma camada contendo ágar 1% em meio de cultura DMEM 2x, 10% SFB e gentamicina (40 mg/L) (1,5 mL/poço). Após a solidificação da base, foi adicionada uma nova camada. Essa segunda camada é composta por ágar 0,7% em meio DMEM 2x, contendo  $6 \times 10^3$  células, 10% SFB, gentamicina (40 mg/L) e tratamentos: somente meio, DMSO (0,01% v/v), sertralina 0,5  $\mu$ M e sertralina 1  $\mu$ M. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após 20 dias de incubação, as células foram coradas com 500  $\mu$ L de Cristal Violeta 0,005% (g/mL) por 20 minutos. As colônias foram contadas utilizando microscópio invertido Leica DM IL (Leica Microsystems).

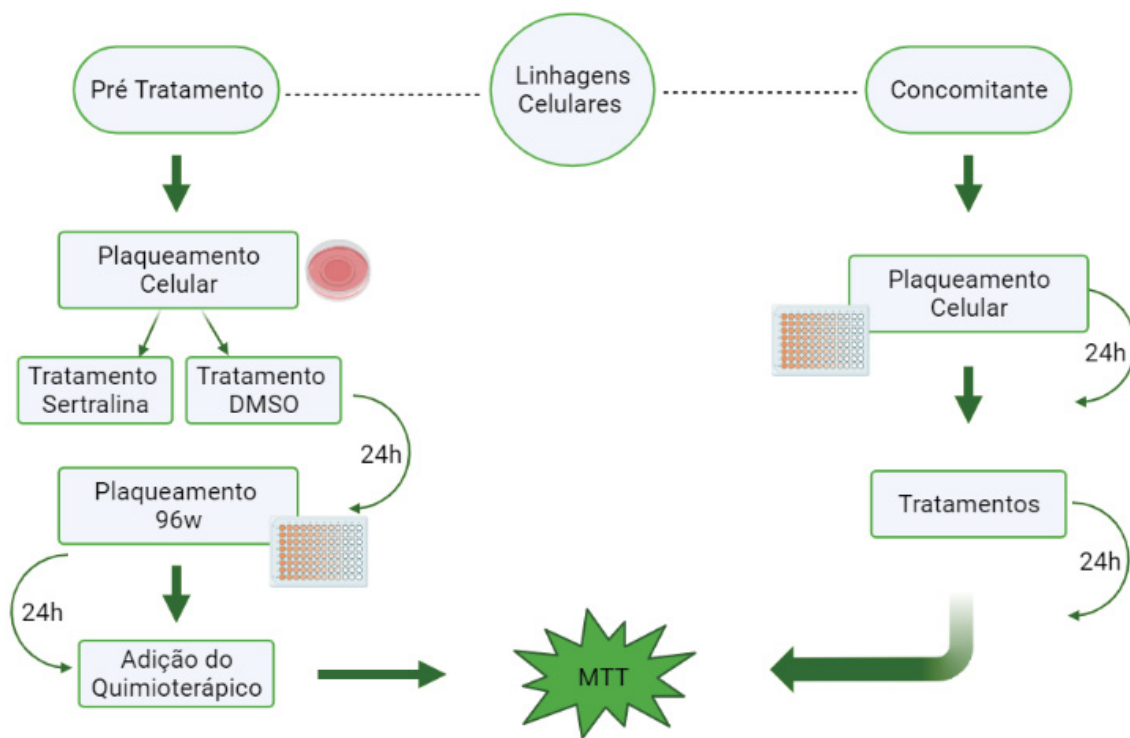
#### **4.1.7. Quimiossensibilização**

Para avaliar a sertralina como uma droga sensibilizadora, potencializando o efeito a quimioterápicos, dois protocolos diferentes foram utilizados: o tratamento concomitante e o pré-tratamento (figura 2). Ao final de ambos os protocolos, a viabilidade foi mensurada pelo método MTT.

Para o tratamento concomitante, as células foram plaqueadas  $8 \times 10^3$  células por poço, em placa de 96 poços. Após adesão celular, o meio foi trocado por meio sem soro fetal bovino. Após 12 horas, o meio sem SFB foi removido e foi adicionado novo meio contendo SFB e os tratamentos: somente meio de cultura, DMSO (0,01% v/v, solvente da sertralina e da temozolomida), sertralina (1  $\mu$ M), água destilada (solvente da doxorrubicina), doxorrubicina (utilizada para linhagens de neuroblastoma: 0,05 e 0,1  $\mu$ M) e temozolomida (utilizada para glioblastoma: 15 e 20  $\mu$ M). Após 24 horas, o meio foi removido, os poços foram lavados com PBS 1x e foi adicionado 100  $\mu$ l de MTT. A placa foi colocada em estufa durante 2,5 horas. Em seguida, o reagente foi retirado e adicionou-se 100

$\mu\text{l}$  de DMSO. Os poços foram homogeneizados e a leitura foi realizada em 550 nm no espectrômetro Meridian/EL x800.

Para o pré-tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas e colocadas em duas placas de Petri (100 mm) contendo meio DMEM suplementado com SFB. Após adesão celular, o meio foi trocado por meio sem soro fetal bovino. Após 12 horas, o meio foi substituído por meio contendo SFB e em uma das placas foi adicionado 1  $\mu\text{M}$  de sertralina e na outra DMSO (0,01% v/v). As placas foram incubadas com o tratamento durante 24 horas. Em seguida, as células tratadas foram tripsinizadas, lavadas e re-plaqueadas em placa de 96 poços,  $8 \times 10^3$  célula por poço. Após adesão celular, o meio foi novamente trocado por meio sem soro fetal bovino. No outro dia, as células receberam os tratamentos: somente meio de cultura, água destilada (solvente da doxorrubicina), doxorrubicina (0,05 e 0,1  $\mu\text{M}$ ) e, no caso das células de glioblastoma, temozolomida (15 e 20  $\mu\text{M}$ ). Após 24 horas, o tratamento foi removido e conforme o protocolo de MTT, foi avaliada a viabilidade celular.



**Figura 2:** Esquema representativo do ensaio de quimiosensibilização, Métodos concomitante e pré-tratamento.

#### **4.1.8. Diferenciação Celular**

As células indiferenciadas da linhagem SH-SY5Y foram plaqueadas ( $20 \times 10^3$  células por poço) em placas de 12 poços. Após 24 horas, o meio foi aspirado e foi adicionado o tratamento (sertralina 0,5 e  $1 \mu\text{M}$ ) em meio completo com 10% de ATRA (ácido all-trans-retinóico). Os controles utilizados foram somente o meio de cultura, DMSO (0,01% v/v), e DMSO e meio com ATRA. A placa foi mantida na incubadora durante 10 dias e o meio com tratamento foi trocado a cada dois dias. Durante esse período as células foram fotografadas para avaliação da morfologia e ao final do décimo dia os extratos celulares foram coletados para avaliação com marcador de diferenciação (sinaptofisina) e de TCTP por imunodeteção (*western blot*).

#### **4.2. Extratos proteicos**

Os extratos proteicos das linhagens celulares foram obtidos a partir de  $15 \times 10^4$  células. Após os procedimentos experimentais, as células foram coletadas das placas de cultivo e ressuspensas em 80  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH7.6, 50 mM KCl, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2 mM phenylmethylsulphonylfluoride,  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  aprotinin,  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$  leupeptin, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, and 20% glycerol). Após ressuspensão, as amostras foram rompidas por ultrassom em potência média por 15 segundos a  $4^\circ\text{C}$ , e, em seguida, os tubos foram centrifugados a  $20.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Os sobrenadantes foram coletados e a quantidade de proteína foi dosada pelo método Micro BCA (Micro BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific, Waltham, USA).

#### **4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) em condições redutoras. Para separação das proteínas (50  $\mu\text{g}$  do extrato total) foi aplicada corrente de 25 mA constante (Harlow, E.; Lane, D. 1988).

#### **4.4. Ensaio de imunodeteção (*Western Blot*)**

O ensaio de *Western Blot* foi realizado para avaliar e identificar a presença das proteínas TCTP, GAPDH (controle endógeno) e sinaptofisina nos extratos



celulares. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membranas de nitrocelulose (Whatman, Dassel, Alemanha) com aplicação de voltagem constante (10 V) por 30 minutos em tampão de transferência (48 mM tris, 39 mM glicina, metanol 20%). As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS contendo caseína, por 1 hora à temperatura ambiente. Para detecção das proteínas TCTP, GAPDH e sinaptofisina nos extratos, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos por 16 horas à temperatura de 4°C. (anti-TCTP, 1:6000, produzido em coelho, Santa Cruz Biotechnology), (anti-sinaptofisina, 1:5000, produzido em coelho, Cell Signaling) e (anti-GAPDH, 1:7000, produzido em camundongo, Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário, conjugado à peroxidase, durante 1 hora à temperatura ambiente (anti-IgG de coelho para o anti-TCTP e anti-sinaptofisina, e anti-IgG de camundongo para o anti-GAPDH, ambos Invitrogen). Para revelação foi utilizado substrato quimioluminescente (West Dura, Pierce Co.) (Harlow, E.; Lane, D. 1988). A densitometria das bandas para normatização da quantidade de extrato proteico foi realizada através do programa *ImageJ* (Schindelin et al., 2012).

#### **4.5. Ensaios *In Vivo***

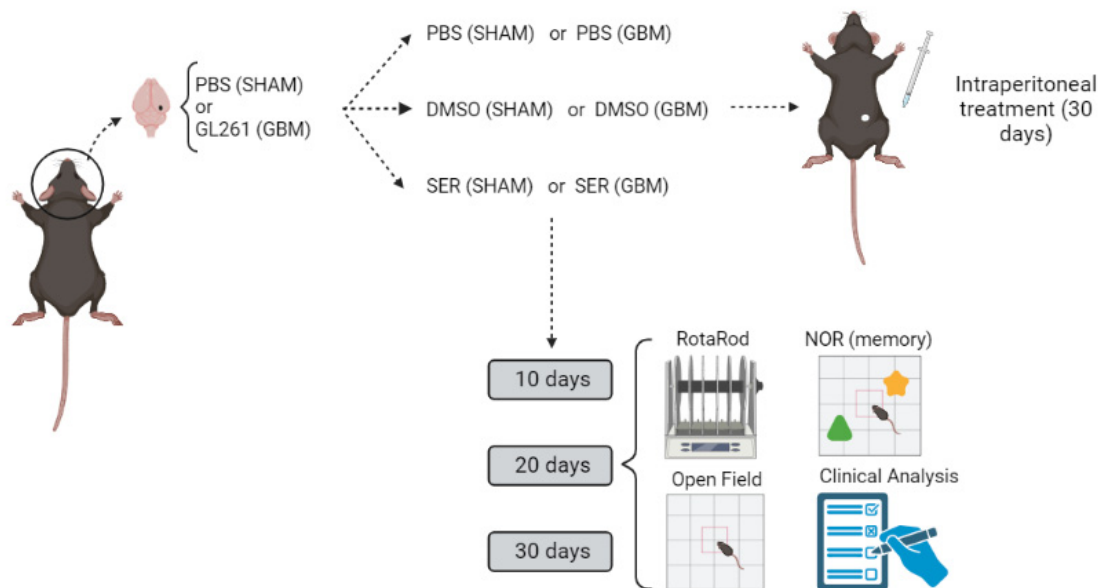
##### **4.5.1. Ensaios *in vivo* em modelo animal de Glioblastoma**

Para a realização dos ensaios da avaliação da sertralina *in vivo* em glioblastoma murino foi utilizado o modelo de células GL261 em camundongos C57BL/6. Nós utilizamos duas versões deste modelo: células GL261 inoculadas intracerebroventricularmente ou via subcutânea no dorso dos animais. Estes procedimentos foram aprovados em Comitê de ética em experimentação animal (CEUA/UFPR, certificado nº 1296 e nº 1460). Utilizamos 96 camundongos C57BL/6 com dois meses de idade. Para o ensaio subcutâneo foram utilizados 30 animais, sendo 5 animais para cada grupo (PBS, DMSO e Sertralina) e o experimento foi realizado 2 vezes. E para o ensaio intracerebroventricular foram usados 66 animais, sendo 11 animais por grupo (SHAM PBS, DMSO e SER, GBM PBS, DMSO e SER). Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de 12/12 horas a uma temperatura de  $22 \pm 1$  °C, tendo livre acesso à água e alimentação padrão para roedores.



Para o ensaio subcutâneo, os camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $2 \times 10^6$  células GL261 no dorso. Após a inoculação das células, foi dado o tempo de 15 dias para fixação e início do crescimento tumoral. Após esse período, o tratamento diário e por via intraperitoneal foi iniciado (tratamento realizado todos os dias as 11 horas). Um grupo recebeu somente PBS, um grupo recebeu DMSO e o último grupo recebeu sertralina (10 mg/kg), em volume de 100  $\mu$ l. Após os 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tumores foram coletados, pesados e armazenados para posteriores análises.

Para o experimento intracerebroventricular, foram utilizados 66 animais, divididos em dois grupos, o SHAM (controle) e o GBM (glioblastoma) (figura 3). Estes animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica intracerebroventricular, na qual o grupo SHAM foi inoculado com PBS (3  $\mu$ l) e o grupo GBM foi inoculado com células tumorais GL261 (3  $\mu$ l,  $2 \times 10^5$  células/mL). Para o procedimento, os animais foram previamente anestesiados por meio da administração intraperitoneal de cetamina (110 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). As soluções de PBS e de células tumorais foram injetadas 2 mm à direita da linha mediana, 1 mm para a frente do bregma, a uma profundidade de 2,5 mm (Lorico et al., 2008). Após a cirurgia, os animais receberam dose diária de analgésico (Tramadol, 20 mg/kg), durante 3 dias.



**Figura 3:** Desenho esquemático do ensaio *in vivo* realizado por meio de cirurgia intracerebral.

Posteriormente, cada grupo (SHAM e GBM) foi subdividido em três grupos: controle, DMSO e sertralina. O tratamento dos animais foi iniciado no sétimo dia após a cirurgia e se estendeu por 30 dias. Os animais foram tratados com injeções intraperitoneais diárias (100 µl), nas quais o grupo controle recebeu apenas PBS, o grupo DMSO recebeu DMSO (mesmo volume utilizado para sertralina, 6µL) em PBS e o grupo sertralina recebeu sertralina (10 mg/kg) em PBS. Durante o período de tratamento, a cada 10 dias, os animais foram submetidos a experimentos comportamentais de campo aberto, memória, Rotarod e análise clínica.

#### 4.5.2. Campo Aberto

Com base em Archer, J. (1973) foi realizado o teste de Campo Aberto (*Open-field test*) com o objetivo de avaliar os possíveis danos locomotores. Primeiramente, os animais foram colocados em uma caixa redonda com quadrantes menores (Figura 4) durante o tempo de 10 minutos para habituação (um animal por vez). Em seguida, eles foram colocados novamente na caixa e filmados durante 5 minutos. Durante esse período foi contabilizado o número de vezes que cada camundongo se apoia apenas nas patas traseiras, o número de vezes que o animal atravessa os quadrados desenhados na caixa utilizada, e o número de bolos fecais produzidos por cada animal.



**Figura 4:** Caixa utilizada para realização dos experimentos comportamentais de campo aberto e memória. **Fonte:** Arquivo pessoal.

#### 4.5.3. RotaRod

Para avaliar os possíveis danos sobre a coordenação motora foi realizado o teste de RotaRod (Godoy et al., 2004). O equipamento consiste em uma barra rotativa (3,7 cm de diâmetro) dividida em 4 compartimentos separados, colocado a uma altura de 25 cm e rodando a uma velocidade fixa de 8 rpm (Figura 5). Os animais foram submetidos ao teste a cada dez dias até o 30° dia do experimento. Inicialmente, os animais eram colocados em cima do equipamento e o parâmetro analisado foi quantos minutos o animal levaria até a exaustão. Em seguida, o animal era colocado novamente no equipamento e durante 4 minutos avaliava-se quantas vezes o animal caía de cima da barra rotativa. Após o término do experimento de cada animal, o equipamento era sempre limpo com álcool etílico 20%.

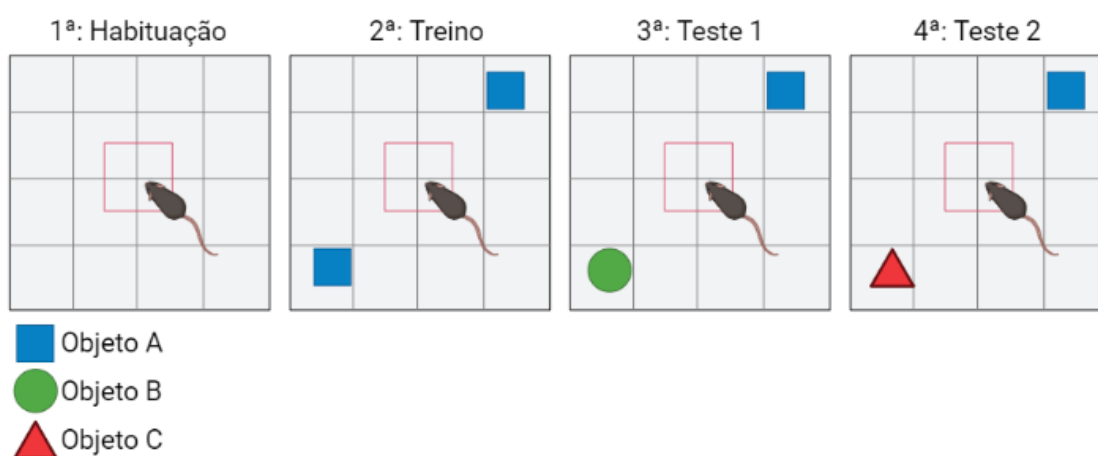


**Figura 5:** Equipamento utilizado para realizar o teste Rotarod.

#### 4.5.4. Memória (NOR- *Novel Object Recognition*)

Para avaliar a memória dos animais foi realizado o teste de reconhecimento de novos objetos (*Novel Object Recognition*) (Ennaceur, A.; Delacour, J. 1988; Lueptow, L.M. 2017). Esse experimento foi dividido em quatro fases: habituação, treino, teste 1 e teste 2 (Figura 6). Inicialmente, na fase de habituação, os animais foram colocados na caixa (Figura 4) e puderam explorar

livremente durante 10 minutos. Após esse período, foi realizado o treino. Os animais foram colocados novamente na caixa na presença de dois objetos idênticos (objeto A), e puderam explorar os objetos durante 5 minutos. Ao término da fase de treino, esperou-se 90 minutos e foi iniciado o teste 1. No teste 1, o animal foi colocado novamente na caixa com o objeto A e um objeto novo (objeto B) para explorar durante 5 minutos. O teste 2 foi realizado 24 horas depois, em que o animal foi colocado na caixa na presença do objeto A e um terceiro novo objeto (objeto C). O teste foi feito a cada 10 dias e em cada troca de animal a caixa e os objetos eram limpos com álcool etílico 20%.



**Figura 6:** Esquema do experimento de reconhecimento de novo objeto (NOR), dividido nas fases: habituação, treino, teste 1 e teste 2.

#### 4.5.5. Indicador geral

Para acompanhar a condição clínica dos animais nesse experimento foram utilizados como indicadores gerais: (i) o controle semanal do peso corporal (utilizando uma balança de precisão 0,001g, marca Sartorius) e (ii) o escore clínico do animal (conforme Stromnes, I.M.; Goverman, J.M. 2006) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento do GBM. **Fonte:** Stromnes, I.M.; Goverman, J.M. 2006.

Escore	Análise Clínica
0	Sem sintomas
0,5	Perda parcial do tônus da cauda
1	Paralisia da cauda (perda do tônus)
2	Perda da coordenação dos movimentos, paralisia das patas posteriores
2,5	Uma das patas paralisadas
3	Ambas as patas paralisadas
3,5	Patas posteriores paralisadas; fraqueza nas patas dianteiras
4	Paralisia das patas anteriores
5	Moribundo

Ao final dos 30 dias, os animais foram eutanasiados por meio do deslocamento cervical após anestesia. O cérebro foi retirado e dividido por lateralidade (esquerdo e direito) e utilizado o lobo parietal de ambos os lados. As amostras foram coletadas, aliquotadas e armazenadas para posteriores análises.

#### 4.6. Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise estatística. Os dados empregados para análise são as replicatas técnicas (quintuplicata ou duplicata para o ensaio de clonogenicidade celular) de cada experimento, sendo utilizado sempre 3 replicatas biológicas por experimento *in vitro*. Os gráficos mostrados nas figuras são referentes a um experimento representativo. Os resultados dos ensaios *in vitro* foram submetidos a análise de variância (ANOVA - duplo sem repetição), e para avaliar as diferenças entre os tratamentos e controle foi utilizado o teste de Bonferroni que permite estabelecer a diferença mínima significativa entre duas médias. Os grupos tratados com sertralina foram sempre comparados com o controle DMSO. A significância foi definida como \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  ou \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Para análise da densitometria de bandas foi utilizado o programa *ImageJ*.

## 5. Resultados

Com o objetivo de abordar os dados do trabalho com maior clareza, os resultados obtidos foram divididos por tipo tumoral estudado: neuroblastoma e glioblastoma.

### 5.1. Neuroblastoma

Em relação aos tumores de neuroblastoma, foram estudadas inicialmente três linhagens indiferenciadas e de origem humana: SH-SY5Y, CHLA-20 e IMR-32. As informações relativas à origem e características de cada linhagem estão contidas na Tabela 2 (abaixo). Em seguida, a linhagem SH-SY5Y foi submetida ao processo de diferenciação celular, por meio de tratamento com ácido trans-retinóico (ATRA), e foi obtida a linhagem SH-SY5Y diferenciada. Este procedimento está bem estabelecido na literatura (Sallmon et al., 2010; Kovalevich, J.; Langford, D. 2013; Teppola et al., 2016). Todas as 4 linhagens foram submetidas ao tratamento com sertralina e aos ensaios de viabilidade celular, proliferação celular, migração e clonogenicidade. A quantificação da proteína TCTP também foi realizada por imunodeteção (*western blot*) após o tratamento com sertralina.

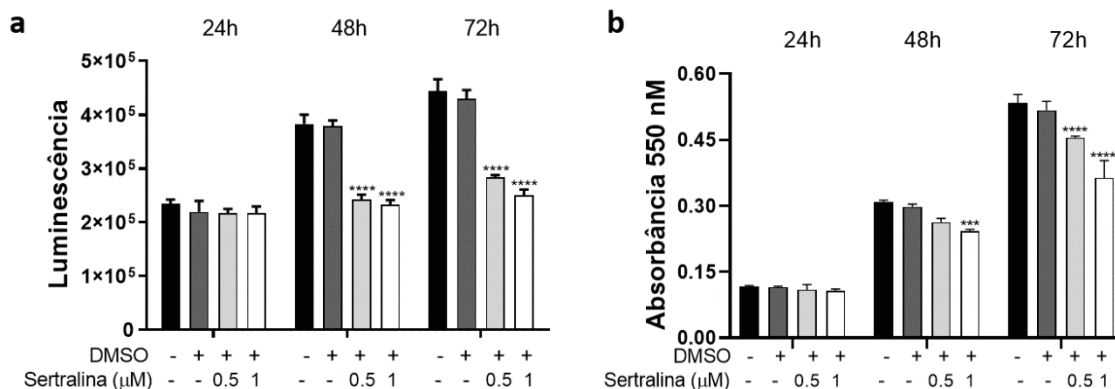
**Tabela 2:** Características das diferentes linhagens de neuroblastoma utilizadas neste trabalho.

Linhagem Celular	Origem	Caracterização do gene MYCN	Caracterização do gene P53	Características	Morfologia Celular
CHLA-20	Tecido coletado pós-tratamento com quimioterápico de uma criança de 24 meses	Não amplificado (HARNED et al., 2008)	Funcional (HARNED et al., 2008)	Indiferenciada; Resistência moderada a drogas (HARNED et al., 2008)	Indeterminada (NASCIMENTO, T.G. 2018)
IMR-32	Tecido cerebral proveniente de uma criança com 13 meses (ATCC, 2022)	Amplificado (ZAATITI et al., 2018)	Funcional (MAERKEN et al., 2011)	Apresenta dois tipos celulares (RAO; KISAALITA, 2002)	Células semelhantes a neuroblastos e fibroblastos grandes (ATCC, 2022)
SH-SY5Y	Derivada da linhagem SK-N-SH (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017)	Não amplificado (ZAATITI et al., 2018)	Funcional (MAERKEN et al., 2011)	Quando são submetidas ao processo de diferenciação, essas células expressam neuritos (KORIYAMA et al., 2015)	Células do tipo epitelial e neuroblasto (ZAATITI et al., 2018)
SH-SY5Y diferenciada	Diferenciada da linhagem SH-SY5Y	Não amplificado	Funcional	Reduz a proliferação celular; Expressam vários marcadores de neurônios maduros (Gimenez-Cassina et al., 2006; Kovalevich, J, Langford, D. 2013)	Fenótipo semelhante a neurônios (KORIYAMA et al., 2015); Apresenta finas ramificações celulares (Kovalevich J, Langford D., 2013)

### 5.1.a. Viabilidade Celular

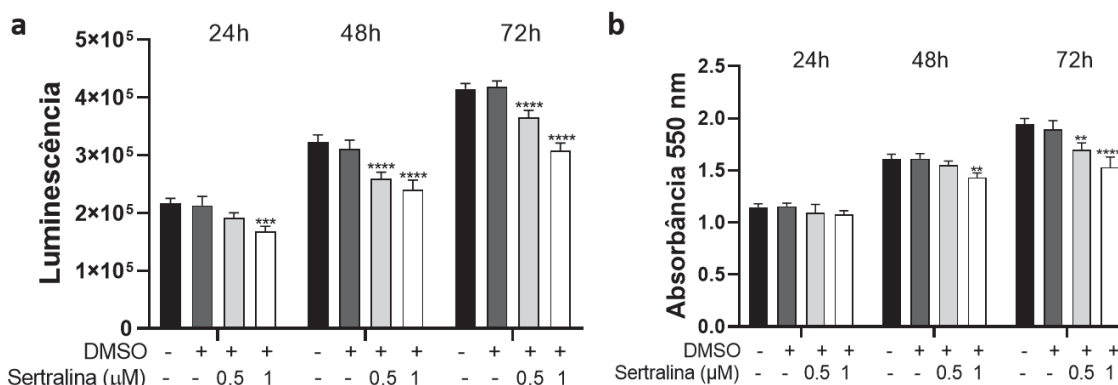
A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de quantificação de ATP por luminescência e atividade metabólica por MTT, nos quais os valores de luminescência e colorimétricos, respectivamente, são diretamente proporcionais ao número de células viáveis. No método de quantificação de ATP é possível avaliar a viabilidade celular por meio da quantidade de ATP presente nas células de cada grupo avaliado. Já no método MTT a viabilidade é mensurada de acordo com a capacidade das células em exercer suas atividades metabólicas, transformando o MTT em um sal solúvel. Na Figura 7 estão os resultados obtidos para a linhagem CHLA-20. Observa-se que em ambas as concentrações de sertralina testadas (0,5 e 1  $\mu$ M) há redução nos valores de luminescência, reportando menor quantidade de células viáveis quando comparadas com os controles (meio e DMSO). O DMSO foi utilizado na mesma concentração (0,01% v/v) utilizada para a maior dose de sertralina. Não houve diferença entre os valores obtidos para o meio de cultivo e controle com DMSO, descartando qualquer efeito do solvente utilizado para sertralina. Os resultados dos tratamentos de 0,5 e 1  $\mu$ M são similares entre si nos dois maiores tempos avaliados, 48 e 72 horas (Figura 7a). O ensaio de MTT (Figura 7b) confirma os

resultados obtidos pela quantificação de ATP: redução de células viáveis nos grupos tratados com sertralina. Em 72 horas, a maior concentração testada (1  $\mu\text{M}$ ) apresenta uma redução de 30% da atividade metabólica quando comparada ao controle DMSO. Os resultados ao longo dos tempos avaliados sugerem um efeito citostático da sertralina sobre as células CHLA-20.



**Figura 7:** Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem CHLA-20 nos tempos de 24, 48 e 72 horas. (a) Ensaio de quantificação de ATP (Celltiter-glo). (b) Ensaio de MTT. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

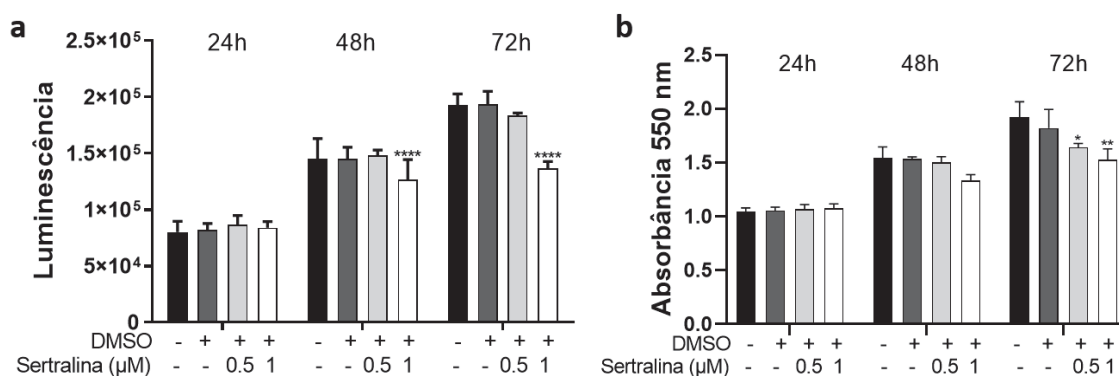
A linhagem IMR-32 também se mostrou sensível ao tratamento com sertralina. Na Figura 8a observamos que há redução da luminescência nos grupos tratados com sertralina em todos os tempos avaliados, com uma diminuição mais pronunciada em 72 horas. No ensaio de MTT (Figura 8b), em 72 horas, temos redução de 10% e 20% das células viáveis para os tratamentos de 0,5  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



**Figura 8:** Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem IMR-32 nos tempos de 24, 48 e 72 horas. (a) Ensaio de quantificação de ATP (Celltiter-glo). (b) Ensaio de MTT. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

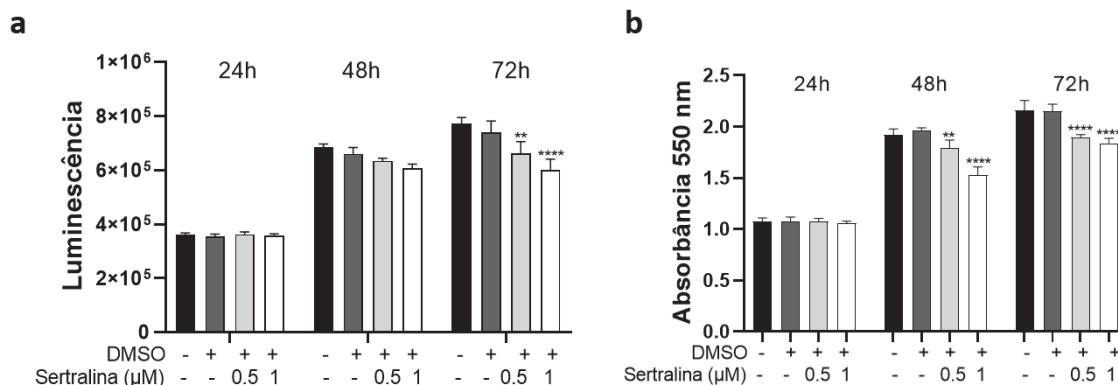


A linhagem SH-SY5Y apresentou uma redução significativa na viabilidade de células após 48 e 72 horas, comparativamente ao controle DMSO, na maior concentração de sertralina testada (1  $\mu\text{M}$ ) (Figura 9). A concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de sertralina não reduziu os valores de luminescência das amostras em nenhum dos tempos testados, quando comparada aos controles. Na Figura 9b observa-se uma diminuição da viabilidade em 72 horas, em que houve uma redução de 10% para a concentração 0,5  $\mu\text{M}$  e 15% para 1  $\mu\text{M}$ . Os resultados ao longo dos tempos avaliados sugerem um efeito citostático da sertralina sobre as células SH-SY5Y.



**Figura 9:** Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem SH-SY5Y nos tempos de 24, 48 e 72 horas. (a) Ensaio de quantificação de ATP (Celltiter-glo). (b) Ensaio de MTT. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*p<0,1; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

Em relação a linhagem SH-SY5Y diferenciada, observa-se que mesmo após a diferenciação, a linhagem manteve-se sensível ao tratamento com sertralina. Na Figura 10a está o resultado da viabilidade por meio do método Celltiter-Glo. É possível avaliar que em 72 horas houve redução da luminescência para ambos os grupos tratados com sertralina (0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ), sendo a maior redução (19%) observada no grupo tratado com 1  $\mu\text{M}$ . Na Figura 10b, com o método de MTT, observa-se que no tempo de 48 horas há redução na viabilidade em ambos os grupos tratados, sendo que a maior concentração (1 $\mu\text{M}$ ) mostrou redução de 22%. Em 72 horas, houve diminuição de 12% para a concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  e 15%, para 1  $\mu\text{M}$ .

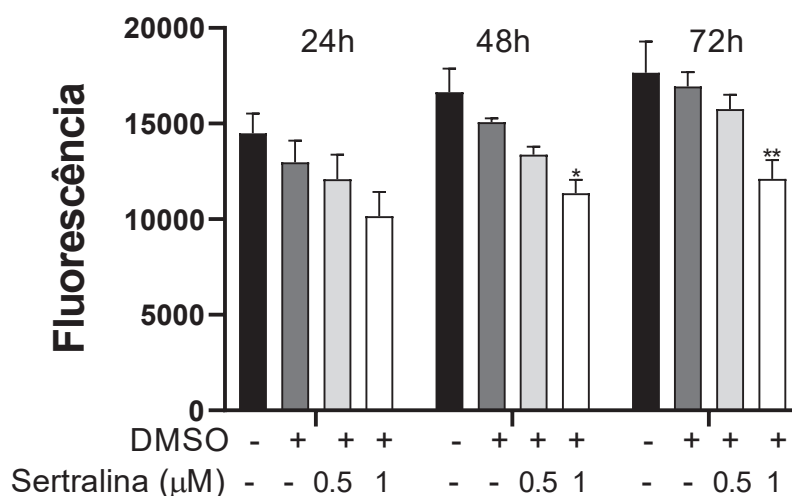


**Figura 10:** Avaliação do tratamento com sertralina na viabilidade celular na linhagem SH-SY5Y diferenciada nos tempos de 24, 48 e 72 horas. (a) Ensaio de quantificação de ATP (Celltiter-glo). (b) Ensaio de MTT. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

### 5.1.b. Proliferação Celular

Os ensaios de proliferação celular foram realizados utilizando o método de fluorescência CyQUANT, baseado na interação do corante fluorescente com o DNA celular. Utilizamos este ensaio para avaliar a proliferação pois este método oferece mais acurácia em relação ao número de células que os métodos baseados em metabolismo (*Celltiter-Glo* e MTT).

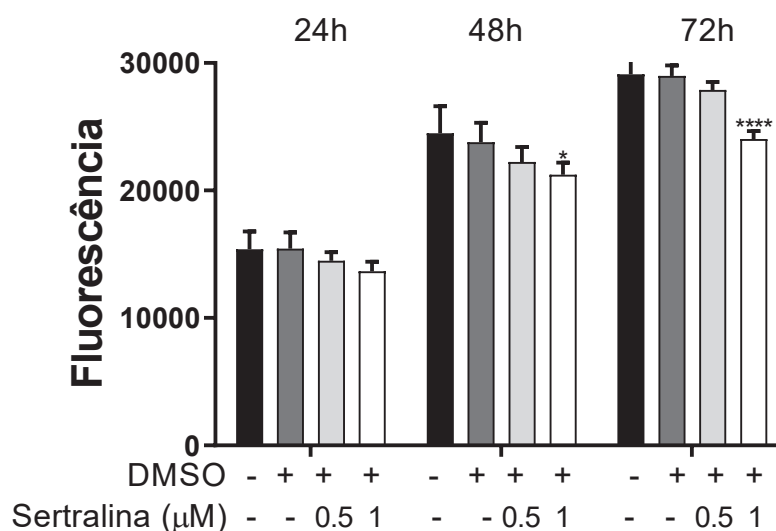
A Figura 11 apresenta o resultado do ensaio de proliferação na linhagem CHLA-20. Constatou-se maior sensibilidade da célula ao tratamento com maior concentração (1 μM), ocasionando um decréscimo na proliferação de 25% e 30%, em 48 e 72 horas, respectivamente.



**Figura 11:** Avaliação do tratamento com sertralina na proliferação celular na linhagem CHLA-20 nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant- excitação 480 nm e emissão 520 nm). Três

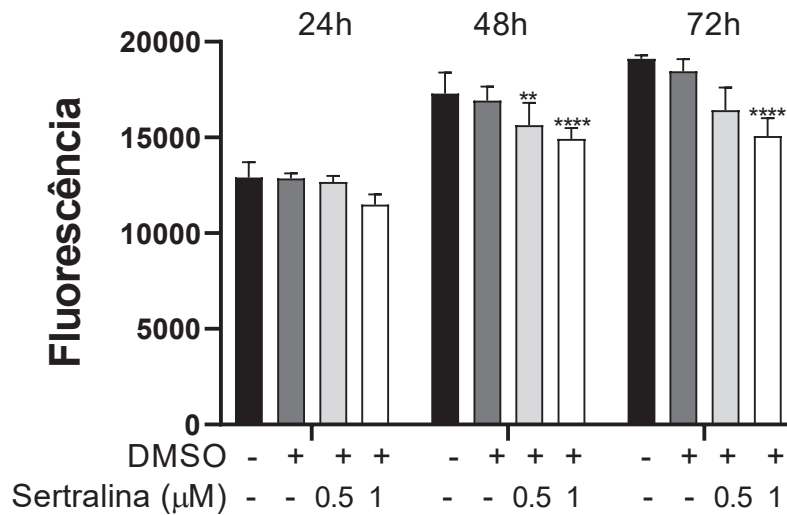
experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*p<0,1; \*\*p<0,01.

A linhagem IMR-32 apresentou menor sensibilidade ao tratamento com sertralina (Figura 12) que as outras duas linhagens indiferenciadas. Apenas a maior concentração testada (1  $\mu$ M) foi capaz de reprimir, de maneira significativa, a proliferação celular. Em 48 horas há diminuição de 10% e em 72 horas, de 18%.



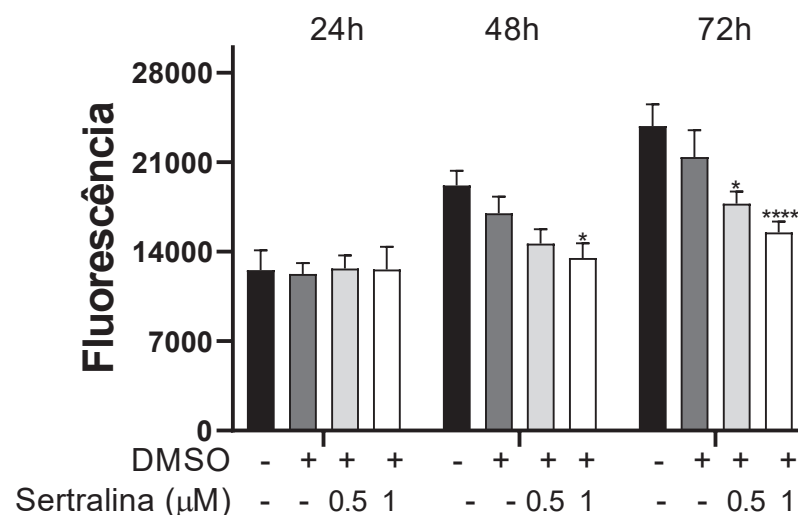
**Figura 12:** Avaliação do tratamento com sertralina na proliferação celular na linhagem IMR-32 nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant- excitação 480 nm e emissão 520 nm). Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*p<0,1; \*\*\*\*p<0,0001.

No ensaio de proliferação da linhagem SH-SY5Y (Figura 13), em 48 horas, nota-se que há uma redução de 8% e 12% para os grupos tratados com sertralina 0,5 e 1  $\mu$ M, respectivamente. Em 72 horas, observa-se redução de 25% da proliferação na maior concentração testada (1  $\mu$ M).



**Figura 13:** Avaliação do tratamento com sertralina na proliferação celular na linhagem SH-SY5Y nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant- excitação 480 nm e emissão 520 nm). Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

A linhagem SH-SY5Y diferenciada apresenta redução na proliferação a partir de 48 horas (Figura 14), com redução de 20% para a maior concentração testada (1 µM). Em 72 horas, observa-se diminuição de 17% para 0,5 µM e 27% para 1 µM.

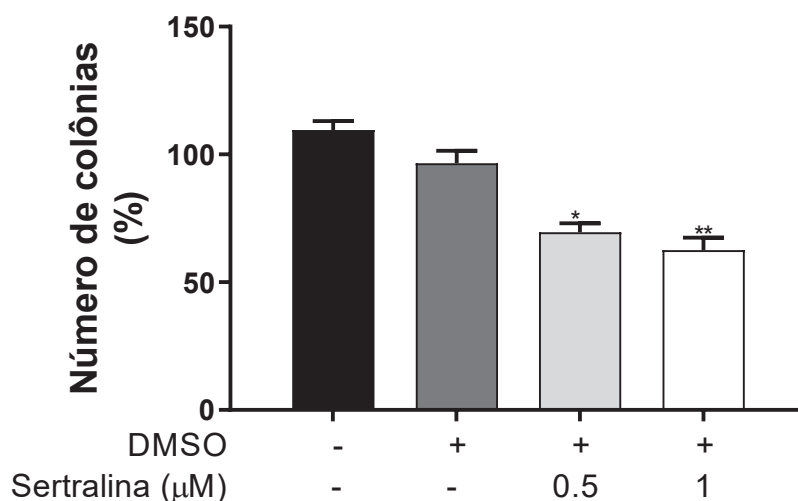


**Figura 14:** Avaliação do tratamento com sertralina na proliferação celular na linhagem SH-SY5Y diferenciada nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant- excitação 480 nm e emissão

520 nm). Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*p<0,1; \*\*\*\*p<0,0001.

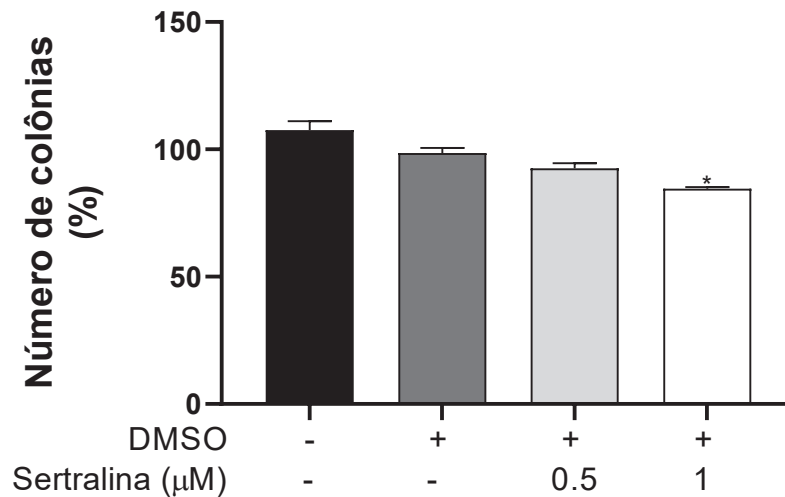
### 5.1.c. Clonogenicidade

Nos experimentos de clonogenicidade, as células foram adicionadas em ágar mole e mantidas em condições de cultivo durante 21 dias. Após esse período, foi contabilizado o número de colônias formadas. Na linhagem de neuroblastoma CHLA-20, constatou-se que a concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  reduziu em 27% a capacidade de formação de colônias e a concentração de 1  $\mu\text{M}$  reduziu em 35% (Figura 15).



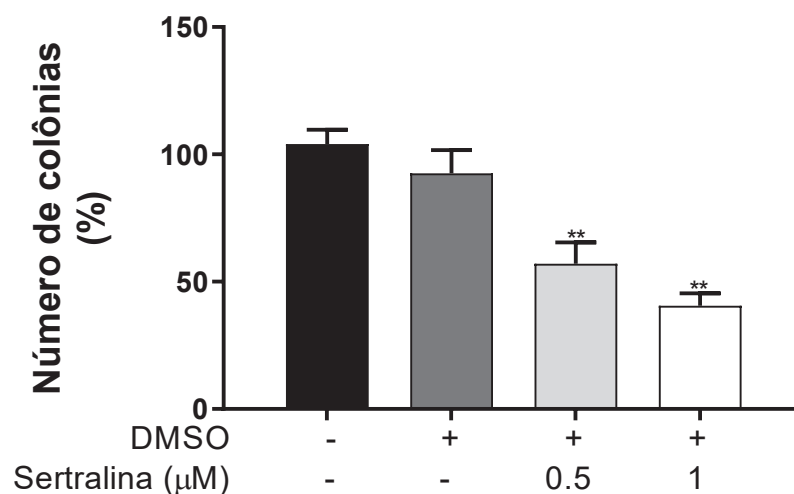
**Figura 15:** Ensaio de clonogenicidade em ágar mole na linhagem de neuroblastoma CHLA-20 (6000 células incubadas em meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes realizados em duplicata (n=2). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*p < 0,1; \*\*p < 0,01.

A linhagem IMR-32 foi menos sensível ao tratamento com sertralina na avaliação de clonogenicidade, assim como observado para o ensaio de proliferação celular. Na Figura 16 observamos que a concentração 0,5  $\mu\text{M}$  não foi capaz de reduzir a formação de colônias de maneira significativa. Já a concentração de 1  $\mu\text{M}$  reduziu em 15% a capacidade de formação de colônias.



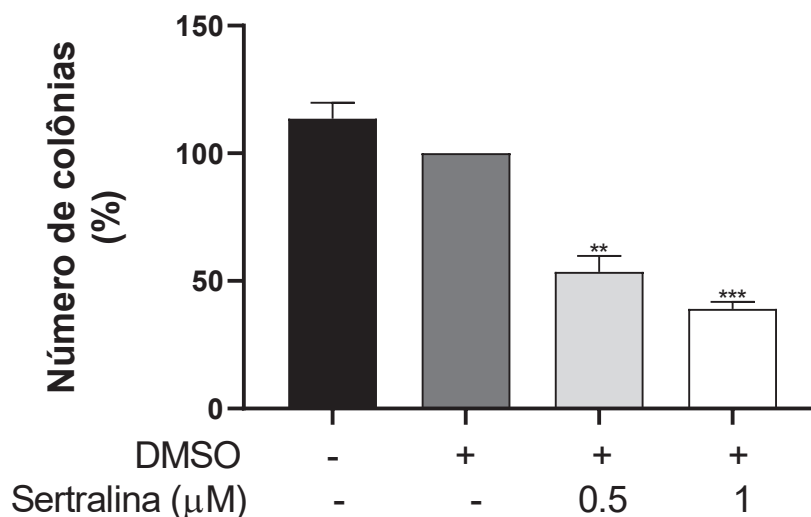
**Figura 16:** Ensaio de clonogenicidade em ágar mole na linhagem de neuroblastoma IMR-32 (6000 células incubadas em meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes realizados em duplicata (n=2). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \* p<0,1.

Nos experimentos com a linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y observa-se uma redução de 43% e 60% na capacidade de formação de colônias nas concentrações de 0,5 e 1 μM, respectivamente (Figura 17).



**Figura 17:** Ensaio de clonogenicidade em ágar mole na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y (6000 células incubadas em meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes realizados em duplicata (n=2). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\* p<0,01.

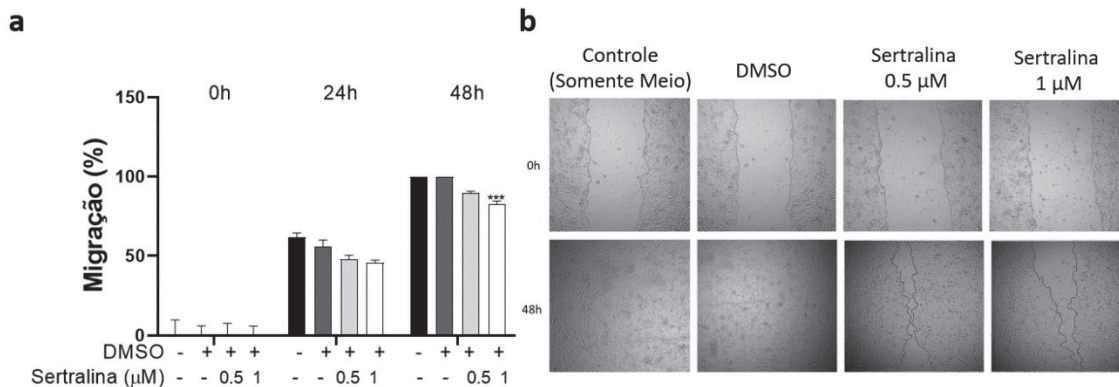
A linhagem SH-SY5Y diferenciada (Figura 18) também mostrou uma diminuição na formação de colônias após o tratamento com sertralina. Foi possível notar redução de 46% na capacidade de crescimento sem ancoragem para a menor concentração testada (0,5  $\mu\text{M}$ ), e 61% para a concentração de 1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 18:** Ensaio de clonogenicidade em ágar mole na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciada (6000 células incubadas em meio semi-sólido por 21 dias). Três experimentos independentes realizados em duplicata (n=2). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

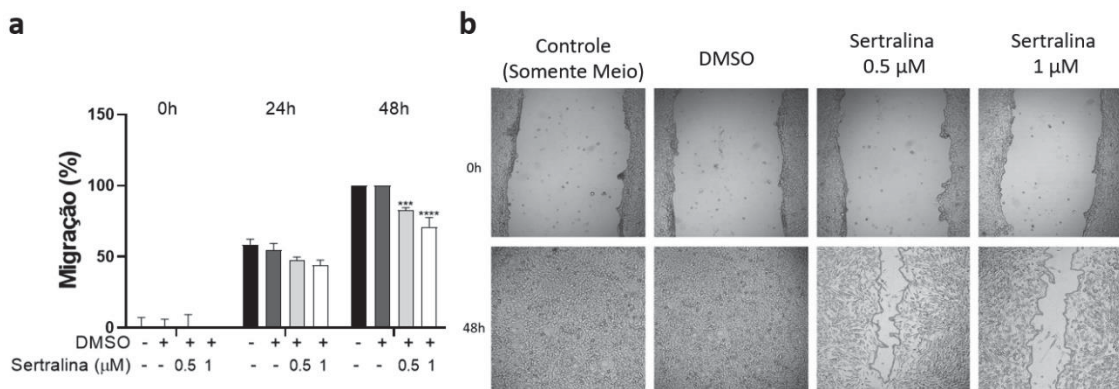
### 5.1.c. Migração celular

Os ensaios de migração celular foram realizados pelo método de *scratch*. Após o risco (“*scratch*”) ter sido feito, os poços foram fotografados a cada 24 horas, até o completo fechamento da área dos riscos feitos nas amostras controles. A linhagem CHLA-20 teve os poços do controle (somente meio) e DMSO completamente fechados em 48 horas (Figura 19). Os grupos tratados com sertralina foram capazes de diminuir a capacidade migratória em 10% para 0,5  $\mu\text{M}$  e 17,5% para 1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 19:** Avaliação do efeito da sertralina na migração celular na linhagem CHLA-20 (método *scratch*). **a)** Gráfico representativo da capacidade migratória nos tempos 0, 24 e 48 horas. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*\*p<0,001. **b)** Imagens dos “*scratches*” nos tempos 0 e 48 horas.

A avaliação da migração da linhagem IMR-32 está apresentada na Figura 20. No gráfico mostrado, observa-se que os poços controles fecharam o “*scratch*” no tempo de 48 horas. Os grupos tratados com sertralina mostraram sensibilidade, sendo capazes de reduzir em 17% (0,5  $\mu\text{M}$ ) e 26% (1  $\mu\text{M}$ ) da capacidade migratória da linhagem.

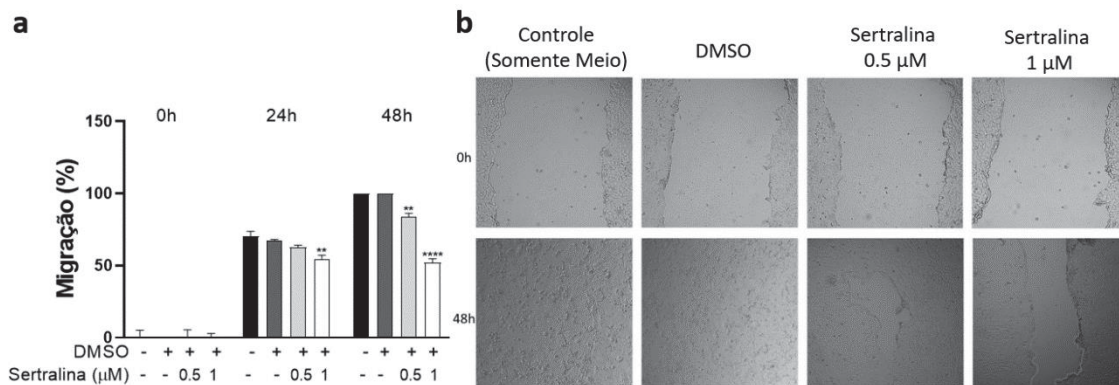


**Figura 20:** Avaliação do tratamento com sertralina na migração celular na linhagem IMR-32 (método *scratch*). **a)** Gráfico representativo da capacidade migratória nos tempos 0, 24 e 48 horas. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. **b)** Imagens dos “*scratches*” nos tempos 0 e 48 horas.

Os resultados para a linhagem SH-SY5Y indiferenciada estão apresentados na Figura 21. Os “*scratches*” (riscos) dos grupos controle e DMSO foram fechados em 48 horas, enquanto as células tratadas com sertralina não foram capazes de preencher a área livre de células neste período, evidenciando

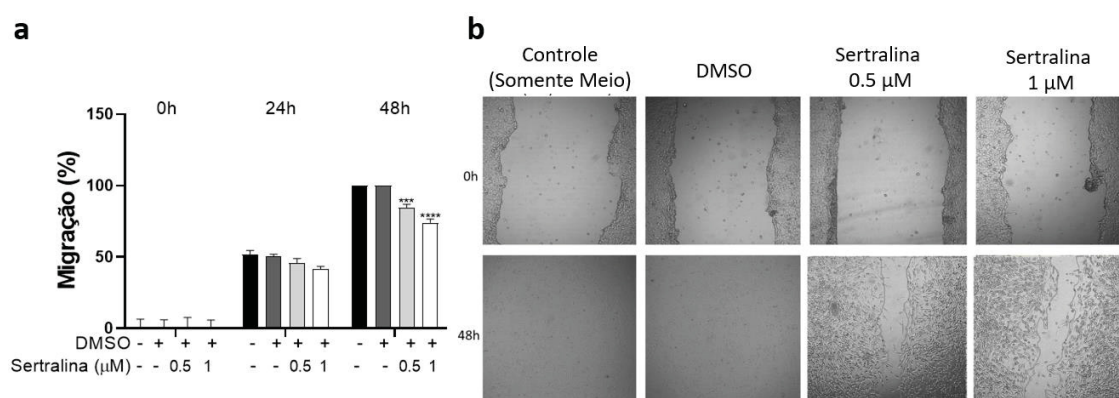


efeito inibitório da sertralina na capacidade migratória. As células tratadas tiveram uma diminuição na migração celular de 20% e 48%, nas concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



**Figura 21:** Avaliação do tratamento com sertralina na migração celular na linhagem SH-SY5Y indiferenciada (método *scratch*). **a**) Gráfico representativo da capacidade migratória nos tempos 0, 24 e 48 horas. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata ( $n=5$ ). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo,  $**p<0,01$ ;  $****p<0,0001$ . **b**) Imagens dos “*scratches*” nos tempos 0 e 48 horas.

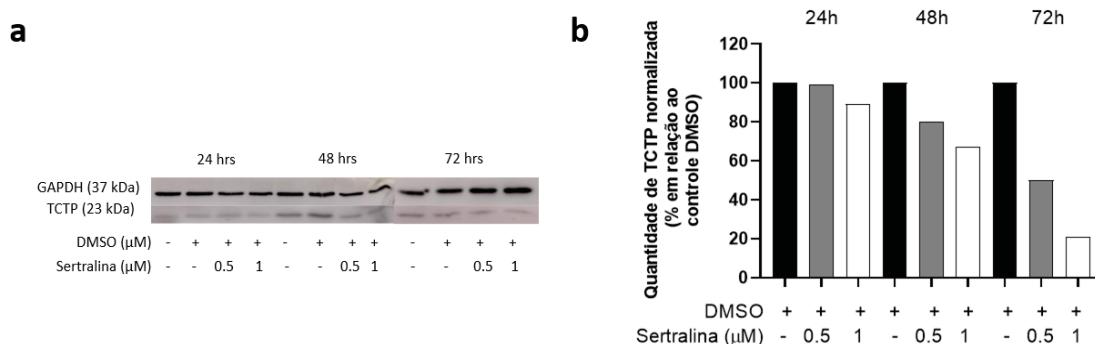
A linhagem SH-SY5Y diferenciada apresentou menor sensibilidade a sertralina quando comparada com a linhagem SH-SY5Y indiferenciada quanto a migração celular (Figura 22). Em 48 horas, os grupos controles tiveram o risco fechado, enquanto o tratamento 0.5  $\mu\text{M}$  apresentou 15% de redução e o de 1  $\mu\text{M}$ , redução de 30%.



**Figura 22:** Avaliação do tratamento com sertralina na migração celular na linhagem SH-SY5Y diferenciada (método *scratch*). **a**) Gráfico representativo da capacidade migratória nos tempos 0, 24 e 48 horas. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata ( $n=5$ ). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo,  $***p<0,001$ ;  $****p<0,0001$ . **b**) Imagens dos “*scratches*” nos tempos 0 e 48 horas.

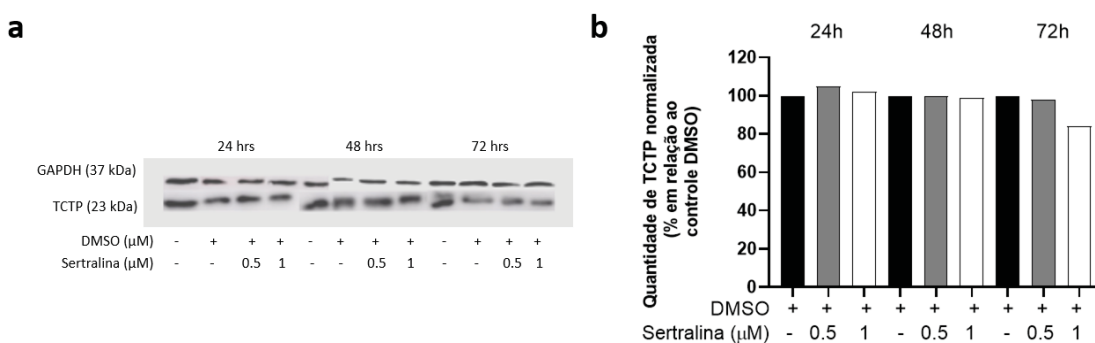
### 5.1.d. Expressão de TCTP

Os níveis proteicos intracelulares de TCTP foram avaliados após o tratamento com sertralina por imunodeteção (*western blot*). Na Figura 23, estão os resultados da linhagem CHLA-20. A densitometria de bandas mostra, em 72 horas, redução de 60% da expressão proteica de TCTP no tratamento com sertralina 1  $\mu\text{M}$  quando comparada ao controle tratado com DMSO, normalizadas por GAPDH.



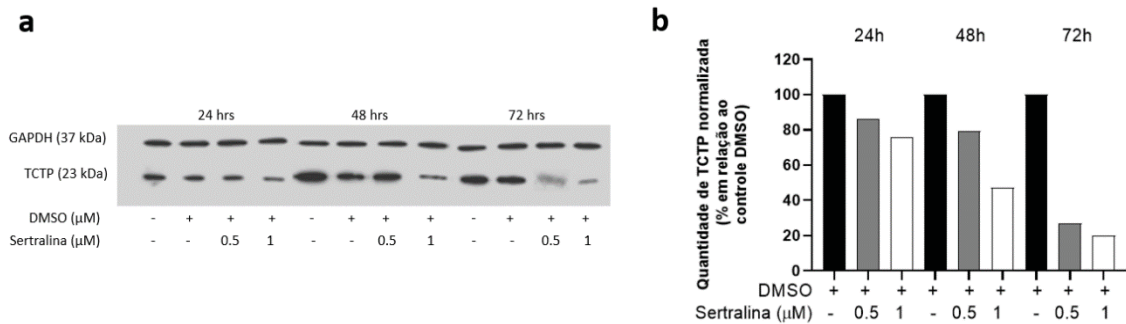
**Figura 23:** Avaliação dos níveis proteicos de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas. **a)** Ensaio de imunodeteção em extrato celular da linhagem CHLA-20 (50  $\mu\text{g}$  de proteína por amostra). **b)** Gráfico de um único experimento que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%), nos tempos 24, 48 e 72 horas.

Em relação a linhagem IMR-32 foi possível avaliar que o grupo que recebeu o tratamento com sertralina apresentou menor redução da TCTP quando comparado com as outras linhagens estudadas (figura 24). Mas ainda assim, em 72 horas observa-se que o grupo sertralina (1  $\mu\text{M}$ ) diminui 16% o nível da proteína TCTP quando comparada ao controle contendo DMSO.



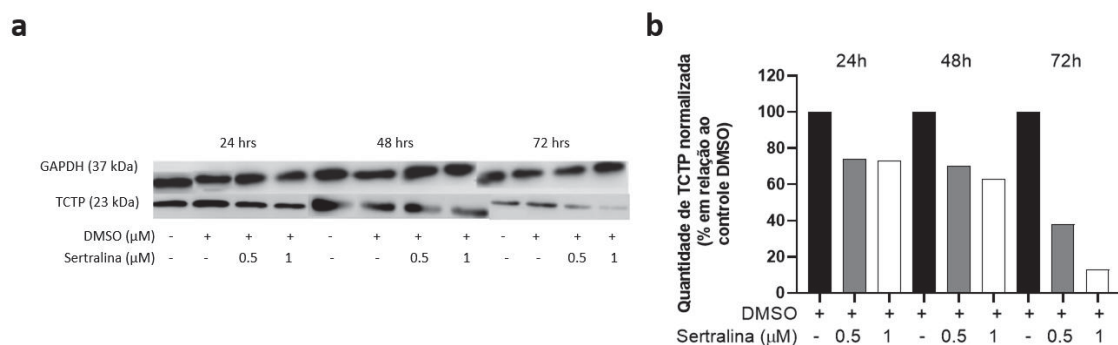
**Figura 24:** Avaliação dos níveis proteicos de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas. **a)** Ensaio de imunodeteção em extrato celular da linhagem IMR-32 (50  $\mu\text{g}$  de proteína por amostra). **b)** Gráfico de um único experimento que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%), nos tempos 24, 48 e 72 horas.

No ensaio de imunodeteccção feito com a linhagem SH-SY5Y observa-se reduccção na quantidade intracelular de TCTP após o tratamento com sertralina: em 72 horas é possível observar que os níveis de TCTP das células tratadas com 1  $\mu\text{M}$  foi significativamente reduzido (Figura 25).



**Figura 25:** Avaliação dos níveis de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas. **a)** Ensaio de imunodeteccção em extrato celular da linhagem SH-SY5Y indiferenciada (50  $\mu\text{g}$  de proteína por amostra). **b)** Gráfico de um único experimento que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%), nos tempos 24, 48 e 72 horas.

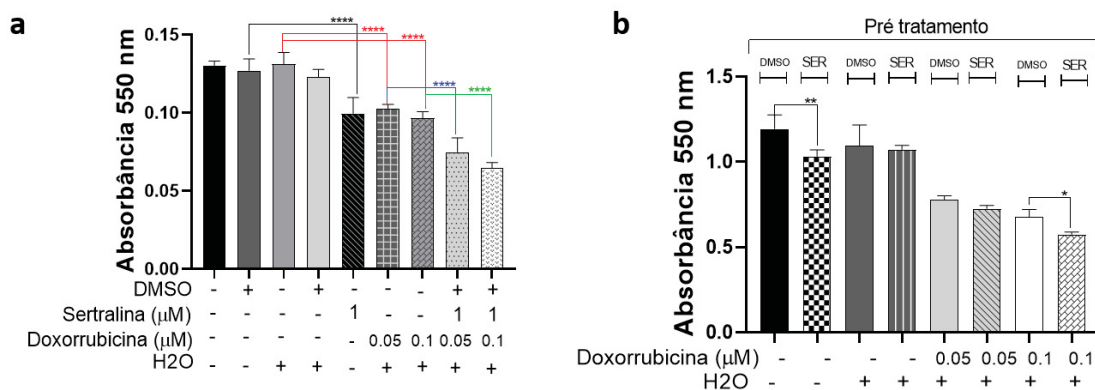
A linhagem SH-SY5Y diferenciada apresentou reduccção tempo e concentração dependente. Em 72 horas (Figura 26b) há reduccção pronunciada nos níveis proteicos de TCTP. Essa diminuicção é observada no grupo tratado com a concentraccção 0.5  $\mu\text{M}$ , e ainda mais evidente para o grupo 1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 26:** Avaliação dos níveis de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas. **a)** Ensaio de imunodeteccção em extrato celular da linhagem SH-SY5Y diferenciada (50  $\mu\text{g}$  de proteína por amostra). **b)** Gráfico de um único experimento que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%), nos tempos 24, 48 e 72 horas.

### 5.1.f. Quimiosensibilização

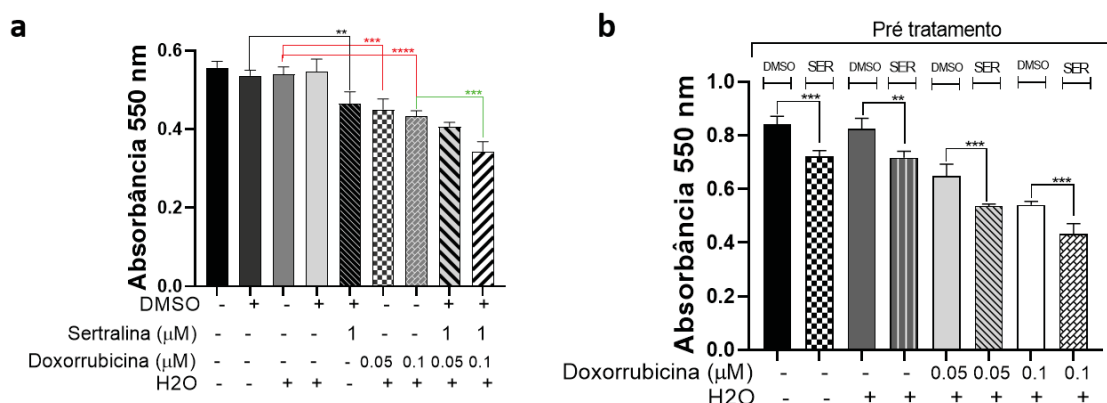
Para avaliar o potencial da sertralina como uma droga sensibilizadora aos quimioterápicos utilizamos duas metodologias: (i) tratamento concomitante (sertralina e quimioterápico adicionados conjuntamente as células) e (ii) pré-tratamento (células tratadas com sertralina e, posteriormente, tratadas com o quimioterápico) (Figura 2, Materiais e Métodos). A viabilidade celular foi mensurada por meio do método MTT ao final dos experimentos. Na Figura 27a observa-se o resultado de sensibilização com tratamento concomitante para a linhagem CHLA-20. Quando se compara o controle DMSO e o tratamento sertralina (1  $\mu\text{M}$ ), é possível notar que há redução de 34% na viabilidade celular do grupo tratado. Os grupos que foram tratados com sertralina e doxorrubicina (0,05  $\mu\text{M}$ ) de forma concomitante apresentaram uma diminuição de 26% de células viáveis quando comparados com o grupo tratado somente com o quimioterápico nesta concentração. O tratamento concomitante de sertralina e doxorrubicina (0.1  $\mu\text{M}$ ), quando comparado com células tratadas apenas com doxorrubicina, resultou em diminuição de 32% da viabilidade. Na Figura 27b encontra-se o resultado da sensibilização quando foi realizado tratamento prévio com sertralina 1  $\mu\text{M}$  por 24 horas e posterior plaqueamento com tratamento utilizando doxorrubicina. Nesse ensaio observa-se que o pré-tratamento com sertralina potencializou o efeito da doxorrubicina (0,1  $\mu\text{M}$ ) com redução de 15%, quando comparado com as células tratadas com o quimioterápico que foram pré-tratadas com DMSO.



**Figura 27:** Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico doxorrubicina na linhagem CHLA-20 (método MTT). **a)** Ensaio realizado com tratamento concomitante por 24 horas. **b)** Ensaio realizado com pré-tratamento com sertralina (24 horas) e posterior tratamento com doxorrubicina (24 horas). Três experimentos independentes realizados em quintuplicata

(n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*p<0,1; \*\*p<0,01; \*\*\*\* p<0,0001.

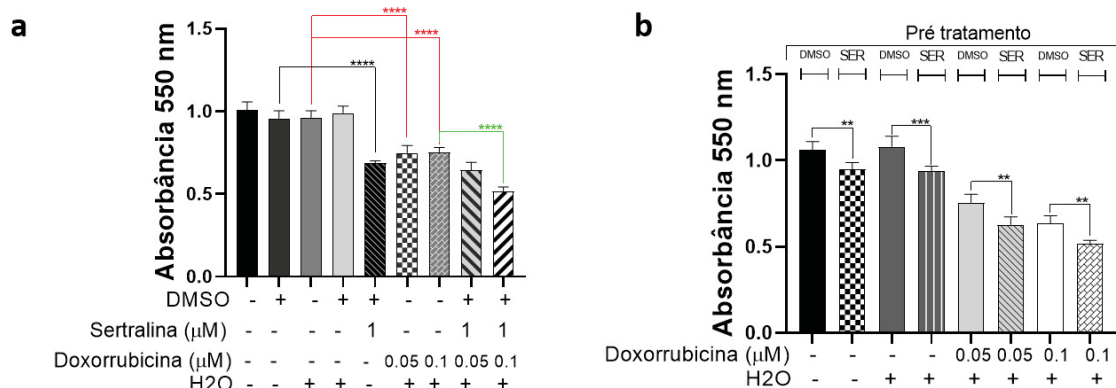
Os resultados de sensibilização com a linhagem IMR-32 estão apresentados na Figura 28. O tratamento concomitante pode ser observado na Figura 28a, em que há redução na viabilidade das células tratadas com sertralina de 13% quando comparadas ao grupo DMSO. Quando se avalia o grupo que foi tratado com a sertralina juntamente com o quimioterápico (0,1  $\mu$ M) observa-se redução de 20% nas células viáveis quando comparados com o tratamento somente com doxorrubicina. O pré-tratamento com sertralina sensibilizou as células para o efeito citotóxico da doxorrubicina, na Figura 28b observa-se uma diminuição de 17% e 20% na viabilidade celular após o tratamento com 0,05 e 0,1  $\mu$ M de doxorrubicina, quando comparados com as células que foram pré-tratadas com DMSO.



**Figura 28:** Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico doxorrubicina na linhagem IMR-32 (método MTT). **a)** Ensaio realizado com tratamento concomitante por 24 horas. **b)** Ensaio realizado com pré-tratamento com sertralina (24 horas) e posterior tratamento com doxorrubicina (24 horas). Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001.

Na Figura 29a estão os resultados para a sensibilidade com tratamento concomitante da linhagem SH-SY5Y. O grupo tratado somente com sertralina demonstrou redução de 26% de células viáveis em comparação com o controle DMSO. O grupo tratado com sertralina e doxorrubicina 0,1  $\mu$ M diminuiu 30% a viabilidade quando comparada com as células tratadas somente com a doxorrubicina. Na Figura 29b observa-se o resultado de viabilidade quando células foram previamente tratadas com sertralina. Nota-se que todos os grupos

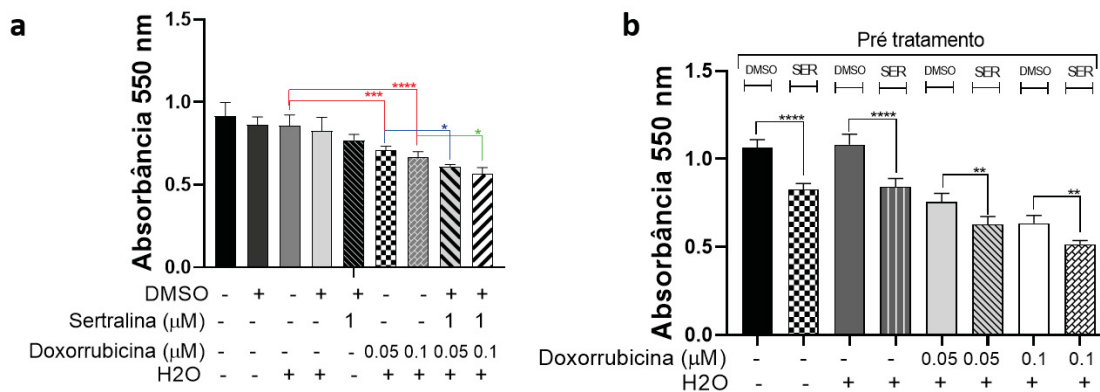
mostraram diferença significativa em relação aos grupos previamente tratados com DMSO. Em relação aos grupos tratados previamente com sertralina e em seguida com o quimioterápico (0,05 e 0,1  $\mu\text{M}$ ) observa-se redução de 16% e 19% quando comparados aos seus respectivos controles (DMSO).



**Figura 29:** Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico doxorubicina na linhagem SH-SY5Y indiferenciada (método MTT). **a)** Ensaio realizado com tratamento concomitante por 24 horas. **b)** Ensaio realizado com pré-tratamento com sertralina (24 horas) e posterior tratamento com doxorubicina (24 horas). Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*p<0,01; \*\*\*p <0,001; \*\*\*\* p<0,0001.

A linhagem SH-SY5Y diferenciada apresentou sensibilização com diminuição na viabilidade celular quando tratada com a sertralina associada a doxorubicina. Para a concentração de 0,05  $\mu\text{M}$  houve redução de 20% quando comparada ao grupo tratado somente com a doxorubicina. Já a sertralina utilizada com doxorubicina 0.1  $\mu\text{M}$  apresentou diminuição de 20% no número de células viáveis (Figura 30a). Na Figura 30b exibe-se o resultado obtido com tratamento prévio com sertralina e posterior incubação com doxorubicina. A sertralina sensibilizou as células e há diminuição na quantidade de células viáveis quando comparados com seus controles (DMSO). Os grupos que após o tratamento com a sertralina foram tratados com o quimioterápico mostraram uma diminuição de 16% para a concentração de 0,05  $\mu\text{M}$  e de 18% para 0,1  $\mu\text{M}$ .



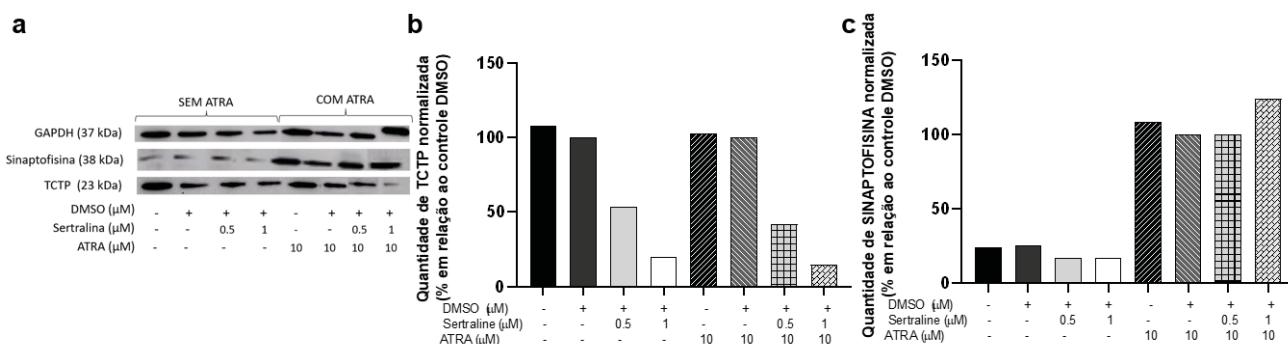


**Figura 30:** Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico doxorubicina na linhagem SH-SY5Y indiferenciada (método MTT). **a)** Ensaio realizado com tratamento concomitante por 24 horas. **b)** Ensaio realizado com pré-tratamento com sertralina (24 horas) e posterior tratamento com doxorubicina (24 horas). Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*p<0,1; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001.

### 5.1.g. Diferenciação da linhagem SH-SY5Y

A diferenciação das células de neuroblastoma é um processo bastante estudado e utilizado como estratégia terapêutica (Westerlund et al., 2017; Illendula, A.; Fultang, N.; Peethambaran, B. 2020). O ATRA é o composto utilizado para desencadear o processo de diferenciação, e o tratamento *in vitro* para induzir o processo consiste em 10 dias na presença de 10 μM do reagente. Nas Figuras 31, 32 e 33 são apresentados os resultados dos ensaios de diferenciação celular da linhagem SH-SY5Y com a utilização de sertralina. Após 10 dias de tratamento, as amostras foram coletadas e avaliamos os níveis proteicos de sinaptofisina, marcador clássico da diferenciação neuroendócrina pelo ensaio de imunodeteção (*western blot*) (Figura 31a). O tratamento com ácido trans-retinóico (ATRA) resulta em aumento da sinaptofisina. As amostras que foram tratadas com sertralina e o controle (DMSO) não apresentam alterações nos níveis proteicos de sinaptofisina. Em relação a proteína TCTP, nota-se que há redução no conteúdo de TCTP para as células tratadas com sertralina, independente do tratamento com ATRA. O tratamento com ATRA não afetou os níveis de TCTP. Na Figura 31b, apresentamos o gráfico com a quantidade de TCTP normalizada, pela quantificação de GAPDH, para os diferentes grupos de tratamento. Considerando o grupo DMSO como 100%, pudemos notar uma redução da proteína TCTP de 20% e 80% para as concentrações de 0,5 e 1 μM com tratamento com sertralina. A amostra tratada

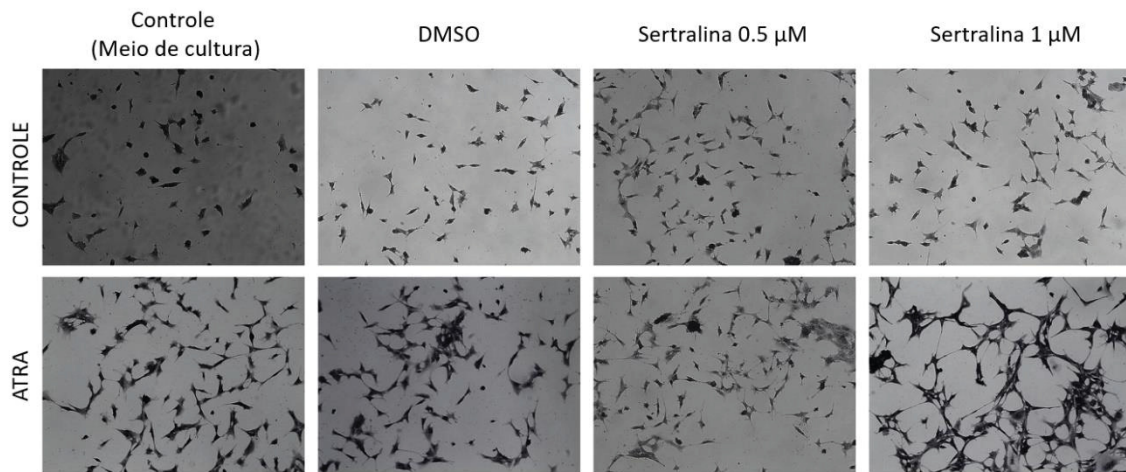
com ATRA e sertralina 1  $\mu\text{M}$  apresenta uma redução de TCTP de 86%. A sertralina isolada não foi capaz de aumentar a expressão de sinaptofisina, mas observa-se um aumento na quantidade de proteína quando o ATRA foi utilizado em combinação com 1  $\mu\text{M}$  de sertralina.



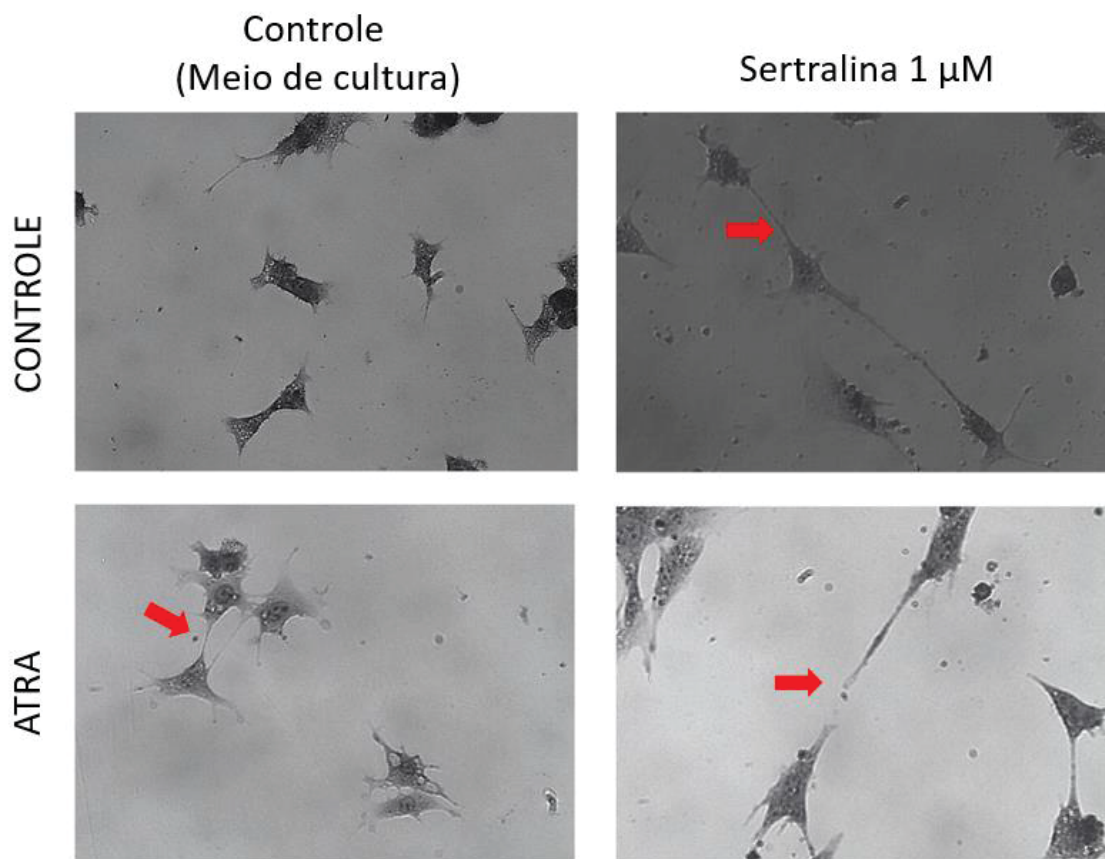
**Figura 31:** Tratamento com o ácido trans-retinóico (ATRA) e expressão de sinaptofisina na linhagem SH-SY5Y. Avaliação das proteínas sinaptofisina, TCTP e GAPDH (controle), após 10 dias de tratamento com ATRA na presença ou ausência de sertralina. **a)** Ensaio de imunodeteccção em extrato celular (50  $\mu\text{g}$  de proteína total por amostra). **b)** Gráfico que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%). **c)** Gráfico que representa as quantidades de sinaptofisina, mensuradas por densitometria e normalizadas pelos níveis de GAPDH, em relação ao controle DMSO (considerado 100%).

Nas Figuras 32 e 33 estão as imagens feitas para análise da morfologia celular das células SH-SY5Y durante o experimento de indução de diferenciação celular por meio do tratamento com ácido trans-retinóico e sertralina. As células SH-SY5Y apresentam morfologia característica de tecido epitelial: células pavimentosas, com contorno mais oval e alongado (Figura 32, controle e DMSO). As células tratadas com ATRA por 10 dias exibem uma morfologia diferente: apresentam-se de forma mais alongada, exibindo extensiva quantidade de neuritos alongados (projeções da membrana) (Figura 33; flechas). Após 10 dias de tratamento com sertralina, no grupo sem tratamento com ácido trans-retinóico (ATRA), percebe-se que as células do grupo controle, DMSO e sertralina 0,5  $\mu\text{M}$  mantêm as características de célula epitelial (indiferenciada), com pouquíssimas projeções. Contudo, nas células do grupo sertralina 1  $\mu\text{M}$  é possível observar a formação de projeções de membrana (neuritos) (Figura 33, flechas), características de célula neuronal diferenciada, mesmo sem adição de ATRA.





**Figura 32:** Linhagem SH-SY5Y após 10 dias de tratamento com ácido transretinóico (ATRA) e/ou sertralina 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ . Imagens feitas em microscópio invertido.



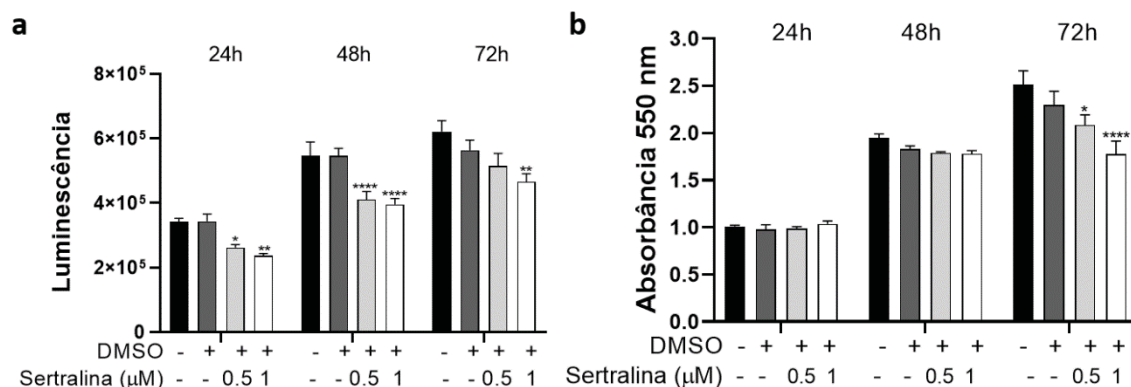
**Figura 33:** Imagens da linhagem SH-SY5Y 10 dias após o tratamento com ATRA e sertralina. Figuras do controle (somente meio) e sertralina 1  $\mu\text{M}$ , com ou sem ATRA, feitas em microscópio invertido (400x de aumento final). As setas em vermelho indicam os neuritos formados durante o processo de diferenciação.

## 5.2. Glioblastoma

O objetivo desse trabalho também foi avaliar o efeito da sertralina em tumores de glioblastoma. Para isso, foi utilizada a linhagem GL261. Essa linhagem é proveniente de camundongo e apresenta características de invasão e infiltração. A GL261 possui mutações em p53, k-ras e egfr (Furnari et al., 2007; Van Meir et al., 2010).

### 5.2.a Ensaios *in vitro*

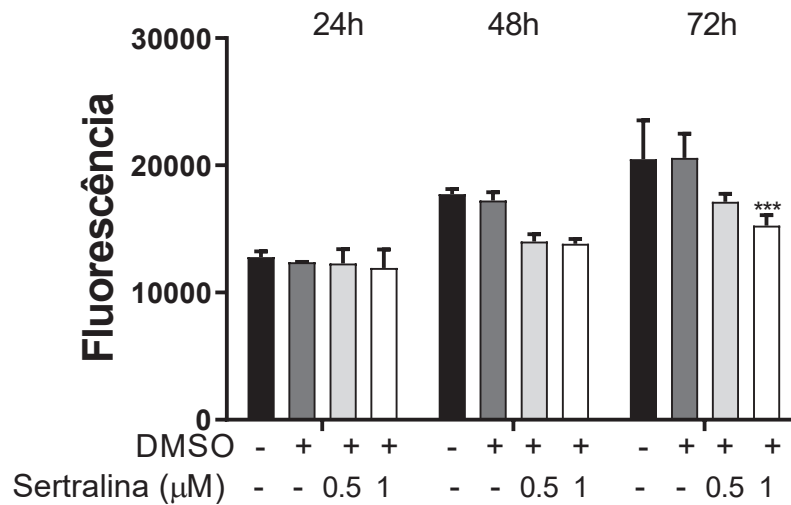
A viabilidade celular após o tratamento com sertralina foi avaliada pelo ensaio de quantificação de ATP por luminescência (*Celltiter glo* kit) e por MTT. As células GL261 foram tratadas com sertralina (0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ) e a viabilidade mensurada após 24, 48 e 72 horas. Na Figura 34a observa-se uma diminuição na luminescência das células tratadas com 0.5 e 1  $\mu\text{M}$  de sertralina, no tempo de 48 horas. Em 72 horas, esta redução é mais pronunciada, sendo significativa nas células tratadas com 1  $\mu\text{M}$ . Na figura 34b está o resultado obtido pelo método de MTT. Neste ensaio, há redução na viabilidade para as células tratadas com sertralina apenas após 72 horas, com uma diminuição de 10% para 0,5  $\mu\text{M}$  e 22% para 1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 34:** Avaliação da viabilidade celular na linhagem GL261 após tratamento com sertralina nos tempos de 24, 48 e 72 horas. **a)** Ensaio de quantificação de ATP (*Celltiter-glo*). **b)** Ensaio de MTT. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*p<0,1, \*\* p<0,01, \*\*\*\*p <0,0001.

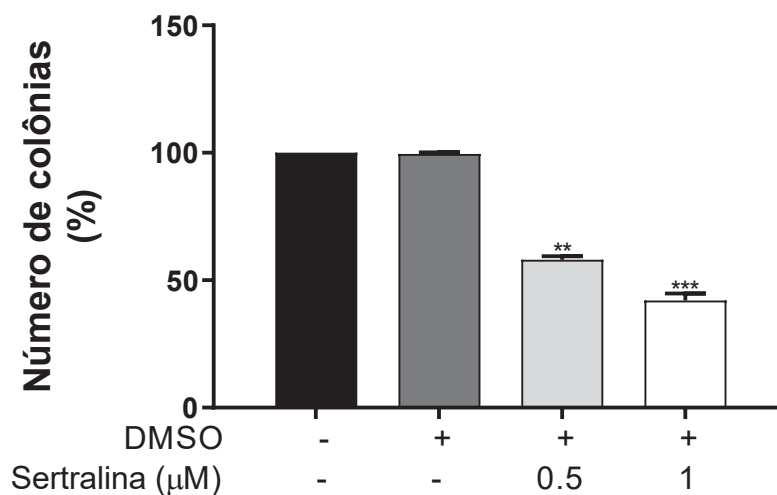
No ensaio de proliferação celular da linhagem GL261 em presença de sertralina (Figura 35) há uma maior diminuição na proliferação no tempo de 72 horas. Foi possível observar que houve uma redução de 26% da proliferação na

maior concentração testada (1  $\mu\text{M}$ ) em 72 horas (quando comparada ao controle DMSO).



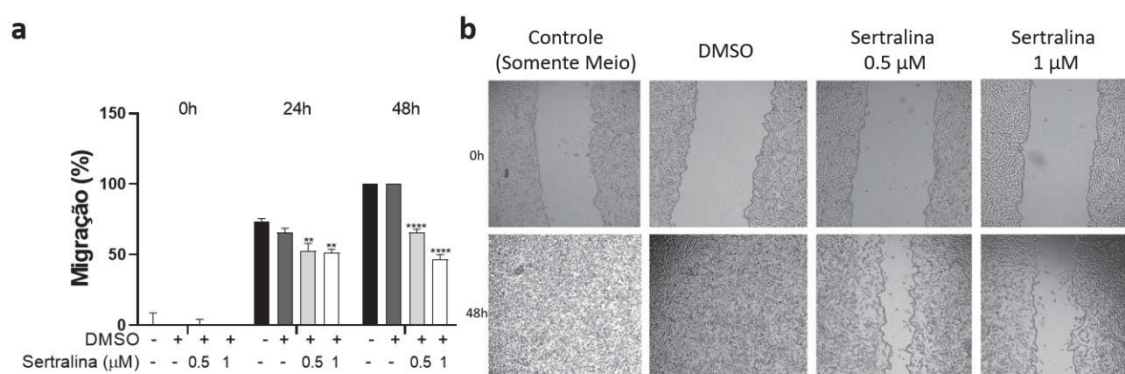
**Figura 35:** Avaliação da proliferação celular na linhagem GL261 após tratamento com sertralina nos tempos de 24, 48 e 72 horas (método CyQuant- excitação 480 nm e emissão 520 nm). Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*\*p<0,001.

A clonogenicidade da GL261 foi avaliada na presença de sertralina (Figura 36). Observa-se que as concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$  de sertralina foram capazes de inibir a formação de colônias em 43% e 58%, respectivamente.



**Figura 36:** Ensaio de clonogenicidade em ágar mole com a linhagem GL261 (6000 células incubadas em meio semi-sólido por 21 dias em presença de sertralina). Três experimentos independentes realizados em duplicata (n=2). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

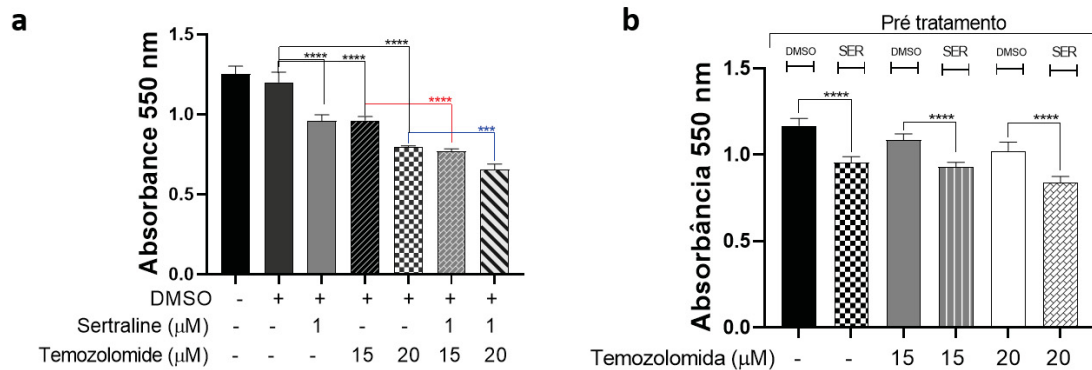
A migração celular foi avaliada pelo ensaio de “*scratch*”. Os resultados estão apresentados na Figura 37. Neste ensaio, os *scratches* (riscos, área livre de células) dos grupos controle e controle DMSO foram fechados em 48 horas, enquanto as células tratadas com sertralina não foram capazes de preencher a área livre de células neste período, sugerindo efeito inibitório na capacidade migratória. As células tratadas com sertralina tiveram uma diminuição de 34% e 60,9% na migração celular nas concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



**Figura 37:** Avaliação da migração celular na linhagem GL261 na presença de sertralina (método *scratch*). **a)** Gráfico representativo da capacidade migratória nos tempos 0, 24 e 48 horas. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata (n=5). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001. **b)** Imagens dos “scratches” nos tempos 0 e 48 horas.

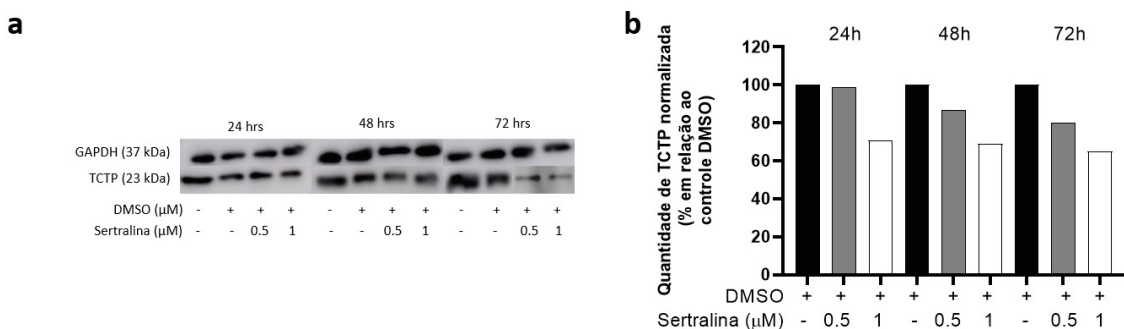
Para avaliar o efeito do tratamento com sertralina em conjunto com o quimioterápico temozolomida de uso clínico no tratamento de pacientes com glioblastoma, realizamos ensaios de viabilidade celular onde utilizamos as duas drogas concomitantemente ou pré-tratamos as células com sertralina e então as submetemos ao tratamento com temozolomida (TMZ). Os resultados para este ensaio de sensibilização são apresentados na Figura 38. No ensaio pelo método concomitante, as células tratadas com sertralina e TMZ (15 e 20  $\mu\text{M}$ ) apresentaram diminuição de 20% e 21%, quando comparadas com as células tratadas somente com o quimioterápico, 15 e 20  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O grupo que recebeu apenas sertralina apresentou 20% de redução no número de células viáveis quando comparadas ao controle DMSO, e a mesma redução foi observada com somente o tratamento com TMZ 15  $\mu\text{M}$ . Na Figura 38b, as células foram previamente tratadas com sertralina (1  $\mu\text{M}$ ) por 24h, e após replaqueamento foi adicionado a temozolomida. O pré-tratamento com

sertralina, e posterior com 15  $\mu\text{M}$  de quimioterápico, mostrou perda de 15% de células viáveis e o tratado com 20  $\mu\text{M}$ , 17%, quando comparados com os grupos controles pré-tratados com DMSO.



**Figura 38:** Avaliação do tratamento com sertralina combinada ao quimioterápico temozolomida na linhagem GL261 (método MTT). **a)** Ensaio realizado pelo tratamento concomitante. **b)** Ensaio realizado pelo pré-tratamento. Três experimentos independentes realizados em quintuplicata ( $n=5$ ). Os dados apresentados referem-se a um experimento representativo, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

A avaliação dos efeitos da sertralina sobre os níveis de TCTP na linhagem GL261 foram realizados por imunodeteção (*western blot*) (Figura 39). Avalia-se que a sertralina reduziu os níveis proteicos de TCTP de forma concentração e tempo dependente. A diminuição dos níveis é bastante evidente após 72 h, sendo o sinal bastante diminuído para ambos os tratamentos (0,5 e 1  $\mu\text{M}$ ).



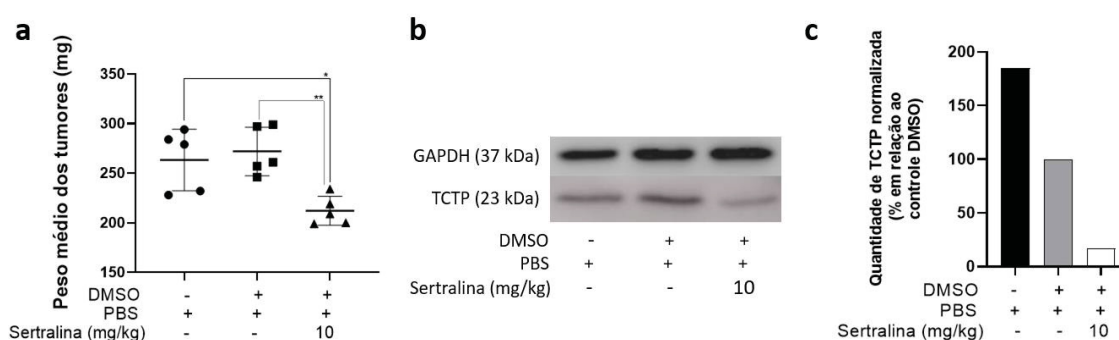
**Figura 39:** Avaliação dos níveis de GAPDH (controle endógeno) e TCTP nos tempos de 24, 48 e 72 horas. **a)** Ensaio de imunodeteção em extrato celular da linhagem GL261 (50  $\mu\text{g}$  de proteína por amostra). **b)** Gráfico de um único experimento que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria (imageJ) e normalizadas pelos níveis de GAPDH de cada amostra (controle DMSO foi considerado 100%) nos tempos 24, 48 e 72 horas.



## 5,2.b Ensaios *in vivo*

Após a avaliação dos efeitos da sertralina *in vitro* sobre a linhagem GL261, utilizamos o modelo de glioblastoma murino, com as células GL261 inoculadas em camundongos C57BL-6 para avaliar os efeitos do tratamento com sertralina *in vivo*. A sertralina foi avaliada em duas variações de crescimento tumoral utilizando este modelo animal: na primeira as células GL261 são inoculadas subcutaneamente no dorso dos animais e; na segunda, a inoculação é intracerebroventricular (material e métodos). Nos dois casos o tratamento com sertralina (10 mg/kg) foi realizado de forma intraperitoneal.

Os animais submetidos a inoculação subcutânea foram eutanasiados após 30 dias de tratamento (PBS, DMSO ou sertralina). O tumor foi coletado, pesado e separado para análise de *western blot*. Em relação ao tamanho do tumor (figura 40a) é possível avaliar que o grupo tratado com sertralina apresentou menor massa tumoral em relação aos grupos PBS e DMSO. O tratamento com sertralina inibiu o crescimento tumoral em 50% e esta inibição foi acompanhada pela diminuição dos níveis de TCTP no tecido tumoral coletado dos animais. Nas Figuras 40b e 40c estão os resultados obtidos pela análise de *western blot*, onde observa-se que os animais tratados com sertralina apresentam redução significativa nos níveis da proteína TCTP quando comparados com o controle DMSO (100%).



**Figura 40:** Efeito da sertralina *in vivo* em modelo murino por via subcutânea. **a)** Peso dos tumores obtidos (mg) comparando-se o grupo tratado (sertralina) com os controles PBS e DMSO. **b)** Análise de *western blot* da proteína TCTP e GAPDH feita a partir dos extratos tumorais. **c)** Gráfico que representa as quantidades de TCTP, mensuradas por densitometria (*ImageJ*) e normalizadas pelos níveis de GAPDH de cada amostra, o controle DMSO foi considerado 100%. Dois experimentos independentes foram realizados (n=5) (\*p<0,1 e \*\*p<0,01).

No modelo em que o tumor foi inoculado intracerebroventricularmente, os animais foram tratados e foram realizadas as avaliações clínica e de peso, ensaio de campo aberto, rotarod e memória. Ao final de 30 dias os animais foram eutanasiados e o cérebro coletado para análises histológicas e de expressão gênica.

O controle de peso dos animais está mostrado na Tabela 3. Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação ao peso desses animais, ao longo do experimento.

**Tabela 3:** Dados clínicos dos animais submetidos ao modelo experimental de glioblastoma. O peso está expresso em média e desvio padrão (DP), e os dados foram analisados pelo teste *t de student* considerando o valor de  $p < 0,1$  (\*) como estatisticamente diferente na comparação dos tempos de coleta (20 e 30 dias em relação aos valores basais).

	<b>Peso (g) (Média±DP/dia em g)</b>		
	<b>10 dias</b>	<b>20 dias</b>	<b>30 dias</b>
<b>Grupo SHAM PBS</b> (11 animais)	23,2 (± 1,1)	23,5 (± 0,7)	23,8 (± 1,2)
<b>Grupo SHAM DMSO</b> (11 animais)	23 (0)	23 (± 0,8)	23,2 (± 0,8)
<b>Grupo SHAM SER</b> (11 animais)	22 (0)	22 (1)	22 (± 1,5)
<b>Grupo GBM PBS</b> (8 animais)	23,3 (± 1,3)	23,4 (± 1,2)	23,6 (± 1,1)
<b>Grupo GBM DMSO</b> (9 animais)	21,2 (± 1,3)	22,1 (± 0,8)	22,1 (± 1,2)
<b>Grupo GBM SER</b> (10 animais)	20,7 (± 1,6)	22,4 (± 1,1)	22,4 (± 1,3)

A análise clínica dos animais está apresentada na Tabela 4 e foi realizada aos 10, 20 e 30 dias do experimento. O escore clínico dos animais do grupo SHAM não apresentou nenhuma alteração, conforme esperado. Os animais GBM, em especial os que receberam tratamento controle, PBS ou DMSO, apresentaram um escore médio de 0,6 e 0,5 na última semana, respectivamente. Esses valores devem-se a perda parcial de força no tónus, desequilíbrio das

pernas traseiras e, por fim, perda total do tônus caudal. Os animais GBM tratados com sertralina também apresentaram desequilíbrio nas pernas traseiras ao final dos 30 dias, contudo encontravam-se em melhor estado clínico, apresentando uma média de escore clínico de 0,1.

**Tabela 4:** Dados clínicos dos animais submetidos ao modelo experimental de glioblastoma. O escore clínico está expresso em média e desvio padrão (DP), e os dados foram analisados pelo teste *t de student* considerando o valor de  $p < 0,1$  (\*) como estatisticamente diferente na comparação dos tempos de coleta (20 e 30 dias em relação aos valores basais).

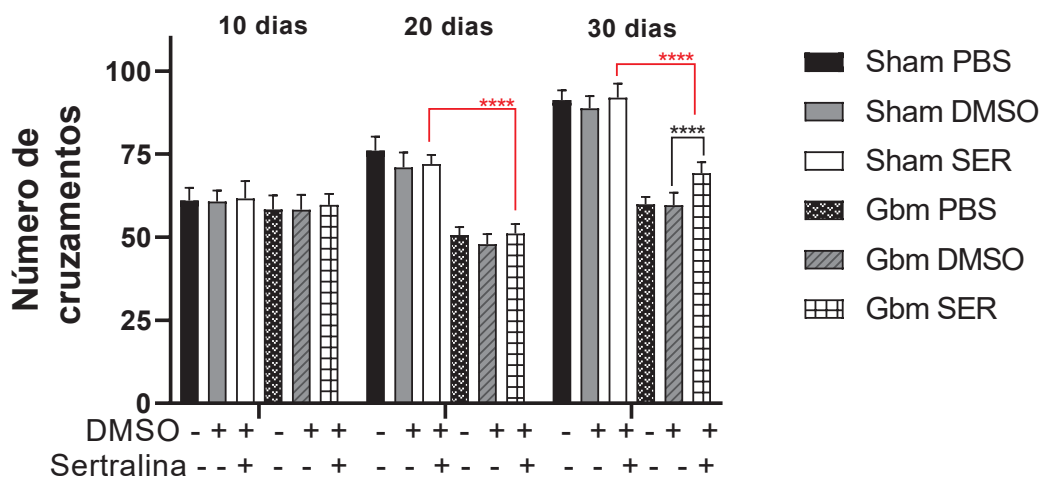
	<b>Escore clínico (Média/dia)</b>		
	<b>10 dias</b>	<b>20 dias</b>	<b>30 dias</b>
<b>Grupo SHAM PBS</b> (11 animais)	0	0	0
<b>Grupo SHAM DMSO</b> (11 animais)	0	0	0
<b>Grupo SHAM SER</b> (11 animais)	0	0	0
<b>Grupo GBM PBS</b> (8 animais)	0	0,4 ( $\pm$ 0,21)	0,6 ( $\pm$ 0,21)
<b>Grupo GBM DMSO</b> (9 animais)	0,04 ( $\pm$ 0,05)	0,3 ( $\pm$ 0,25)	0,5 ( $\pm$ 0,23)
<b>Grupo GBM SER</b> (10 animais)	0	0	0,15 * ( $\pm$ 0,24)

Na avaliação do teste de campo aberto foi observado que há uma diminuição no número de cruzamentos dos animais do grupo GBM em 20 e 30 dias, quando comparados aos animais do grupo SHAM (Figura 41). Esse resultado está relacionado com o comprometimento locomotor provavelmente devido ao desenvolvimento tumoral no cérebro destes animais. Na comparação entre os animais do grupo GBM tratados com sertralina e seus controles observamos aumento significativo no número de cruzamentos nos animais em 30 dias (14% maior que para os animais GBM tratados com DMSO).

Na avaliação de 30 dias observa-se que os animais do grupo SHAM (PBS, DMSO e Sertralina) apresentaram um número maior de cruzamentos que nos

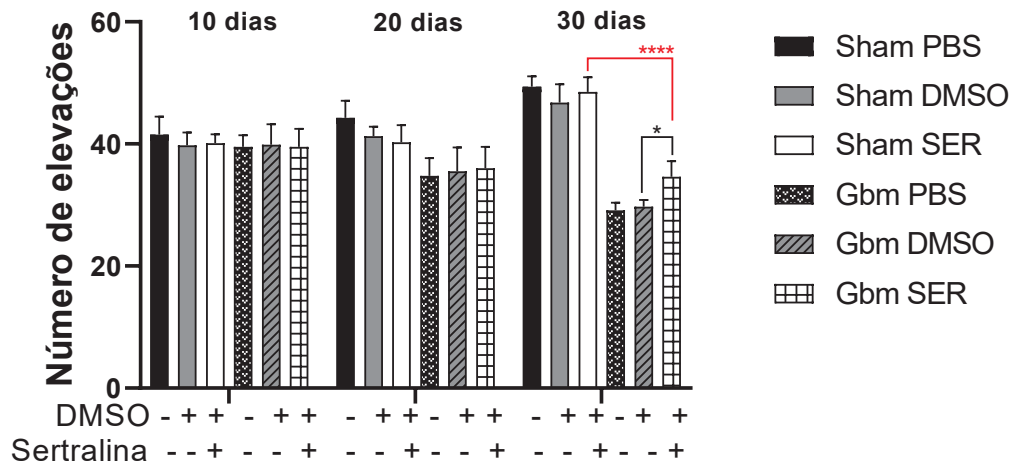


tempos anteriores. Este aumento está relacionado a uma alteração na metodologia de avaliação. Neste último teste, os animais foram colocados em uma caixa escura com sensores ao invés da caixa usada para campo aberto. Essa alteração visa estimular os animais a um novo ambiente, escuro, já que o campo aberto deixa de ser interessante no decorrer das repetições da avaliação.



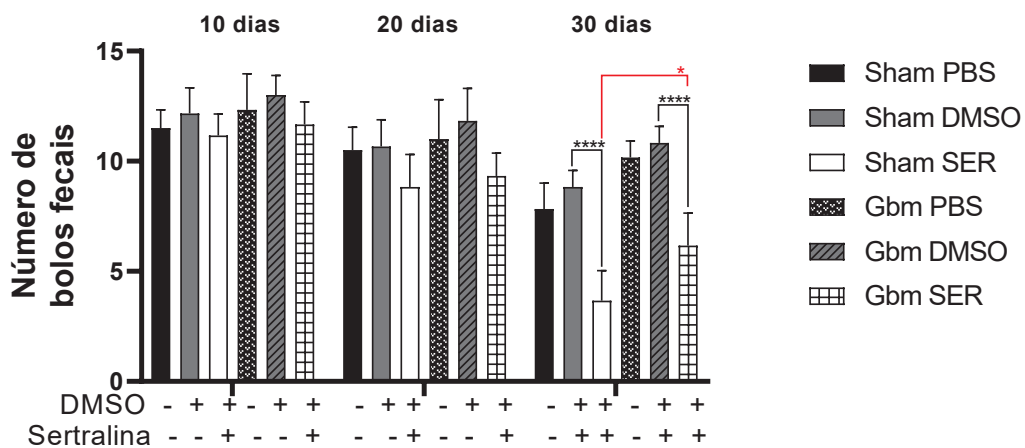
**Figura 41:** Análise de cruzamentos em teste de campo aberto após 10, 20 e 30 dias. Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma e tratamento com sertralina. Análise de cruzamentos durante 5 minutos em teste de campo aberto. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

O número de elevações também foi avaliado e os resultados são bastante similares aos obtidos para a análise de cruzamentos. Nota-se que os animais do grupo GBM apresentam redução no número de elevações, relacionada ao desenvolvimento tumoral e, conseqüente, diminuição da capacidade locomotora. Além disso, nos vídeos (dados não mostrados), é possível perceber que estes animais permanecem grande parte do tempo sem movimentação e sem interesse de exploração. Aos 30 dias, os animais do grupo GBM tratados com sertralina apresentaram maior movimentação e interesse em elevar-se para conhecer o ambiente (14% maior) do que nos animais controles do grupo GBM (Figura 42).



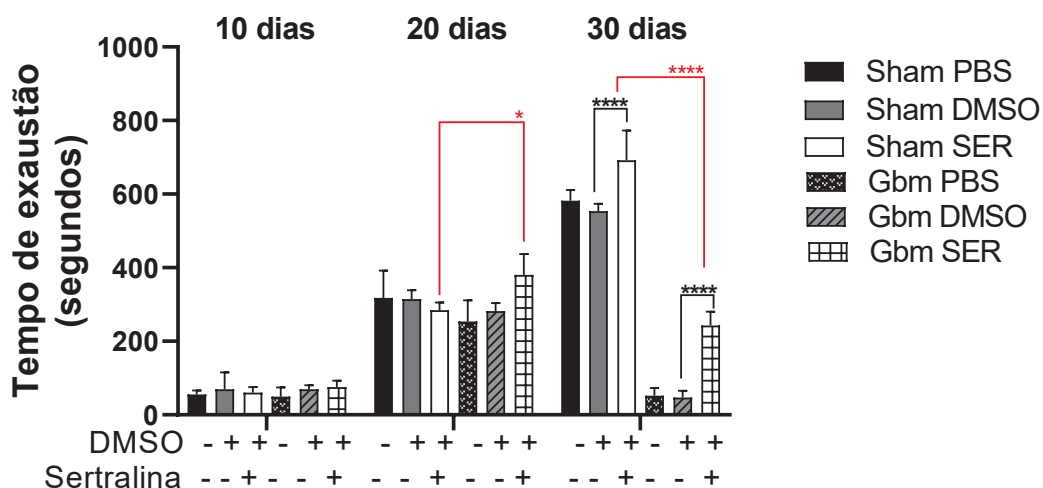
**Figura 42:** Análise de elevações em teste de campo aberto após 10, 20 e 30 dias. Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma. Análise de elevação durante 5 minutos em teste de campo aberto. \* $p < 0,1$ .

Para avaliar o nível de ansiedade dos animais, foi contabilizado o número de bolos fecais produzidos por cada animal durante os 5 minutos que eles ficavam dentro da caixa de campo aberto. Na Figura 43 observa-se que em 30 dias, os animais tratados com sertralina, de ambos os grupos SHAM e GBM, apresentaram redução na produção de bolos fecais, 58% e 43%, respectivamente. Este resultado foi também relacionado ao efeito ansiolítico da sertralina.



**Figura 43:** Análise de produção de bolo fecal em teste de campo aberto após 10, 20 e 30 dias. Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma. Análise do número de bolos fecais produzidos pelos animais durante 5 minutos em teste de campo aberto. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

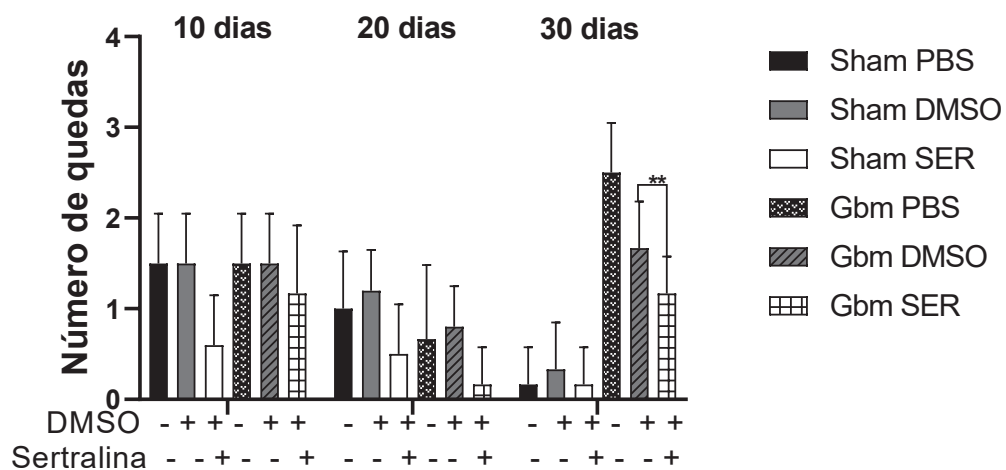
No ensaio de RotaRod os animais foram avaliados quanto a sua capacidade de locomoção motora e de equilíbrio. Nos animais do grupo SHAM pode-se observar que o tempo de exaustão aumenta conforme o tempo de experimentação (Figura 44). Este resultado é esperado uma vez que é uma tendência natural que animais saudáveis se acostumem com o ensaio e com o equipamento no decorrer do experimento. Porém, nos animais do grupo GBM, observamos uma diminuição drástica na capacidade desses animais de manter-se no equipamento aos 30 dias. Os animais do grupo GBM tratados com sertralina apresentaram melhor performance no ensaio quando comparado com os controles do grupo GBM. A sertralina melhorou significativamente a locomoção, capacidade motora e de equilíbrio dos animais portadores de tumor. Os animais tratados conseguiram se manter por até 300 segundos sem cair no tempo de 30 dias, performance significativamente melhor (80%) que os animais controles do grupo GBM (DMSO).



**Figura 44:** Análise de locomoção, capacidade motora e equilíbrio (RotaRod) após 10, 20 e 30 dias. Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma. Teste de RotaRod, com análise do tempo de exaustão. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

No ensaio de Rotarod também foi contabilizado o número de quedas: quantas vezes cada animal caiu do equipamento no tempo de 4 minutos (Figura 45). Em 10 dias, houve um maior número de quedas do que em 20 dias, em todos os grupos de animais avaliados. Possivelmente pelo fato de que o equipamento era algo novo para os animais em um primeiro momento. No tempo de 30 dias, é possível notar que os animais do grupo SHAM reduzem o número

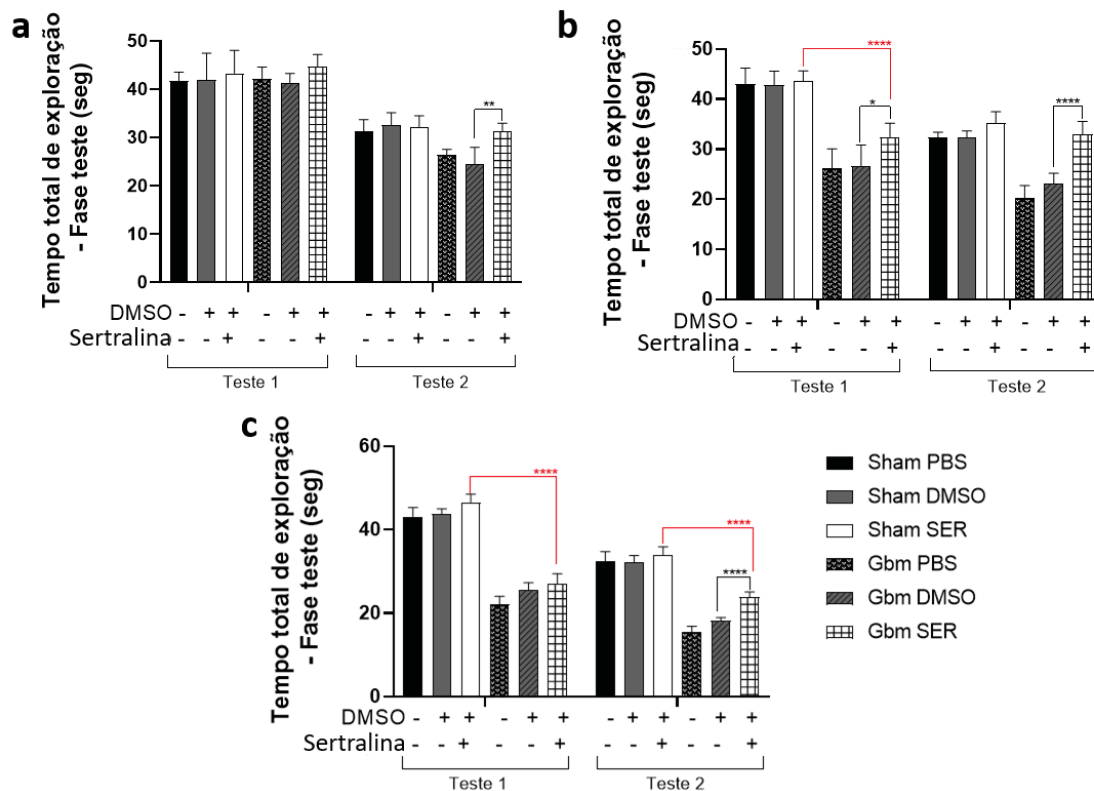
de quedas (comparado com o tempo de 20 dias); enquanto os animais controle do grupo GBM, PBS e DMSO, possuem um maior número de quedas. Os animais do grupo GBM tratado com sertralina apresenta algumas quedas, porém um número significativamente menor quando comparado aos grupos controle (GBM PBS e GBM DMSO). Os animais tratados com sertralina apresentaram um número menor de quedas que seus respectivos controles, mesmo em tempos de 10 e 20 dias, este resultado pode estar associado ao efeito ansiolítico da droga.



**Figura 45:** Análise de equilíbrio e capacidade motora (RotaRod) após 10, 20 e 30 dias. Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma. Teste de RotaRod, com análise do número de quedas. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

A avaliação da memória nos animais foi realizada pela capacidade de reconhecimento de novo objeto, a qual se baseia na tendência natural do animal em explorar por maior tempo um objeto novo, em detrimento de um objeto já familiar. Inicialmente, no teste 1 avaliou-se o tempo total que os animais gastaram explorando os dois objetos (A e B). Esta exposição ocorreu 90 minutos após a uma exposição inicial aos objetos A e A. E após 24 horas da primeira exposição (A e A), no teste 2, foi avaliado o tempo que os animais passaram explorando o mesmo objeto A e um novo objeto (C). Na Figura 46, podemos observar que há um maior interesse de exploração no teste 1 quando comparado com teste 2, para ambos os animais dos grupos SHAM e GBM. Os animais controle do grupo GBM (PBS e DMSO) apresentam uma diminuição na disposição de explorar no decorrer dos trinta dias, porém, os animais do grupo GBM tratados com sertralina mantiveram o interesse de exploração em todos os

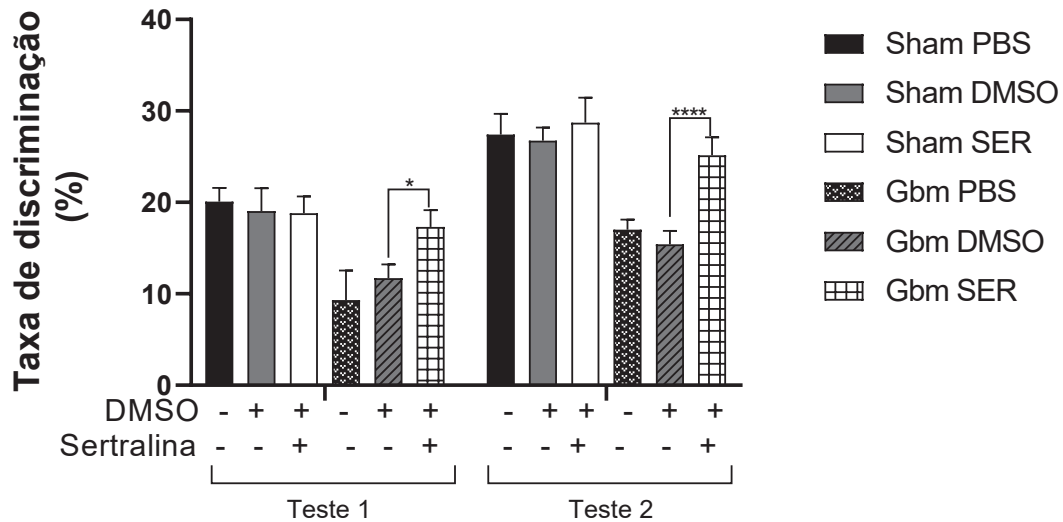
tempos avaliados. Estes animais, nos tempos de 10 e 20 dias, apresentaram valores muito próximos dos valores observados para os animais do grupo SHAM, que são cerca de 21% e 30% maiores que os valores dos controles dos animais (DMSO) do grupo GBM. Em 30 dias, o valor não chega aos valores dos animais do grupo SHAM, mas é cerca de 23% superior ao controle (DMSO) do grupo GBM.



**Figura 46:** Análise da memória após 10, 20 e 30 dias (tempo de exploração). Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma. Teste de memória, com análise do tempo total gasto pelos animais explorando os dois objetos, no teste 1 (objetos A+B, 90 minutos após objetos A+A) e no teste 2 (objetos A+C, 24 horas após objetos A+A). **a)** Análise de 10 dias. **b)** Análise de 20 dias. **c)** Análise de 30 dias. \* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

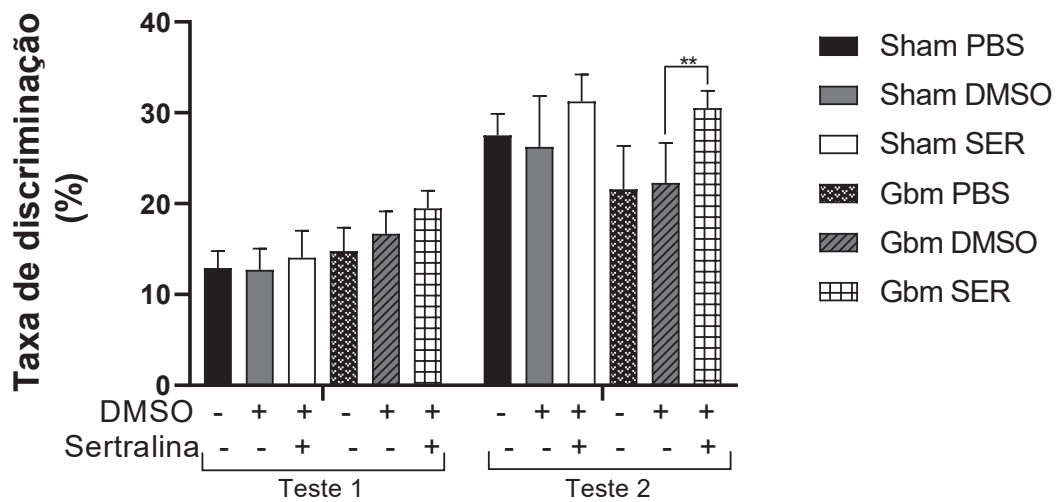
Ainda com o intuito de avaliar a memória, analisamos o gasto de tempo explorando especificamente o novo objeto em relação ao tempo total de exploração. Na Figura 47, observamos que os animais do grupo SHAM apresentam maior tempo de exploração nos novos objetos do que os animais do controle GBM, no tempo de 10 dias. Os animais controle do grupo GBM (PBS e DMSO) apresentam diminuição no interesse pelo objeto novo em ambos os tempos, contudo, os animais do grupo GBM tratados com sertralina essa

diminuição foi significativamente menor (32% a mais no teste 1 e 38% no teste 2 em comparação com DMSO).



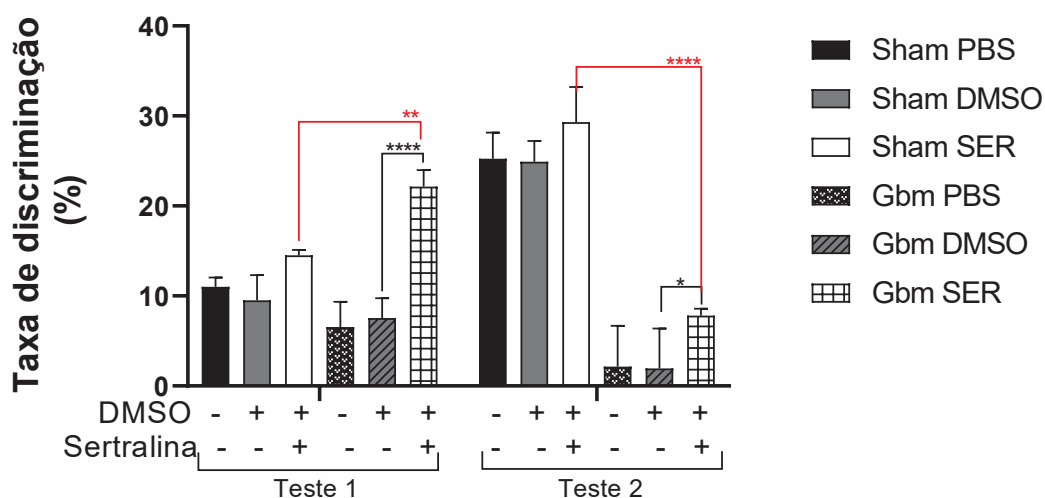
**Figura 47:** Análise da memória após 10 dias (taxa de discriminação). Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma. Teste de memória, com análise do tempo gasto pelos animais explorando o novo objeto (teste 1, B em 90 min; teste 2, C em 24h) em relação ao tempo total de exploração em 10 dias. \* $p < 0,1$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Em 20 dias (Figura 48) nota-se que no teste 2, os animais do grupo GBM tratados com sertralina tiveram o tempo de exploração do novo objeto cerca de 30% maior que o dos animais controles do grupo GBM (DMSO). Este maior tempo de exploração no novo objeto reflete a capacidade de memória preservada.



**Figura 48:** Análise da memória após 20 dias (taxa de discriminação). Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma. Teste de memória, com análise do tempo gasto pelos animais explorando o novo objeto (teste 1, B em 90 min; teste 2, C em 24h) em relação ao tempo total de exploração em 20 dias. \*\* $p < 0,01$ .

Após 30 dias, os animais do grupo GBM (Sertralina) apresentaram uma diminuição abrupta no interesse do novo objeto no teste 2 (73%) quando comparados com os animais do grupo SHAM (Sertralina) (Figura 49). Nos testes 1 e 2, os animais do grupo GBM tratados com sertralina apresentaram uma diminuição menor que os animais controle. A redução da memória nos animais portadores de tumor está relacionada com o desenvolvimento tumoral que afeta o funcionamento cognitivo, que foi significativamente preservado pelo tratamento com sertralina.



**Figura 49:** Análise da memória após 30 dias (taxa de discriminação). Parâmetros comportamentais de animais expostos ao modelo experimental de glioblastoma. Teste de memória, com análise do tempo gasto pelos animais explorando o novo objeto (tempo 1, B em 90 min; tempo 2, C em 24h) em relação ao tempo total de exploração em 30 dias. \* $p < 0,1$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e o tecido cerebral coletados para análises. O material foi separado para análise histológica e análises bioquímicas (proteicas). O objetivo da análise histológica era confirmar o desenvolvimento de tumores nos animais do grupo GBM e avaliar as diferenças deste desenvolvimento entre os grupos GBM DMSO e GBM SER. Contudo, não foi possível confirmar o desenvolvimento tumoral na amostra processada para histologia. E infelizmente problemas técnicos durante a pandemia de COVID-19 levaram a perda das outras amostras, inviabilizando a análise final deste ensaio *in vivo*.

## 6. Discussão

A proteína TCTP tem ganho crescente interesse na comunidade científica desde sua descoberta devido ao seu envolvimento em diferentes funções biológicas. Entre esses processos estão a resposta a estresse, divisão celular, resposta imune, crescimento e desenvolvimento celular, entre outros. Por esse motivo, a desregulação da TCTP é vista em várias desordens que acabam levando a patologias como o câncer (Bommer, U.A.; Kawakami, T. 2020). Desde



os primeiros estudos da relação da proteína TCTP em tumores a presença de grande quantidade de TCTP foi caracterizada em diversos tipos de cânceres (Acunzo et al., 2014, Gu et al., 2014).

Inicialmente, este trabalho abordou os tumores de neuroblastoma devido à falta de informações desse tumor em relação a TCTP. Os neuroblastomas são tumores complexos e heterogêneos, com um prognóstico que varia de acordo com idade, estágio da doença e características biológicas do tumor (Mlakar et al., 2017). Altos níveis de TCTP fosforilada foram associados com menor sobrevida em pacientes com neuroblastoma, em estudo com 88 pacientes (Ramani et al., 2015). Nosso objetivo foi avaliar diferentes linhagens tumorais de neuroblastoma (NBA), que apresentam diferentes características, em relação ao tratamento com sertralina.

Nossos resultados mostram que as diferentes linhagens foram suscetíveis ao tratamento e se mostraram sensíveis à sertralina. A linhagem CHLA-20 sugere apresentar maior sensibilidade nos ensaios de viabilidade e proliferação celular, sendo capaz também de reduzir o número de colônias formadas. Já a linhagem SH-SY5Y indiferenciada não apresentou diferenças nos ensaios de viabilidade, proliferação e clonogenicidade celular em relação a linhagem que foi submetida a diferenciação, SH-SY5Y diferenciada. Destacamos a linhagem IMR-32, que apresenta amplificação do gene MYCN, o qual está associado a um pior prognóstico além de estar relacionado com falha no tratamento e estágio avançado da doença (Barone et al., 2013; Pinto et al., 2015). Mesmo com essas características, a linhagem apresentou redução da viabilidade e proliferação celular, além de diminuir a capacidade de formação de colônias em meio semi-sólido.

No caso dos tumores de neuroblastoma, dificilmente o gene p53 encontra-se mutado. Somente 2% de casos refratários apresentam mutações (Tweddle et al., 2003). Como visto por Amson e colaboradores (2011), as proteínas TCTP e p53 possuem uma inibição recíproca, onde a p53 consegue causar a repressão transcricional de TCTP e da mesma forma, TCTP inibe a auto-ubiquitinação de MDM2, levando a degradação de p53 mediada por MDM2 (Amson et al., 2011). Quando há presença da sertralina, esta consegue ligar-se diretamente a proteína TCTP e acaba antagonizando sua função no eixo p53-MDM2, o que leva a

restauração dos níveis de p53 WT (*wild-type*) (Amson, R.; Karp, J.E.; Telerman, A. 2012). Isso pode explicar como essa droga é capaz de induzir as células tumorais a morte.

A TCTP também já foi associada a diversos mecanismos que levam a malignização celular como invasão, migração (Gao et al., 2022) e metástase (Zhang et al., 2017). A TCTP interage com o citoesqueleto sendo capaz de influenciar a forma e motilidade da célula. Da mesma forma, a proteína Cdc42 pode participar da regulação do citoesqueleto e a TCTP pode controlar o movimento celular pela regulação de Cdc42 (Xiao et al., 2016). Os resultados obtidos para os ensaios de migração celular mostram que os grupos tratados com sertralina foram capazes de reduzir a atividade migratória das células em 48 horas, enquanto nos grupos controles observou-se fechamento completo do risco nesse mesmo período. A superexpressão de TCTP facilita a migração celular por meio da indução da reorganização do esqueleto de actina. Enquanto o *knockdown* de TCTP por siRNA inibe significativamente a motilidade de astrócitos primários devido à reorganização de microtúbulos e à perturbação da rede F-actina do citoesqueleto (Ren et al., 2015).

A diminuição dos níveis de TCTP com o tratamento com sertralina já foi mostrada para outras linhagens celulares, como de mama (MDA-MB-231) e em leucemia monocítica (U937) (Tuynder et al., 2004), melanoma (Boia-Ferreira et al., 2017), e em linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) obtidas de pacientes (*ex-vivo*) (Amson et al., 2013). Apesar de a sertralina poder apresentar outros alvos e ações além da diminuição da TCTP, a literatura científica tem associado os efeitos de redução de TCTP da sertralina aos seus efeitos antitumorais. Isto é suportado pelos efeitos similares obtidos com técnicas de silenciamento para TCTP. Em células de melanoma murino (B16F10), o silenciamento de TCTP inibiu metástase pulmonar, reduzindo a invasividade e migração das células de melanoma (Bae et al, 2015). Em câncer de próstata resistente à castração, Karaki e colaboradores (2017) desenvolveram oligonucleotídeos antisense (ASO) para inibir a expressão de TCTP. A administração de TCTP-ASO em camundongos imunocomprometidos suprimiu o crescimento do tumor. Também, aumentou significativamente os efeitos da

quimioterapia e resultou em uma diminuição significativa dos níveis de Ki-67, um marcador de proliferação.

Em relação ao nível intracelular de TCTP nosso estudo demonstrou que a sertralina é capaz de reduzir os níveis da proteína, sendo tempo e concentração dependente, pois em 72 horas observamos maior redução na quantidade de TCTP para a maior concentração testada (1  $\mu$ M). A linhagem que se mostrou mais sensível foi a SH-SY5Y diferenciada enquanto a que apresentou menor redução foi a IMR-32. Em diferentes tipos tumorais a proteína TCTP encontra-se elevada. Em tecido tumoral de pulmão foi visto que o nível de TCTP é significativamente maior do que nos tecidos adjacentes normais (Sun et al., 2019). Em tumores de mama, Lucibello e colaboradores (2015) demonstraram maior presença de TCTP fosforilada em tumores de mama do subtipo [ER-], que apresentam pior prognóstico, além de observar grande quantidade de TCTP fosforilada somente em tecido tumoral de mama e não em tecidos normais.

Um dos objetivos desse trabalho foi avaliar, por meio do uso da sertralina, opções viáveis de tratamento para pacientes com câncer que possam ser ofertadas para a população em geral e possam trazer benefícios para o tratamento e melhora na qualidade de vida. Os antidepressivos como a sertralina e a fluoxetina já foram reportados como capazes de induzir a morte celular em vários modelos de câncer como glioma (Levkovitz et al., 2005), glioblastoma (Bi et al., 2023), neuroblastoma (Wang et al., 2015) e leucemia mieloide aguda (Xia et al., 1999). Em especial, a sertralina já se mostrou eficiente contra vários tipos tumorais, como por exemplo meduloblastoma (Kurita et al., 2018), linfoma (Di Rosso et al., 2018), melanoma (Boia Ferreira et al., 2017), pulmão (Jiang et al., 2018), colorretal (Gil-Ad et al., 2008), mama (Bavadekar et al., 2014; Baldissera et al., 2023), hepatocelular (Chen et al., 2014), ovário (Drinberg et al., 2014), entre outros. Durante nossa pesquisa foi desenvolvido dois métodos de sensibilização com quimioterápico, um chamado de tratamento concomitante e o outro pré-tratamento (material e métodos). Os resultados apontam que em ambos os métodos testados, o tratamento sertralina + quimioterápico (doxorrubicina) diminuíram a viabilidade celular das linhagens de NBA. Quando comparamos os métodos entre si é possível avaliar que o método concomitante

(ser 1  $\mu\text{M}$  + doxo 0.1  $\mu\text{M}$ ) se mostrou mais eficaz, sendo capaz de reduzir em 30% a viabilidade das células de todas as linhagens testadas. Já o pré-tratamento (ser 1  $\mu\text{M}$ , seguido de doxo 0.1  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de reduzir 20% das células viáveis de todas as linhagens.

Em câncer de pulmão (câncer de pulmão de células não pequenas), o uso da sertralina em diferentes linhagens foi capaz de induzir a autofagia de maneira concentração dependente. O uso combinado da sertralina com erlotinibe (fármaco utilizado para câncer de pulmão) levou a um alto acúmulo de LC3-II (biomarcador para autofagia) (Jiang et al., 2018).

Os tumores de neuroblastoma são considerados bem heterogêneos, abrangendo tumores que apresentam regressão espontânea até tumores que possuem progressão inevitável, levando a metástase e por fim morte, apesar da terapia intensiva (Matthay et al., 2016). Quando a doença é descoberta, esses tumores são avaliados em relação ao estágio da doença, características histológicas, citogenéticas, alterações moleculares, entre outros. A partir da compreensão do prognóstico, busca-se escolher a orientação terapêutica para cada caso. Pacientes que encontram-se no grupo de alto risco passam por um tratamento extensivo e invasivo, que inclui quimioterapia, cirurgia e radioterapia. Além de passar pela terapia de manutenção que consiste em terapia de diferenciação com isotretinoína e imunoterapia com anticorpo monoclonal anti-GD2 e citocinas (Tolbert, V.P.; Matthay, K.K. 2018). A isotretinoína (também conhecida como ácido-13-cis-retinóico), assim como o ATRA fazem parte do grupo dos retinóides e são derivadas da vitamina A, utilizados como inibidores da proliferação de células neoplásicas, por exercer efeito regulador sobre a diferenciação celular (Diniz, D.G.A.; Lima, E.; Antoniosi Filho, N.R. 2002).

A terapia de indução de diferenciação tem feito alguns avanços no tratamento de manutenção de pacientes NBA de alto risco. Essa terapia induz a reativação de programas de diferenciação endógena, promove a maturação das células tumorais e permite que as células malignas revertam para um fenótipo menos agressivo (Jin et al., 2020). Inúmeros moduladores de diferenciação já foram reportados em diferentes terapias para tumores distintos (Osteosarcoma, leucemia mieloide aguda, câncer de pâncreas, de fígado etc.) (Cruz, F.D.; Matushansky, I. 2012). Entre esses moduladores estão os retinóides, os quais

são capazes de promover a diferenciação de células de neuroblastoma. Nesse trabalho foi utilizado para diferenciação o ATRA (ácido trans retinóico) e pudemos avaliar, por meio de *western blot*, que a célula tratada com ATRA juntamente da sertralina provocou maior aumento nos níveis de sinaptofisina (marcador de diferenciação celular) do que quando comparada com o grupo tratado somente com ATRA. Quando comparamos a linhagem SH-SY5Y indiferenciada com a linhagem diferenciada observamos que não há diferenças significativas em relação aos efeitos causados pela sertralina. Ambas as linhagens se mostraram sensíveis ao tratamento e foram capazes de diminuir características de malignidade celular como visto na migração e clonogenicidade celular.

Esse trabalho também investigou o efeito que a sertralina tem em tumor de glioblastoma, utilizando a linhagem GL261. Esses tumores são caracterizados por sua agressividade e alta taxa de letalidade (Zou et al., 2019). O tratamento utiliza ressecção extensa com quimioterapia combinada, além do uso de anticorpos monoclonais direcionados ao fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) e mesmo assim a sobrevida média após o diagnóstico é de 14,6 meses, sendo que apenas 4,3% dos pacientes vivem cinco anos ou mais (Zhang, I.; Knisely, J.P. 2016). A expressão de TCTP já foi descrita como aumentada em gliomas, em especial em gliomas de alto grau (III e IV) (Gu et al., 2014). Neste estudo os autores sugeriram a correlação entre a expressão de TCTP e características clínico-patológicas avançadas dos tumores.

Nossos ensaios *in vitro* mostram que a sertralina tem efeitos inibitórios bastante evidentes na linhagem de glioblastoma murino GL261. Mesmo utilizando concentrações baixas, a linhagem se mostrou sensível ao tratamento e foi capaz de reduzir a quantidade de células viáveis. Gu e colaboradores (2014) mostraram que a TCTP é capaz de aumentar a proliferação celular em linhagens de glioma. Da mesma forma, Jin e colaboradores (2015) demonstraram que a regulação negativa da expressão de TCTP causou parada do ciclo celular na fase G0/G1 e acabou levando a inibição da proliferação das células de glioma.

A clonogenicidade está relacionada com o status de célula tronco tumoral (Chen et al., 2011). Em nossos ensaios de clonogenicidade, a linhagem GL261 foi capaz de reduzir a capacidade de formação de colônias para ambas as

concentrações testadas de sertralina. Este resultado é particularmente relevante no contexto do glioblastoma, tumor em que as células tronco tumorais e sua relevância para a progressão tumoral já estão bem caracterizadas (Lathia et al., 2015). Estudos anteriores reportaram que a inibição da expressão de TCTP em linhagem de glioma diminuiu as colônias formadas em comparação com o controle (Jin et al., 2015). Também, Boia-Ferreira e colaboradores (2017) mostraram em linhagens de melanoma que o tratamento com a sertralina é capaz de reduzir pela metade a formação de colônias.

A capacidade de migração também foi avaliada e a sertralina (1  $\mu$ M) reduz a migração em cerca de 61%. Por meio do ensaio de migração pelos métodos de “*Scratch*” e “*Transwell*”, Jin e colaboradores (2015) verificaram que a regulação negativa de TCTP através de shRNA levou a inibição da migração e invasão celular em glioma. A TCTP também é relevante no processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT). A superexpressão de TCTP está relacionada com características mesenquimais, enquanto sua regulação negativa promove a expressão de marcadores epiteliais, além de inibir invasão e metástase em células tumorais de pulmão (Mishra et al., 2018). A TCTP, em níveis elevados, promove a expressão de marcadores mesenquimais como N-caderina,  $\alpha$ -SMA, Snail, Slug e Twist, aumenta a invasão celular através da ativação de MMP-9, e acelera a migração ativando a transdução do sinal mTORC2/Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenina (Bae et al., 2015). Da mesma forma, Sun e colaboradores (2019) observaram em tumor de pulmão, durante o ensaio de migração, que o silenciamento de TCTP reduziu de forma significativa a capacidade migratória comparada ao grupo controle. Já na migração feita por *transwell* eles revelaram que a capacidade invasiva das células com TCTP silenciada foi reduzida para 67,5% (Sun et al., 2019). Portanto, nossos resultados estão de acordo com a literatura, que mostram que quando há diminuição da TCTP há redução da capacidade migratória.

Quando avaliamos os níveis proteicos de TCTP após o tratamento com sertralina observamos uma redução que é concentração e tempo dependente. Portanto, relacionamos esses efeitos de redução nas características malignas à diminuição dos níveis intracelulares de TCTP. Em glioma, foi observado que em seis linhagens testadas, todas apresentaram maior expressão de TCTP quando

comparadas ao tecido cerebral lisado normal. Juntamente com esses dados, eles detectaram por meio da análise de qRT-PCR maior quantidade de mRNA de TCTP em gliomas de alto grau em comparação aos gliomas de baixo grau e tecido normal (Gu et al., 2014).

O ensaio para avaliar o efeito do tratamento com sertralina em conjunto com o quimioterápico também foi feito utilizando os dois métodos, concomitante e pré-tratamento. Para essa linhagem celular foi utilizado o quimioterápico temozolomida (TMZ), o qual é utilizado clinicamente para pacientes com glioblastoma. De forma semelhante ao observado para as linhagens de neuroblastoma, notamos que ambos os métodos foram eficazes na redução da viabilidade celular, porém, para a linhagem de glioblastoma não houve diferenças significativas entre os métodos, sendo que ambos foram capazes de diminuir em cerca de 20% das células viáveis. Em um estudo de sinergismo de drogas como alvo para terapia em glioblastoma foi visto que a combinação da sertralina com rimcazole (inibidor da recaptção de dopamina) apresentou resultados promissores (Schmidt et al., 2013). Ambas representam drogas psiquiátricas seguras e testadas, que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, e a combinação seria interessante como um candidato terapêutico para estudos posteriores. Tzadok e colaboradores (2010) investigaram os efeitos citotóxicos de novas combinações de drogas utilizando tratamentos convencionais para glioblastoma como irradiação ou o quimioterápico temozolomida, imatinib e drogas psicotrópicas, incluindo a sertralina. Os autores descobriram que a sertralina sozinha é capaz de reduzir a proliferação celular de maneira dependente da dose. A combinação de sertralina com temozolomida demonstrou um efeito anti-proliferativo (Tzadok et al., 2010).

Assim, nossos resultados *in vitro* apontam a sertralina como uma droga com atividade antitumoral para a linhagem de glioblastoma murino. No caso deste tipo de tumores, a sertralina tem uma vantagem terapêutica pois atua no SNC, ampliando a sua potencialidade de aplicação clínica. Ressaltamos que nas concentrações estudadas nossos resultados sugerem uma ação citostática, de inibição da proliferação (sem diminuição no número de células viáveis na sequência dos tempos avaliados). Um estudo utilizando outras drogas antihistamínicas (levomepromazina e buclizina) mostrou ação citostática destas



drogas sobre células da linhagem MCF7 (tumor de mama), foi relacionada à diminuição dos níveis de TCTP (Seo, E.J.; Efferth, T. 2016).

Em seguida, prosseguimos para a avaliação da sertralina *in vivo* em dois modelos de glioblastoma murino, que utilizam as células GL261 e os camundongos C57Bl6. Em um dos experimentos, os animais foram inoculados com tumor por via subcutânea e ao final do experimento pudemos avaliar a massa dos tumores e os níveis da proteína TCTP contidos na massa tumoral retirada desses animais. Nossa avaliação mostra que há uma evidente redução nos níveis da proteína TCTP nos tumores animais que foram tratados com sertralina em comparação aos grupos controle. Esse resultado juntamente com os obtidos pelos ensaios comportamentais sugerem a relevância da redução da TCTP no contexto tumoral e a importância do uso da sertralina para tratamentos tumorais. Nosso grupo já havia reportado os efeitos antitumorais da sertralina *in vivo* em melanoma murino. Nesse estudo, os animais foram inoculados com melanoma de forma subcutânea e após o tratamento, o grupo que recebeu sertralina foi capaz de reduzir em até 84,4% o crescimento tumoral (Boia-Ferreira et al., 2017). Gu e colaboradores (2014) observaram que após inocular células de glioma em camundongos nude atímicos, a superexpressão da TCTP levava a um aumento no volume tumoral, além de um aumento da expressão do marcador de proliferação ki-67.

Quando se trata dos tumores de glioblastoma existem inúmeras dificuldades relacionadas ao tratamento. Entre essas dificuldades estão o fato de os tumores serem heterogêneos, que evoluem ao longo da doença e abrigam subpopulações de células resistentes, e outro impedimento para o tratamento eficaz é a barreira hematoencefálica (Lukas et al., 2019). Em 2013, Kapoor e colaboradores observaram, *in vivo*, que o tratamento com sertralina pode modular a função da glicoproteína P (P-gp) em importantes locais de barreira. É de extrema relevância considerar agentes terapêuticos que são substratos da P-gp coadministrados com SSRI para o desenvolvimento de futuras terapêuticas, onde essas interações medicamentosas serão capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica e atingirem o alvo tumoral. O quimioterápico temozolomida é um dos mais utilizados para tratar glioblastoma, por apresentar um perfil mais seguro quando comparado a outros quimioterápicos (Karachi et al., 2018). Um



estudo de Gooijer e colaboradores (2018) demonstrou que a glicoproteína P e BCRP (*breast cancer resistance protein*), na barreira hematoencefálica, atenuam parcialmente a eficácia da temozolomida no cérebro. Porém, na ausência dessas proteínas há aumento da concentração da temozolomida (Gooijer et al., 2018). Esses dados da literatura sugerem que o uso de sertralina com a temozolomida podem levar a uma resposta mais eficaz no tratamento contra o glioblastoma. Nosso trabalho abordou somente o uso do quimioterápico com a sertralina em modelo *in vitro*. Portanto, seriam necessários mais estudos para termos respostas mais concretas.

Para o segundo experimento, os animais foram inoculados com o tumor intracerebroventricular e em seguida, foram tratados por 30 dias com PBS, DMSO ou sertralina. Durante esse período foram realizados ensaios comportamentais nesses animais.

Pacientes diagnosticados com glioblastoma podem apresentar comprometimento das habilidades cognitivas e da memória à medida que o tumor se desenvolve. Também, os efeitos provenientes da ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia podem agravar a qualidade de vida e as habilidades cognitivas dos pacientes, apesar de aumentarem o período de sobrevivência após o diagnóstico (Solanki et al., 2017). O déficit motor é bem comum em tumores cerebrais e podem ocorrer em qualquer tipo de tumor, primário ou secundário, mas tendem a ser comumente associados a tumores malignos primários (Amidei, C.; Kushner, D.S. (2015)). O déficit motor foi o segundo sintoma mais relatado pelos pacientes com glioma maligno, perdendo apenas para a fadiga (Osoba et al., 2000). Déficits motores foram relatados com mais frequência em pacientes com glioblastoma do que naqueles com astrocitoma anaplásico. Portanto, compreender as implicações clínicas dos déficits motores pode fornecer orientação para intervenções que podem melhorar o estado funcional e a qualidade de vida dos pacientes (Amidei, C.; Kushner, D.S. (2015)).

Nossos resultados evidenciam que os animais tratados com a sertralina apresentam uma melhor resposta no CAMPO ABERTO quando comparados com os animais controles (GBM PBS e DMSO). Esse teste busca avaliar os comportamentos de locomoção do animal, além de avaliar parâmetros de ansiedade (Seibenhener, M.L.; Wooten, M.C. 2015). Foi possível observar que

os animais com tumor tratados com a sertralina apresentaram maior taxa de exploração na caixa, com uma maior quantidade de quadrantes percorridos quando comparado com os animais portadores de tumor controle. A redução significativa de locomoção e elevações nos animais controle, DMSO e PBS do grupo GBM, são decorrentes do desenvolvimento do tumor.

Os comportamentos de andar na região de periferia ou centro, elevar-se, limpar-se ou defecar são comportamentos que podem refletir o estado emocional do animal frente a um novo ambiente (Guilhermitti, A.C. 2011). Os animais do grupo sertralina apresentaram um aumento gradativo na exploração da parte central da caixa, além da diminuição da defecação, apontando o efeito ansiolítico da droga. Na literatura já foi descrito por Prut, L. e Belzung, C. (2003) que o aumento na locomoção central ou o tempo gasto na parte central da caixa pode ser relacionado como um efeito ansiolítico, enquanto a locomoção apenas em regiões da periferia está associada com um efeito ansiogênico.

Estudos recentes em animais trazem evidências que sugerem que drogas antidepressivas são capazes de melhorar o desempenho motor, normalizam o nível de neurotransmissores estriatais, aumentam o nível de fatores neurotróficos e podem induzir a neurogênese no cérebro (Peng et al., 2008; Sharma, N.; Jamwal, S.; Kumar, P. 2016). Em ratos que foram induzidos por ácido quinolínico a apresentar sintomas semelhantes aos causados pela doença de Huntington foi visto que o tratamento com sertralina ou venlafaxina (10 e 20 mg/kg/dia; via oral) durante 21 dias foi capaz de melhorar significativamente e de forma dose dependente o prejuízo no rotarod e a atividade locomotora no teste de campo aberto (Gill et al., 2017).

O rotarod é um teste que foi introduzido em 1957 com o objetivo de avaliar o equilíbrio de roedores ao colocá-los no topo de um cilindro em rotação contínua. A execução do desafio requer equilíbrio intacto, força, integração sensório-motora e coordenação dos membros e do corpo para o sucesso. Qualquer falha nessas características acaba prejudicando a performance do animal durante a experimentação (Jacobs, J.R.; Carey, M.R. 2021). Na nossa avaliação com o experimento de RotaRod ocorreu uma redução na capacidade dos animais portadores de tumor em se manter caminhando no equipamento no ensaio realizado nos trinta dias. Essa condição clínica comprometida é

observada neste modelo animal com a progressão do tumor. Na literatura é descrito que pacientes com glioblastoma geralmente apresentam hemiparesia (Preusser et al., 2011). Além de ser observado em pacientes com glioma maligno déficit motor e fadiga (Amidei, C.; Kushner, D.S. 2015). Essas observações corroboram com os resultados encontrados que mostram que os animais GBM controle, em trinta dias, não são capazes de se manterem no equipamento nem por um minuto, provavelmente pela fadiga e o déficit motor causado pelo crescimento tumoral. Já o grupo GBM sertralina, ao final dos trinta dias, foi o único grupo em que os animais permaneceram andando por pelo menos 5 minutos, antes da queda. Esse resultado sugere que o tratamento com sertralina, diminuiu o comprometimento motor. A sugestão é que este resultado esteja relacionado com a inibição do crescimento do tumor, contudo, não conseguimos comprovar isto experimentalmente até o momento.

Para o ensaio de memória foi utilizado o teste de reconhecimento de novo objeto (*NOR-Novel object recognition*). Esse teste é uma maneira fácil e eficiente para avaliar as diferentes fases de aprendizagem e memória em camundongos (Lueptow, L.M. 2017). Esses animais possuem uma preferência inata por novidades, portanto o roedor que se lembra do objeto familiar tende a passar mais tempo explorando o novo objeto (Ennaceur, A.; Delacour, J. 1988; Ennaceur, A. 2010). Neste ensaio é notável que os animais GBM tratados com sertralina apresentam maior interesse em explorar os objetos novos, do que os animais controle GBM (PBS e DMSO). Medicamentos que agem pela via serotoninérgica, como a sertralina, atuam sob o receptor 5-HT<sub>1a</sub>, regulando a modulação da memória de curta e longa duração (Kapczinski, et al., 2004). Isso pode ser relacionado ao fato de que os animais GBM sertralina mantiveram a capacidade de exploração durante os trinta dias, mesmo com uma redução no final do experimento. Já foi visto que dependendo da dose, a sertralina melhorou significativamente o aprendizado da memória espacial, tanto em camundongos jovens quanto velhos. Também, o tratamento com sertralina resultou na regulação positiva de BDNF, fosfo-ERK e Bcl-2 cerebrais que podem estar envolvidos no efeito pró-cognitivo da sertralina (Taler et al., 2013). Carlini e colaboradores (2012) descobriram que o tratamento com os antidepressivos fluoxetina e venlafaxina em camundongos diminui significativamente o

desempenho da memória no teste de reconhecimento de novos objetos (NOR) e diminui a sinalização de ERK (envolvido na aprendizagem e memória). Em contraste, a avaliação da sertralina melhorou a memória junto à fosforilação de ERK, sugerindo um efeito diferencial na via de sinalização da sertralina em comparação com a fluoxetina e venlafaxina (Carlini et al., 2012).

## **7. Considerações finais**

Esse trabalho teve como finalidade compreender o papel da TCTP em tumores de neuroblastoma e glioblastoma, além de avaliar o potencial terapêutico da sertralina. Nossos resultados mostram que após o tratamento com a sertralina houve redução das características malignas de viabilidade, proliferação, clonogenicidade e migração celular. Também notamos uma diminuição nos níveis da proteína TCTP após o tratamento. A diminuição dos níveis da TCTP durante o tratamento resulta na perda de características tumorais, o que sugere um envolvimento de reprogramação celular e de reversão tumoral.

Ainda são necessários mais estudos para entender o papel exato da TCTP nesses tumores, mas nossos resultados avançam no entendimento do papel da proteína no contexto tumoral. Assim, é importante destacar a TCTP como uma proteína alvo no tratamento dos tumores de neuroblastoma e glioblastoma, e avaliar a possibilidade de uso da sertralina como droga no tratamento desses tipos tumorais.

## REFERÊNCIAS

ACKERMANN, S.; GOESER, F.; SCHULTE J.H.; SCHRAMM, A.; EHEMAN, V.; HERO, B.; EGGERT, A.; BERTHOLD, F.; FISCHER, M. Polo-Like Kinase 1 is a Therapeutic Target in High-Risk Neuroblastoma. **Cancer Therapy : Preclinical**, n. 10, p. 731–742, 2011.

ACUNZO, J.; BAYLOT, V.; SO, A.; ROCCHI, P. TCTP as therapeutic target in cancers. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 6, p. 760–769, 2014.

AGNIHOTRI, S.; BURREL, K.E.; WOLF, A.; JALALI, S.; HAWKINS, C.; RUTKA, J.T.; ZADEH, G. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, n. 1, p. 25–41, 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. (Orgs.). *Biologia Molecular da Célula - 6° Ed.* 2017, **Ed. Artes Médicas**, Porto Alegre.

ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D.T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacol Ther.** v:152, p.63-82. 2015. doi: 10.1016/j.

AMERICAN ASSOCIATION OF NEUROSCIENCE NURSES. Care of the adult patient with a brain tumor. **Journal of Neuroscience Nursing**, v.46, p. 367, 2014.

AMIDEI, C.; Kushner, D. S. Clinical implications of motor deficits related to brain tumors. **Neuro-Oncology Practice**, v. 2, p. 179-184, 2015.

AMSON, R.B.; NEMANI, M.; ROPERCH, J.P.; ISRAELI, D.; BOUGUELERET, L.; LE GALL, I.; MEDHIOUB, M.; LINARES-CRUZ, G.; LETHROSNE, F.; PASTURAUD, P.; PIOUSFRE, L.; PRIEUR, S.; SUSINI, L.; ALVARO, V.; MILLASSEAU, P.; GUIDICELLI, C.; BUI, H.; MASSART, C.; CAZES, L.; DUFOUR, F.; BRUZZONI-GIOVANELLI, H.; OWADI, H.; HENNION, C.; CHARPAK, G.; TELERMAN, A. Isolation of 10 differentially expressed cDNA in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila

seven in absentia gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 3953-3957, 1996.

AMSON, R.; PECE, S.; LESPAGNOL, A.; VYAS, R.; MAZZAROL, G.; TOSONI, D.; COLALUCA, I.; VIALE, G.; RODRIGUES-FERREIRA, S.; WYNENDAELE, J.; CHALOIN, O.; HOEBEKE, J.; MARINE, J.C.; DI FIORE, P.P.; TELERMAN, A. Reciprocal repression between P53 and TCTP. **Nature medicine**, v. 18, p.91–99, 2011.

AMSON, R. PECE, S.; MARINE, J.M.; FIORE, P.P.; TELERMAN, A. TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 37–46, 2013.

AMSON, R.; KARP, J. E.; TELERMAN, A. Lessons from tumor reversion for cancer treatment. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, n. 1, p. 59–65, 2013.

ARCURI, F.; PAPA, S.; CARDUCCI, A.; ROMAGNOLI, R.; LIBERATORI, S.; RIPARBELLI, M.G.; SANCHEZ, J.C.; TOSI, P.; DEL VECCHIO, M.T. Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. **Prostate**. v. 60(2), p. 130-40. 2004. doi: 10.1002/pros.20054. ASKANAZY, M. Die Teratome nach ihrem Bau, ihrem Verlauf, ihrer Genese und im Vergleich zum experimentellen Teratoid. **Pathol.**, v. 11, p.39-82, 1907.

BAE, S.; KIM, H.J.; LEE, K.J.; LEE, K. Translationally Controlled Tumor Protein induces epithelial to mesenchymal transition and promotes cell migration , invasion and metastasis. **Sci Rep.**, p. 1–9, 2015.

BAE, S.Y.; BYUN, S.; BAE, S.H.; MIN, D.S.; WOO, H.A.; LEE, K. TPT1 (tumor protein, translationally-controlled 1) negatively regulates autophagy through the BECN1 interactome and an MTORC1-mediated pathway. **Autophagy**, v. 13, p. 820–833. 2017.

BALDISSERA, A.B.; BOIA-FERREIRA, M.; BASÍLIO, A.B.C.; RESENDE, J.S.S.; CASTRO, M.A.A.; CHAIM, O.M.; GREMSKI, L.H.; VEIGA, S.S.; SENFF-RIBEIRO, A. Sertraline as a potential cancer therapeutic approach: Biological relevance of TCTP in

breast cancer cell lines and tumors. **Adv Med Sci.** 26;68(2):227-237. 2023. doi: 10.1016/j.advms.2023.06.001.

BARONE G, ANDERSON J, PEARSON AD, PETRIE K, CHESLER L. New strategies in neuroblastoma: Therapeutic targeting of MYCN and ALK. **Clin Cancer Res.** v. 19(21), p. 5814-5821. 2013.

BAVADEKAR, S.; PANCHAL, P.; HANBASHI, A.; VANSAL, S. Cytotoxic Effects of Selective Serotonin- and Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors on Human Metastatic Breast Cancer Cell Line, MCF7. **The FASEB Journal**, 2014.

BAYLOT, V.; KATSOGIANNOU, M.; ANDRIEU, C.; TAIEB, D.; ACUNZO, J.; GIUSIANO, S.; FAZLI, L.; GLEAVE, M.; GARRIDO, C.; ROCCHI, P. Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 12, p. 2244–2256, 2012.

BAYLOT, V.; KARAKI, S.; ROCCHI, P. TCTP Has a Crucial Role in the Different Stages of Prostate Cancer Malignant Progression. **Results Probl Cell Differ**, v.64, p.255-261, 2017.

BERLANGA P, CAÑETE A, CASTEL V. Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma. **Expert Opin Emerging Drugs.** v. 22(1), p. 63-75. 2017.

BI, J.; KHAN, A.; TANG, J.; ARMANDO, A.M.; WU, S.; ZHANG, W.; GIMPLE, R.C.; REED, A.; JING, H.; KOGA, T.; WONG, I.T.; GU, Y.; MIKI, S.; YANG, H.; PRAGER, B.; CURTIS, E.J.; WAINWRIGHT, D.A.; FURNARI, F.B.; RICH, J.N.; CLOUGHESY, T.F.; KORNBLUM, H.I.; QUEHENBERGER, O.; RZHETSKY, A.; CRAVATT, B.F.; MISCHEL, O.S. Targeting glioblastoma signaling and metabolism with a re-purposed brain-penetrant drug. **Cell Rep**, 37(5):109957. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109957>

BIZZARRI, M.; CUCINA, A.; PROIETTI, S. Tumor Reversion: Mesenchymal-Epithelial Transition as a Critical Step in Managing the Tumor-Microenvironment Cross-Talk. **Curr Pharm Des**, p. 4705–4715, 2017.

BÖHM, H.; BENNDORF, R.; GAESTEL, M.; GROSS, B.; NÜRNBERG, P.; KRAFT, R.; OTTO, A.; BIELKA, H. The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. **Biochem Int**, v. 19(2), p. 277-86. 1989.

BOIA-FERREIRA, M.; BASÍLIO, A.B.; HAMASAKI, A.E.; MATSUBARA, F.H.; APPEL, M.H.; DA COSTA, C.R.; AMSON, R.; TELERMAN, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S.; SENFF-RIBEIRO, A. TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment. **Br J Câncer**, v. 117, p. 656- 65. 2017.

BOMMER, U.A.; BOROVJAGIN, A.V.; GREAGG, M.A.; JEFFREY, I.W.; RUSSELL, P.; LAING, K.G.; LEE, M.; CLEMENS, M.J. The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. **RNA**. v. 8(4), p. 478-96. 2002. doi: 10.1017/s1355838202022586.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 379-385, 2004.

BOMMER, U.A.; VINE, K.L.; PURI, P.; ENGEL, M.; BELFIORE, L.; FILDES, K.; BATTERHAM, M.; LOCHHEAD, A.; AGHMESHEH, M. Translationally controlled tumour protein TCTP is induced early in human colorectal tumours and contributes to the resistance of HCT116 colon cancer cells to 5-FU and oxaliplatin. **Cell Commun Signal**, v. 15, p.1-9. 2017.

BOMMER, U. A. & TELERMAN, A. Dysregulation of TCTP in biological processes and diseases. **Cells**, v. 9(7), p.1632. 2020. <https://doi.org/10.3390/cells 9071632>.

BONNET, C.; PERRET, E.; DUMONT, X.; PICARD, A.; CAPUT, D.; LENAERS, G. Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. **Yeast**, v. 16, p. 23-33. 2000.

BRIAND, P.; PETERSEN, O.W.; VAN DEURS, B. A new diploid nontumorigenic human breast epithelial cell line isolated and propagated in chemically defined medium. **In Vitro Cell Dev Biol**. v. 23(3), p.181-188. 1987.

BRIOUDES, F.; THIERRY, A.M.; CHAMBRIER, P.; MOLLEREAU, B.; BENDAHMANE, M. Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, p.16384-16389. 2010.



BRODEUR, G.; HOGARTY, M.; BAGATELL, R.; MOSSE, Y.; MARIS, J. Neuroblastoma. In **Principles and Practice of Pediatric Oncology**, 7th ed.; Pizzo, P., Poplack, D., Eds.; Wolters Kluwer: Philadelphia, PA, USA, pp. 772–798. 2016. ISBN 978-1-4511-9423-4.

CARLINI, V.P.; M.B. PORETTI, M. RASK-ANDERSEN, R.A. CHAVAN, M.F. PONZIO, R.S. SAWANT, S.R. DE BARIOGLIO, H.B. SCHIÖTH, M.F. DE CUNEO. Differential effects of fluoxetine and venlafaxine on memory recognition: possible mechanisms of action. **Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**. v. 38(2), p. 159–167. 2012.

CATT, S.; CHALMERS, A.; FALLOWFIELD, L. Psychosocial and supportive-care needs in high-grade glioma. **Lancet Oncol.** 9(9), p. 884–891, 2008.

CHAN, T.H.; CHEN, L.; GUAN, X.Y. Role of translationally controlled tumor protein in cancer progression. **Biochemistry Research International**, v. 2012, 2012.

CHEN, Y.; FUJITA, T.; ZHANG, D.; DOAN, H.; PINKAEW, D.; LIU, Z.; WU, J.; KOIDE, Y.; CHIU, A.; LIN, C.C.; CHANG, J.Y.; RUAN, K.H.; FUJISE, K. Physical and functional antagonism between tumor suppressor protein p53 and fortilin, an anti-apoptotic protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 32575-32585, 2011.

CHEN, S.; XUAN, J.; WAN, L.; LIN, H.; COUCH, L.; MEI, N.; DOBROVOLSKY, V.N.; GUO, L. Sertraline, an Antidepressant, Induces Apoptosis in Hepatic Cells Through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **Toxicol. Sci.** v. 137, p. 404–415. 2014.

CHEN, C.; DENG, Y.; HUA, M.; XI, Q.; LIU, R.; YANG, S.; LIU, J.; ZHONG, J.; TANG, M.; LU, S.; ZHANG, Z.; MIN, X.; TANG, C.; WANG, Y. Expression and clinical role of TCTP in epithelial ovarian cancer. **J Mol Histol.** v. 46(2), p. 145-156. 2015. doi: 10.1007/s10735-014-9607-y.

CHEN, S.H.; LU, C.H.; TSAI, M.J. TCTP is Essential for Cell Proliferation and Survival during CNS Development. **Cells**, v.9, p. 133. 2020.

CHEUNG, N.K.; DYER, M.A. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. **Nat Rev Cancer**. v.13(6), p.397-411. 2013. doi: 10.1038/nrc3526.

COHN, S.L.; PEARSON, A.D.J.; LONDON, W.B.; MONCLAIR, T.; AMBROS, P.F.; BRODEUR, G.M.; FALDUM, A.; HERO, B.; IEHARA, T.; MACHIN, D.; MOSSERI, V.; SIMON, T.; GARAVENTA, A.; CASTEL, V.; MATTHAY, K.K. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. **J. Clin. Oncol.** v. 27, p. 289–297. 2009.

COOGAN, P.F.; STROM, B.L.; ROSENBERG, L. Antidepressant use and colorectal cancer risk. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v. 18, p. 1111–1114, 2009.

COUGHLAN, D.; GIANFERANTE, M.; LYNCH, C.F.; STEVENS, J.L.; HARLAN, L.C. Treatment and survival of childhood neuroblastoma: Evidence from a population-based study in the United States. **Pediatr Hematol Oncol**. v.34(5), p. 320-330. 2017.

COZZI, D.A.; MELE, E.; CECCANTI, S.; NATALE, F.; CLERICO, A.; SCHIAVETTI, A.; DOMINICI, C. Long-term follow-up of the "wait and see" approach to localized perinatal adrenal neuroblastoma. **World J Surg**. v.37, p.459–465. 2013.

CRUZ, F.D.; MATUSHANSKY, I. Solid tumor differentiation therapy - is it possible? **Oncotarget**, v. 3, p. 559-567. 2012.

CUCCHI, U.; GIANELLINI, L.M.; DE PONTI, A.; SOLA, F.; ALZANI, R.; PATTON, V.; PEZZONI, A.; TROIANI, S.; SACCARDO, M.B.; RIZZI, S.; GIORDINI, M.L.; CAPELLA, P.; BERIA, I.; VALSASINA, B. Phosphorylation of TCTP as a Marker for Polo-like Kinase-1 Activity In Vivo. **Anticancer Res**, v. 4986, p. 4973–4985, 2010.

CUNHA, M.L.V. DA; MALDAUN, M.V.C. Metastasis from glioblastoma multiforme: a meta-analysis. **Rev. Assoc. Med. Bras**. v. 65(3), p. 424-433. 2019. doi: 10.1590/1806-9282.65.3.424

CURADO, M.P.; EDWARDS, B.; SHIN, H.R.; STORM, H.; FERLAY, J.; HEANUE, M.; BOYLE, P. Cancer Incidence in Five Countries Volume IX. **IARC Scientific Publications**, nº 160, Lyon France. 2007.

DINIZ, D.G.A.; LIMA, E.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Isotretinoin: Pharmacological, pharmacokinetic and analytical profiles. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 38(4):415-430, 2002.

DI ROSSO, M.E.; STERLE, H.A.; CREMASCHI, G.A.; GENARO, A.M. Beneficial effect of fluoxetine and sertraline on chronic stress-induced tumor growth and cell dissemination in a mouse model of lymphoma: crucial role of antitumor immunity. **Front Immunol**, v. 9, p. 1341. 2018.

DIEDE, S.J. Spontaneous regression of metastatic cancer: learning from neuroblastoma. **Nat Rev Câncer**, v.14, p. 71–72. 2014.

DRINBERG, V.; BITCOVER, R.; RAJCHENBACH, W.; PEER, D. Modulating Cancer Multidrug Resistance by Sertraline in Combination with a Nanomedicine. **Cancer Lett.** v. 354, p. 290–298. 2014.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats I. Behavioral-data. **Behav. Brain Res.** v.31(1), p. 47–59. 1988.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behav. Brain Res.** v.215(2), p. 244–254. 2010.

FAISAL, A.; VAUGHAN, L.; BAVETSIAS, V.; SUN, C.; ATRASH, B.; AVERY, S.; JAMIN, Y.; ROBINSON, S.P.; WORKMAN, P.; BLAGG, J.; RAYNAUD, F.I.; ECCLES, S.A.; CHESLER, L.; LINARDOPOULOS, S. The aurora kinase inhibitor cct137690 downregulates MYCN and sensitizes MYCN-amplified neuroblastoma in vivo. **American Association for Cancer Research**, v. 10, N. 11, P. 2115–2123, 2011.

FIUCCI, G.; BEAUCOURT, S.; DUFLAUT, D.; LESPAGNOL, A.; STUMPTNER-CUVELETTE, P.; GEANT, A.; BUCHWALTER, G.; TUYNDER, M.; SUSINI, L.; LASSALLE, J.M.; WASYLYK, C.; WASSYLYK, B.; OREN, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of

the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 3510-3515, 2004.

FURNARI, F.B.; FENTON, T.; BACHOO, R.M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J.M.; STEGH, A.; HAHN, W.C.; LIGON, K.L.; LOUIS, D.N.; BRENNAN, C.; CHIN, L.; DEPINHO, R.A.; CAVENEE, W.K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev.** v.21, p.2683–2710. 2007.

GACHET, Y.; TOURNIER, S.; LEE, M.; LAZARIS- KARATZAS, A.; POULTON, T.; BOMMER, U.A. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. **Journal of Cell Science.** v. 112. p. 1257–1271. 1999.

GAO, J.; MA, Y.; YANG, G.; LI, G. Translationally controlled tumor protein: the mediator promoting cancer invasion and migration and its potential clinical prospects. **J Zhejiang Univ Sci B.** v.23(8), p. 642-654. 2022.

GIL-AD, I.; ZOLOKOV, A.; LOMNITSKI, L.; TALER, M.; BAR, M.; LURIA, D.; RAM, E.; WEIZMAN, A. Evaluation of the Potential Anti-Cancer Activity of the Antidepressant Sertraline in Human Colon Cancer Cell Lines and in Colorectal Cancer-Xenografted Mice. **Int. J. Oncol.**, v.33, p. 277–286. 2008.

GILL, J. S.; JAMWAL, S.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R. Sertraline and venlafaxine improves motor performance and neurobehavioral deficit in quinolinic acid induced Huntington's like symptoms in rats: Possible neurotransmitters modulation. **Pharmacological Reports**, v. 69(2), p. 306–313. 2017. doi:10.1016/j.pharep.2016.11.008.

GIMENEZ-CASSINA, A.; LIM, F.; DIAZ-NIDO, J. Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. **Journal of Neuroscience Research.** v. 84(4), p.755–767. 2006.

GNANASEKAR, M.; THIRUGNANAM, S.; ZHENG, G.; CHEN, A.; RAMASWAMY, K. Gene silencing of translationally controlled tumor protein

(TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells, **International Journal of Oncology**. v. 34. p.1241-1246. 2009.

GOOIJER, M.C.; DE VRIES, N.A.; BUCKLE, T.; BUIL, L.C.M.; BEIJNEN, J.H.; BOOGERD, W.; VAN TELLINGEN, O. Improved Brain Penetration and Antitumor Efficacy of Temozolomide by Inhibition of ABCB1 and ABCG2. **Neoplasia**. v. 20(7), p. 710-720. 2018. doi: 10.1016/j.neo.2018.05.001.

GORLICK, R.; KOLB, E.A.; KEIR, S.T.; MARIS, J.M.; REYNOLDS, C.P.; KANG, M.H.; CAROL, H.; LOCK, R.; BILLUPS, C.A.; KURMASHEVA, R.T.; HOUGHTON, P.J.; SMITH, M.A. Initial testing (stage 1) of the Polo-like kinase inhibitor volasertib (BI 6727), by the Pediatric Preclinical Testing Program. **Pediatr Blood Cancer**, v. 61, n. 1, p. 158–164, 2014.

GRANDCHAMP, B.; HETET, G.; KANNENGIESSER, C.; OUDIN, C.; BEAUMONT, C.; RODRIGUES-FERREIRA, S.; AMSON, R.; TELERMAN, A.; NIELSEN, P.; KOHNE, E.; BALSER, C.; HEIMPEL, H. A novel type of congenital hypochromic anemia associated with a nonsense mutation in the STEAP3 / TSAP6 gene. **Blood**, v. 118, N. 25, P. 6660–6667, 2016.

GU, X.; YAO, L.; MA, G.; CUI, L.; LI, Y.; LIANG, W.; ZHAO, B.; LI, K. TCTP promotes glioma cell proliferation in vitro and in vivo via enhanced  $\beta$ -catenin/tcf-4 transcription. **Neuro-oncology**, V. 16, N. 2, P. 217–227, 2014.

GUILHERMITTI, A.C. Comportamento de filhotes de rato (*Rattus norvegicus*) em um campo aberto na presença e na ausência de animais adultos. 2011. 46 pag. Dissertação (Mestrado em psicobiologia). **Universidade de São Paulo**. São Paulo, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v.100(1), p. 57-70. 2000. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p.646–674, 2011.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**. v.12(1), p. 31-46. 2022. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

HANIF, F.; MUZAFFAR, K.; PERVEEN, K.; MALHI, S.M.; SIMJEE, S.U. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017.

HIYAMA, E.; IEHARA, T.; SUGIMOTO, T.; FUKUZAWA, M.; HAYASHI, Y.; SASAKI, F.; SUGIYAMA, M.; KONDO, S.; YONEDA, A.; YAMAOKA, H.; TAJIRI, T.; AKAZAWA, K.; OHTAKI, M. Effectiveness of screening for neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population-based cohort study. **Lancet**. v.371(9619), p. 1173-80. 2008. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60523-1.

HOXHAJ, G.; MANNING, B.D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nat Rev Cancer**, 20(2), p.74-88, 2020. doi: 10.1038/s41568-019-0216-7.

HSU, Y.C.; CHERN, J.J.; CAI, Y.; LIU, M.; CHOI, K.W. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. **Nature**, v. 445, p. 785–788. 2007.

IACOB, G.; DINCA, E.B. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. **J Med Life**, v. 2, p. 386. 2009.

ILLENDULA, A.; FULTANG, N.; PEETHAMBARAN, B. Retinoic acid induces differentiation in neuroblastoma via ROR1 by modulating retinoic acid response elements. **Oncology Reports**, v. 44, p. 1013-1024. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2023**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Câncer**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 28 abr 2021.

JACOBS, J. R.; CAREY, M. R. Move Over Rotarod, Here Comes RotaWheel. **Neuroscience**, v. 466, p. 258–259. 2021. doi:10.1016/j.neuroscience.2021.05.004

JAGUS, R.; JOSHI, B.; BARBER, G.N. PKR, apoptosis and cancer. **Int J Biochem Cell Biol.** v.31(1), p.123-138. 1999.

JIANG, X.; LU, W.; SHEN, X.; WANG, Q.; LV, J.; LIU, M.; CHENG, F.; ZHAO, Z.; PANG, X. Repurposing sertraline sensitizes non-small cell lung cancer cells to erlotinib by inducing autophagy. **JCI Insight.** v. ;3(11), p.98921. 2018. doi: 10.1172/jci.insight.98921.

JIN, H.; ZHANG, X.; SU, J.; TENG, Y.; REN, H.; YANG, L. RNA interference-mediated knockdown of translationally controlled tumor protein induces apoptosis, and inhibits growth and invasion in glioma cells. **Mol Med Rep.** v. 12(5), p. 6617-6625. 2015. doi: 10.3892/mmr.2015.4280.

JIN, Z.; LU, Y.; WU, Y.; CHE, J.; DONG, X. Development of differentiation modulators and targeted agents for treating neuroblastoma. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 207, p.112818. 2020.

JOHNSEN, J.I.; DYBERG, C.; WICKSTRÖM, M. Neuroblastoma—a neural crest derived embryonal malignancy. **Front Mol Neurosci.** v. 12, p.9. 2019.

JOVČEVSKA, I.; KOČEVAR, N.; KOMEL, R. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? **Mol Clin Oncol.** v.1(6), p.935-941. 2013.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. 2 ed. São Paulo, **Artmed**, 2004.

KAPOOR, A.; IQBAL, M.; PETROPOULOS, S.; HO, H.L.; GIBB, W.; MATTHEWS, S.G. Effects of sertraline and fluoxetine on p-glycoprotein at barrier sites: in vivo and in vitro approaches. **PLoS One.** v. 8(2), p. 56525. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0056525.

KARACHI, A.; DASTMALCHI, F.; MITCHELL, D.A.; RAHMAN, M. Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. **Neuro Oncol.** v. 20(12), p.1566-1572. 2018.

KARAKI, S.; BENIZRI, S.; MEJÍAS, R.; BAYLOT, V.; BRANGER, N.; NGUYEN, T.; VIALET, B.; OUMZIL, K.; BARTHÉLÉMY, P.; ROCCHI, P. Lipid-oligonucleotide conjugates improve cellular uptake and efficiency of TCTP-

antisense in castration-resistant prostate cancer. **J Control Release**. v.258, p.1-9. 2017.

KASHIWAKURA, J.I.; ANDO, T.; MATSUMOTO, K.; KIMURA, M.; KITaura, J.; MATHO, M.H.; ZAJONC, D.M.; OZEKI, T.; RA, C.; MACDONALD, S.M.; SIRAGANIAN, R.P.; BROIDE, D.H.; KAWAKAMI, Y.; KAWAKAMI, T. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. **J. Clin. Invest.** v.122, p. 218–228. 2012.

KAZMI, F.; SOON, Y.Y.; LEONG, Y.H.; KOH, W.Y.; VELLAYAPPAN, B. Reirradiation for recurrent glioblastoma (GBM): a systematic review and meta-analysis. **J Neurooncol**. v. 142(1), p.79-90. 2019. doi: 10.1007/s11060-018-03064-0.

KOBAYASHI, D.; TOKUDA, T.; SATO, K.; OKANISHI, H.; NAGAYAMA, M.; HIRAYAMA-KUROGI, M.; OHTSUKI, S.; ARAKI, N. Identification of a Specific Translational Machinery via TCTP-EF1A2 Interaction Regulating NF1-associated Tumor Growth by Affinity Purification and Data-independent Mass Spectrometry Acquisition (AP-DIA). **Mol Cell Proteomics**, 18(2):245-262. 2019. doi: 10.1074/mcp.RA118.001014.

KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in Molecular Biology**. v. 1078, p. 9-21. 2013.

KOZIOL, M.J.; GURDON, J.B. TCTP in Development and Cancer. **Biochemistry Research International**, v. 2012, 9 pages, 2012.

KURITA, J.I.; HIRAO, Y.; NAKANO, H.; FUKUNISHI, Y.; NISHIMURA, Y. Sertraline, chlorprothixene, and chlorpromazine characteristically interact with the REST-binding site of the corepressor mSin3, showing medulloblastoma cell growth inhibitory activities. **Sci Rep**. v. 8, p.13763. 2018.

LATHIA, J.D.; MACK, S.C.; MULKEARNS-HUBERT, E.E.; VALENTIM, C.L.; RICH, J.N. Cancer stem cells in glioblastoma. **Genes Dev**, 29(12):1203-1217. 2015. <https://doi.org/10.1101/gad.261982.115>.



LEE, J.H.; RHO, S.B.; PARK, S.Y.; CHUN, T. Interaction between fortilin and transforming growth factor-beta stimulated clone-22 (TSC-22) prevents apoptosis via the destabilization of TSC-22. **FEBS Lett.** v.582(8), p.1210-1218. 2008. doi: 10.1016/j.febslet.2008.01.066.

LEFRANC, F.; KISS, R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. **Neoplasia.** v.10, p.198-206. 2008.

LENS, S. M. A.; VOEST, E. E.; MEDEMA, R. H. Shared and separate functions of in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, p. 825-841, 2010.

LESPAGNOL, A.; DUFLAUT, D.; BEEKMAN, C.; BLANC, L.; FIUCCI, G.; MARINE, J.C.; VIDAL, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. **Cell Death and Differentiation.** v.11, p. 1723-1733. 2008.

LEVKOVITZ, Y.; GIL-AD, I.; ZELDICH, E.; DAYAG, M.; WEIZMAN, A. Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines. **J Mol Neurosci**, v. 27, p. 29- 42. 2005.

LI, F.; ZHANG, D.; FUJISE, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **J Biol Chem.** v. 276(50), p. 47542–47549. 2001.

LIU, H.; PENG, H. W.; CHENG, Y. S.; YUAN, H. S.; YANG-YEN, H. F. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. **Mol. Cell. Biol.** v.25, p. 3117–3126. 2005.

LIU, W.; LIU, Q.; ZHANG, B.; LIN, Z.; LI, X.; YANG, X.; PU, M.; ZOU, R.; HE, Z.; WANG, F.; DOU, K. the mrna of tctp functions as a sponge to maintain homeostasis of tctp protein levels in hepatocellular carcinoma. **Cell death and disease**, n. 11, v. 11, p. 94, 2020.

LONDON, W.B.; CASTEL, V.; MONCLAIR, T.; AMBROS, P.F.; PEARSON, A.D.; COHN, S.L.; BERTHOLD, F.; NAKAGAWARA, A.; LADENSTEIN, R.L.; IEHARA, T.; MATTHAY, K.K. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk

Group project. *J Clin Oncol.* v. 29(24), p. 3286-3292. 2011. doi: 10.1200/JCO.2010.34.3392.

LUCIBELLO, M.; ADANTI, S.; ANTELM, E.; DEZI, D.; CIAFRE, S.; CARCANGIU, M.L.; ZONFRILLO, M.; NICOTERA, G.; SICA, L.; BRAUD, F.; PIERIMARCHI, P. Phospho-TCTP as a therapeutic target of dihydroartemisinin for aggressive breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, p. 5275–5291, 2015.

LUEPTOW, L.M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **J Vis Exp.** v.30, p. 55718. 2017. doi: 10.3791/55718.

LUKAS, R.V.; WAINWRIGHT, D.A.; LADOMERSKY, E.; SACHDEV, S.; SONABEND, A.M.; STUPP, R. Newly Diagnosed Glioblastoma: A Review on Clinical Management. **Oncology.** v.33(3), p.91-100. 2019.

MA, Q.; GENG, Y.; XU, W.; WU, Y.; HE, F.; SHU, W.; HUANG, M.; DU, H.; LI, M. The role of translationally controlled tumor protein in tumor growth and metastasis of colon adenocarcinoma cells. **Journal of Proteome Research.** v.9, p.40–49, 2010.

MACDONALD, S.M.; RAFNAR, T.; LANGDON, J.; LICHTENSTEIN, L.M. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. **Science**, v. 269, p. 688–690. 1995.

MANSOORI, B.; MOHAMMADI, A.; DAVUDIAN, S.; SHIRJANG, S.; BARADARAN, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Adv Pharm Bull.** v. 7(3), p.339-348. 2017.

MATTHAY, K.K.; MARIS, J.M.; SCHLEIERMACHER, G.; NAKAGAWARA, A.; MACKALL, C.L.; DILLER, L.; WEISS, W.A. Neuroblastoma. **Nat Rev Dis Primers.** v.2, p.16078. 2016.

MIAO, X.; CHEN, Y.B.; XU, S.L.; ZHAO, T.; LIU, J.Y.; LI, Y.R.; WANG, J.; GUO, G.Z. TCTP overexpression is associated with the development and progression of glioma. **Tumour Biol.** v. 34, p.3357-3361. 2013.

MISHRA, D. K.; MILLER, R.A.; PENCE, K.A.; KIM, M.P. Small cell and non small

cell lung cancer form metastasis on cellular 4d lung model. **BMC Cancer**, v.18, p. 1–9, 2018.

MLAKAR, S.; LOPEZ, G.; MARIS, J.M.; ANSARI, M.; GUMY-PAUSE, F. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. **Mol Cancer**. v.16(1), p.114. 2017.

MONCLAIR, T.; BRODEUR, G.M.; AMBROS, P.F.; BRISSE, H.J.; CECCHETTO, G.; HOLMES, K.; KANEKO, M.; LONDON, W.B.; MATTHAY, K.K.; NUCHTERN, J.G.; VON SCHWEINITZ, D.; SIMON, T.; COHN, S.L.; PEARSON, A.D. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. **J Clin Oncol**. v.27(2), p.298-303. 2009.

MOORE, T.J.; MATTISON, D.R. Adult Utilization of Psychiatric Drugs and Differences by Sex, Age, and Race. **JAMA Intern Med**, v. 177, p. 274-275, 2017.

MRUGALA, M.M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. **Discov Med**. v.83, p. 221-230. 2013.

MU, Z.; WEI, W.; FAIR, B.; MIAO, J.; ZHU, P.; LI, Y.I. The impact of cell type and context-dependent regulatory variants on human immune traits. **Genome Biol**. v.22(1), p.122. 2021. doi: 10.1186/s13059-021-02334-x.

NASCIMENTO, T.G.F. da C. **Indução da morte celular em Neuroblastoma: Investigação da ação da saliva bruta do carrapato *Amblyomma sculptum***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, p. 79. 2018.

NAKAGAWARA, A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. **Cancer Letters**, v.169, p.107-114. 2001.

NEMANI, M.; LINARES-CRUZ, G.; BRUZZONI-GIOVANELLI, H.; ROPERCH, J.P.; TUYNDER, M.; BOUGUELERET, L.; CHERIF, D.; MEDHIOUB, M.; PASTURAUD, P.; ALVARO, V.; DER SARKISSAN, H.; CAZES, L.; LE PASLIER, D.; LE GALL, I.; ISRAELI, D.; DAUSSET, J.; SIGAUX, F.; CHUMAKOV, I.; OREN, M.; CALVO, F.; AMSON, R.B.; COHEN, D.; TELERMAN, A. Activation of the human homologue of the *Drosophila* sina gene in apoptosis and tumor

suppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 9039-9042. 1996.

OIKAWA, K.; OHBAYASHI, T.; MIMURA, J.; FUJII-KURIYAMA, Y.; TESHIMA, S.; ROKUTAN, K.; MUKAI, K.; KURODA, M. Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor. **Biochem Biophys Res Commun**. v.290, p.984–987. 2002.

OSBORN, A.G.; LOUIS, D.N.; POUSSAINT, T.Y.; LINSKOTT, L.L.; SALZMAN, K.L. The 2021 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: What Neuroradiologists Need to Know. **American Journal of Neuroradiology**, v. 43(7), p.928-937. 2022.

OSOBA, D.; BRADA, M.; PRADOS, M.D.; YUNG, W.K. Effect of disease burden on health-related quality of life in patients with malignant gliomas. **Neuro Oncol**. v. 2(4), p.221-228. 2000. doi: 10.1093/neuonc/2.4.221.

PAPAC, R.J. Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. **In Vivo**. v. 12(6), p.571-578. 1998.

PARK, J. R.; KREISSMAN, S.G.; LONDON, W.B.; NARANJO, A.; COHN, S.L.; HOGARTY, M.D.; TENNEY, S.C.; HAAS-KOGAN, D.; SHAW, P.J.; KRAVEKA, J.M.; ROBERTS, S.S.; GEIGER, J.D.; DOSKI, J.J.; VOSS, S.D.; MARIS, J.M.; GRUPP, S.A.; DILLER, L. Effect of Tandem Autologous Stem Cell Transplant vs Single Transplant on Event-Free Survival in Patients With High-Risk Neuroblastoma: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**. p. 746-755. 2019.

PENG, Q.; MASUDA, N.; JIANG, M.; LI, Q.; ZHAO, M.; ROSS, C.A.; DUAN, W. The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. **Exp Neurol**, v.210(1), p.154-163. 2008.

PIERCE, G.B.; DIXON, F.J. Jr. Testicular teratomas. I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential cells. **Cancer**. v.12(3), p.573-583. 1959.

PINTO, N.R.; APPLEBAUM, M.A.; VOLCHENBOUM, S.L.; MATTHAY, K.K.; LONDON, W.B.; AMBROS, P.F.; NAKAGAWARA, A.; BERTHOLD, F.; SCHLEIERMACHER, G.; PARK, J.R.; VALTEAU-COUANET, D.; PEARSON, A.D.; COHN, S.L. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. **J Clin Oncol.** v.33(27), p.3008-3017. 2015. doi: 10.1200/JCO.2014.59.4648.

POLLACK, R.E.; GREEN, H.; TODARO, G.J. Growth control in cultured cells: selection of sublines with increased sensitivity to contact inhibition and decreased tumor-producing ability. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 60, p.126–133. 1968.

POWERS, S.; POLLACK, R.E. Inducing stable reversion to achieve cancer control. **Nat Rev Cancer**, v.16, p.266-70, 2016.

PRATT, L.A.; BRODY, D.J.; GU, Q. Antidepressant use in persons aged 12 and over: United States, 2005-2008. **NCHS Data Brief.** v.76, p.1-8. 2011.

PREUSSER, M.; DE RIBAUPIERRE, S.; WÖHRER, A.; ERRIDGE, S.C.; HEGI, M.; WELLER, M.; STUPP, R. Current concepts and management of glioblastoma. **Ann Neurol.** v.70(1), p.9-21. 2011. doi: 10.1002/ana.22425.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.463, p. 03-33, 2003. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01272-x.

RAMANI, P.; SOWA-AVUGRAH, E.; MAY, M. T. High proliferation index, as determined by immunohistochemical expression of aurora kinase b and geminin, indicates poor prognosis in neuroblastomas. **Virchows archiv**, v. 467, n. 3, p. 319–327, 2015.

REN, J.; MAO, X.; CHEN, M.; ZHANG, W.; LIU, Y.; DUAN, C.; ZHANG, H.; SUN, C.; WU, W.; ZHU, X.; GE, J.; TAO, W.; WANG, Y.; LU, H. TCTP Expression After Rat Spinal Cord Injury: Implications for Astrocyte Proliferation and Migration. **J Mol Neurosci.** v.57(3), p. 366-735. 2015. doi: 10.1007/s12031-015-0628-0.

RHO, S.B.; LEE, J.H.; PARK, M.S.; BYUN, H.J.; KANG, S.; SEO, S.S.; KIM, J.Y.; PARK, S.Y. Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. **FEBS Lett**, v. 585, p. 29-35, 2011.

ROPERCH, J.P.; ALVARO, V.; PRIEUR, S.; TUYNDER, M.; NEMANI, M.; LETHROSNE, F.; PIOUFFRE, L.; GENDRON, M.C.; ISRAELI, D.; DAUSSET, J.; OREN, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression. **Nature Medicine**, v. 4, p. 835-838. 1998.

SALLMON, H.; HOENE, V.; WEBER, S.C.; DAME, C. Differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells by all-trans retinoic acid activates the interleukin-18 system. **J Interferon Cytokine Res.** v.30(2), p.55-58. 2010. doi: 10.1089/jir.2009.0036.

SCHMIDT, L.; KLING, T.; MONSEFI, N.; OLSSON, M.; HANSSON, C.; BASKARAN, S.; LUNDGREN, B.; MARTENS, U.; HÄGGBLAD, M.; WESTERMARK, B.; FORSBERG-NILSSON, K.; UHRBOM, L.; KARLSSON-LINDAHL, L.; GERLEE, P.; NELANDER, S. Comparative drug pair screening across multiple glioblastoma cell lines reveals novel drug-drug interactions. **Neuro Oncol**, v.15(11), p.1469-1478. 2013. doi: 10.1093/neuonc/not111.

SEIBENHENER, M.L.; WOOTEN, M.C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **J Vis Exp.** v.96, p.52434. 2015. doi: 10.3791/52434.

SEO, E.J.; EFFERTH, T. Interaction of antihistaminic drugs with human translationally controlled tumor protein (TCTP) as novel approach for differentiation therapy. **Oncotarget.** v.7(13), p.16818-16839. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.7605.

SHARMA, N.; JAMWAL, S.; KUMAR, P. Beneficial effect of antidepressants against rotenone induced Parkinsonism like symptoms in rats. **Pathophysiology**, v.23(2), p.123-134. 2016.

SHERROD, B.A.; GAMBOA, N.T.; WILKERSON, C.; WILDE, H.; AZAB, M.A.; KARSY, M.; JENSEN, R.L.; MENACHO, S.T. Effect of patient age on

glioblastoma perioperative treatment costs: a value driven outcome database analysis. **J Neurooncol.** v.143(3), p.465-473. 2019. doi: 10.1007/s11060-019-03178-z.

SHIMADA, H.; CHATTEN, J.; NEWTON, W.A.; SACHS, N.; HAMOUDI, A.B.; CHIBA, T.; MARSDEN, H.B.; MISUGI, K. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. **J Natl Cancer Inst.** v.73(2), p. 405-416. 1984. doi: 10.1093/jnci/73.2.405.

SHIN, D.; CHO, K.H. Critical transition and reversion of tumorigenesis. **Exp Mol Med**, 55(4):692-705. 2023. doi: 10.1038/s12276-023-00969-3.

SINHA, P.; KOHL, S.; FISCHER, J.; HUTTER, G.; KERN, M.; KOTTGEN, E.; DIETEL, M.; LAGE, H.; SCHNOLZER, M.; SCHADENDORF, D. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.21(14), p. 3048–3057. 2000.

SMITH, Z. D.; SINDHU, C.; MEISSNER, A. Reprogramming and development. **Nature publishing group**, v. 17, p. 139–154, 2016.

SMITH, V.; FOSTER, J. High-risk neuroblastoma treatment review. **Children** (Basel, Switzerland). v.5(9), p.114. 2018. doi: 10.3390/children5090114.

SOLANKI, C.; SADANA, D.; ARIMAPPAMAGAN, A.; RAO, K.V.L.N.; RAJESWARAN, J.; SUBBAKRISHNA, D.K.; SANTOSH, V.; PANDEY, P. Impairments in Quality of Life and Cognitive Functions in Long-term Survivors of Glioblastoma. **J Neurosci Rural Pract.** v.8(2), p.228-235. 2017. doi: 10.4103/0976-3147.203829.

STAPLETON, H.; KIRKHAM, M.; THOMAS, G. Qualitative study of evidence based leaflets in maternity care. **BMJ**, v.324(7338), p.639. 2002. doi: 10.1136/bmj.324.7338.639.

STEEGMAIER, M.; HOFFMANN, M.; BAUM, A.; LÉNÁRT, P.; PETRONCZKI, M.; KRSSÁK, M.; GÜRTLER, U.; GARIN-CHESA, P.; LIEB, S.; QUANT, J.;

GRAUERT, M.; ADOLF, G.R.; KRAUT, N.; PETERS, J.M.; RETTIG, W.J. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. **Curr Biol**, v. 17, p. 316–322, 2007.

STRAWN, J. R.; GERACIOTI, L.; RAJDEV, N. Pharmacotherapy for generalized anxiety disorder in adult and pediatric patients: an evidence-based treatment review. *Expert Opin Pharmacother.* v. 19, n. 10, p. 1057–1070, 2019.

STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**. v. 6, p. 321–330, 2006.

SUN, R.; LU, X.; GONG, L.; JIN, F. TCTP promotes epithelial–mesenchymal transition in lung adenocarcinoma. **OncoTargets and Therapy**, v.12, p. 1641–1653. 2019.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SUSINI, L.; BESSE, S.; DUFLAUT, D.; LESPAGNOL, A.; BEEKMAN, C.; FIUCCI, G.; ATKINSON, A.R.; BUSO, D.; POUSSIN, P.; MARINE, J.C.; MARTINOU, J.C.; CAVARELLI, J.; MORAS, D.; AMSON, R.; TELERMAN, A. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 1211-1220. 2008.

TALER, M.; MIRON, O.; GIL-AD, I.; WEIZMAN, A. Neuroprotective and procognitive effects of sertraline: in vitro and in vivo studies. **Neurosci Letters**, v.550, p.93-97. 2013. doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.033.

TELERMAN, A.; TUYNDER, M.; DUPRESSOIR, T.; ROBAYE, B.; SIGAUX, F.; SHAULIAN, E.; OREN, M.; ROMMELAERE, J.; AMSON R. A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 8702–8706. 1993.



TELERMAN, A.; AMSON, R. The molecular programme of tumour reversion: The steps beyond malignant transformation. **Nat. Rev. Câncer**, v.9, p.206–216. 2009. <https://doi.org/10.1038/nrc2589>.

TELERMAN, A.; AMSON, R.; HENDRIX, M. J. C. Tumor reversion holds promise. **Oncotarget**, v. 1, n. 4, p. 233–234, 2010.

TEPPOLA, H.; SARKANEN, J.R.; JALONEN, T.; LINNE, M.L. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. **Neurochem Res**, v. 41, p.731–747. 2016.

THAW, P.; BAXTER, N.J.; HOUNSLOW, A.M.; PRICE, C.; WALTHO, J.P.; CRAVEN, C.J. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. **Nat. Struct. Biol.** v.8, p. 701–704. 2001.

THÉBAULT, S.; AGEZ, M.; CHI, X.; STOJKO, J.; CURA, V.; TELERMAN, S.B.; MAILLET, L.; GAUTIER, F.; BILLAS-MASSOBRIO, I.; BIRCK, C.; TROFFER-CHARLIER, N.; KARAFIN, T.; HONORÉ, J.; SENFF-RIBEIRO, A.; MONTESSUIT, S.; JOHNSON, C.M.; JUIN, P.; CIANFÉRANI, S.; MARTINOU, J.C.; ANDREWS, D.W.; AMSON, R.; TELERMAN, A.; CAVARELLI, J. TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL. **Sci Rep.** v.27, p.6:19725. 2016.

THIELE, H.; BERGER, M.; SKALWEIT, A.; THIELE, B.J. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled turn out protein (TCTP). **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p.5473– 5481, 2000.

TOH, S.; MITCHELL, A.A.; LOUIK, C.; WERLER, M.M.; CHAMBERS, C.D.; HERNANDEZ-DIAZ, S. Selective serotonin reuptake inhibitor use and risk of gestational hypertension. **Am J Psychiatry**, v. 166, p. 320–328. 2009.

TOLBERT, V.P.; MATTHAY, K.K. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. **Cell Tissue Res.** v.372(2), p.195-209. 2018. doi: 10.1007/s00441-018-2821-2.

TUYNDER, M.; SUSINI, L.; PRIEUR, S.; BESSE, S.; FIUCCI, G.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. **Proc nat acad sci**, v. 99, n. 23, p. 14976–14981, 2002.

TUYNDER, M.; FIUCCI, G.; PRIEUR, S.; LESPAGNOL, A.; GÉANT, A.; BEAUCOURT, S.; DUFLAUT, D.; BESSE, S.; SUSINI, L.; CAVARELLI, J.; MORAS, D.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. **Proc nat acad sci**, v. 101, n. 43, p. 15364–15369, 2004.

TWEDDLE, D.A.; PEARSON, A.D.; HABER, M.; NORRIS, M.D.; XUE, C.; FLEMMING, C.; LUNEC, J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma, **Cancer letters**, v.197, p. 93–98. 2003.

TWIST, C.J.; SCHMIDT, M.L.; NARANJO, A.; LONDON, W.B.; TENNEY, S.C.; MARACHELIAN, A.; SHIMADA, H.; COLLINS, M.H.; ESIASHVILI, N.; ADKINS, E.S.; MATTEI, P.; HANDLER, M.; KATZENSTEIN, H.; ATTIYEH, E.; HOGARTY, M.D.; GASTIER-FOSTER, J.; WAGNER, E.; MATTHAY, K.K.; PARK, J.R.; MARIS, J.M.; COHN, S.L. Maintaining Outstanding Outcomes Using Response- and Biology-Based Therapy for Intermediate-Risk Neuroblastoma: A Report From the Children's Oncology Group Study ANBL0531. **J Clin Oncol**. v.37(34), p.3243-3255. 2019. doi: 10.1200/JCO.19.00919.

TZADOK, S.; BEERY, E.; ISRAELI, M.; UZIEL, O.; LAHAV, M.; FENIG, E.; GIL-AD, I.; WEIZMAN, A.; NORDENBERG, J. In Vitro Novel Combinations of Psychotropics and Anti-Cancer Modalities in U87 Human Glioblastoma Cells. **Int. J. Oncol**. v. 37, p. 1043–1051. 2010.

VALTER, K.; ZHIVOTOVSKY, B.; GOGVADZE, V. Cell death-based treatment of neuroblastoma. **Cell Death Dis**. v.9(2), p.113. 2018.

VAN MAERKEN, T.; RIHANI, A.; DREIDAX, D.; DE CLERCQ, S.; YIGIT, N.; MARINE, J.C.; WESTERMANN, F.; DE PAEPE, A.; VANDESOMPELE, J.; SPELEMAN, F. Functional analysis of the p53 pathway in neuroblastoma cells

using the small-molecule MDM2 antagonist nutlin-3. **Mol Cancer Ther.** v.10(6), p.983-993. 2011. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1090.

VAN MEIR, E.G.; HADJIPANAYIS, C.G.; NORDEN, A.D.; SHU, H.K.; WEN, P.Y.; OLSON, J.J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA Cancer J Clin.** v.60, p.166–193. 2010.

VILLAFUERTE, B.C.; BARATI, M.T.; RANE, M.J.; ISAACS, S.; LI, M.; WILKEY, D.W.; MERCHANT, M.L. Over-expression of insulin-response element binding protein-1 (IRE-BP1) in mouse pancreatic islets increases expression of RACK1 and TCTP; beta cell markers of high glucose sensitivity. **Biochim Biophys Acta,** v. 1865, p. 186–194. 2017.

WANG, C.; VEGNA, S.; JIN, H.; BENEDICT, B.; LIEFTINK, C.; RAMIREZ, C.; DE OLIVEIRA, R.L.; MORRIS, B.; GADIOT, J.; WANG, W.; DU CHATINIER, A.; WANG, L.; GAO, D.; EVERS, B.; JIN, G.; XUE, Z.; SCHEPERS, A.; JOCHEMS, F.; SANCHEZ, A.M.; MAINARDI, S.; TE RIELE, H.; BEIJERSBERGEN, R.L.; QIN, W.; AKKARI, L.; BERNARDS, R. Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer. **Nature.** v. 574, p. 268-272, 2019.

WEAVER, V.M.; PETERSEN, O.W.; WANG, F.; LARABELL, C.A.; BRIAND, P.; DAMSKY, C.; BISSELL, M.J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. **J Cell Biol.** v.137(1), p.231-245. 1997.

WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B.E.; JAENISCH, R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature,** v. 448, p. 318–324 .2007. doi: 10.1038/nature05944.

WERNLI, K.J.; HAMPTON, J.M.; TRENTAM-DIETZ, A.; NEWCOMB, P.A. Antidepressant medication use and breast cancer risk. **Pharmacoepidemiol Drug Saf,** v.18, p. 284–290. 2009.

WESTERLUND, I.; SHI, Y.; TOSKAS, K.; FELL, S.M.; LI, S.; SUROVA, O.; SÖDERSTEN, E.; KOGNER, P.; NYMAN, U.; SCHLISIO, S.; HOLMBERG, J. Combined epigenetic and differentiation-based treatment inhibits neuroblastoma

tumor growth and links HIF2 $\alpha$  to tumor suppression. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.114(30), p.E6137-E6146. 2017. doi: 10.1073/pnas.1700655114.

WICK, W.; OSSWALD, M.; WICK, A.; WINKLER, F. Treatment of glioblastoma in adults. **Ther Adv Neurol Disord**. 11:1756286418790452. 2018. doi: 10.1177/1756286418790452.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). Acesso em: 30 mar 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**, 03 mar. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 08 abr 2021.

WURTH, R.; PATTAROZZI, A.; GATTI, M.; BAJETTO, A.; CORSARO, A.; PARODI, A.; SIRITO, R.; MASSOLLO, M.; MARINI, C.; ZONA, G.; FENOGLIO, D.; SAMBUCETI, G.; FILACI, G.; DAGA, A.; BARBIERI, F.; FLORIO, T. Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt. **Cell Cycle**. v. 12, p.145-156. 2013.

XIA, Z.; BERGSTRAND, A.; DEPIERRE, J.W.; NÄSSBERGER, L. The antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram induce apoptosis in human acute myeloid leukemia HL-60 cells via caspase-3 activation. **J Biochem Mol Toxicol**, v.13, p. 338-347. 1999.

XIA, D.; ZHANG, Y.T.; XU, G.P.; YAN, W.W.; PAN, X.R.; TONG, J.H. Sertraline exerts its antitumor functions through both apoptosis and autophagy pathways in acute myeloid leukemia cells. **Leuk lymphoma**, v. 58, p. 01-10, 2017.

XIAO, B.; CHEN, D.; LUO, S.; HAO, W.; JING, F.; LIU, T.; WANG, S.; GENG, Y.; LI, L.; XU, W.; ZHANG, Y.; LIAO, X.; ZUO, D.; WU, Y.; LI, M.; MA, Q. Extracellular translationally controlled tumor protein promotes colorectal cancer invasion and metastasis through Cdc42/JNK/ MMP9 signaling. **Oncotarget**. v.7(31), p.50057-50073. 2016.

XU, A.; BELLAMY, A.R.; TAYLOR, J.A. Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. **Biochem J.** v.342, p.683-689. 1999.

XU, W.; TAMIM, H.; SHAPIRO, S.; STANG, M.R.; COLLET, J.P. Use of antidepressants and risk of colorectal cancer: a nested case-control study. **Lancet Oncol**, v. 02, p. 301–308, 2006.

YANG, Y.; YANG, F.; XIONG, Z.; YAN, Y.; WANG, X.; NISHINO, M.; MIRKOVIC, D.; NGUYEN, J.; WANG, H.; YANG, X.F. An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. **Oncogene.** v.24(30), p.4778-4788. 2005. doi: 10.1038/sj.onc.1208666.

YARM, F.R. Plk phosphorylation regulates the microtubule- stabilizing protein TCTP. **Molecular and Cellular Biology.** v. 22. p. 6209–6221. 2002.

ZHANG, D.; LI, F.; WEIDNER, D.; MNJOYAN, Z. H.; FUJISE, K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. **J. Biol. Chem.** v.277, p. 37430–37438. 2002.

ZHANG, I.; KNISELY, J.P. Tumor-Treating Fields-A Fundamental Change in Locoregional Management for Glioblastoma. **JAMA Oncol.** v.2(6), p.813-814. 2016. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0081.

ZHANG, F.; MA, Q.; XU, Z.; LIANG, H.; LI, H.; YE, Y.; XIANG, S.; ZHANG, Y.; JIANG, L.; HU, Y.; WANG, Z.; WANG, X.; ZHANG, Y.; GONG, W.; LIU, Y. Dihydroartemisinin inhibits TCTP-dependent metastasis in gallbladder cancer. **J Exp Clin Cancer Res.** v.36(1), p.68. 2017. doi: 10.1186/s13046-017-0531-3.

ZINNAH, K.M.A.; SEOL, J.W.; PARK, S.Y. Inhibition of autophagy flux by sertraline attenuates TRAIL resistance in lung cancer via death receptor 5 upregulation. **Int J Mol Med,** v.46(2), p. 795-805, 2020. doi: 10.3892/ijmm.2020.4635.

ZOU, Y.F.; MENG, L.B.; HE, Z.K.; HU, C. H.; SHAN, M.J.; WANG, D.Y.; YU, X. Screening and authentication of molecular markers in malignant glioblastoma based on gene expression. **Oncology letters**, v. 18, p.4593-4604, 2019.

## Anexo I- Certificado CEUA/BIO (nº 1460)

29/06/2022 09:43

SEI/UFPR - 4636637 - CEUA/BIO: Certificado



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1460

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.032216/2022-80

**APROVADO/APPROVAL:** 21/06/2022 – R.O. 05/2022

**TÍTULO:** Relevância da proteína TCTP em tumores humanos.

**TITLE:** Relevance of TCTP protein in human tumors.

**AUTORES/AUTHORS:** Luiza Helena Gremski, Antonielle Beatriz Baldissera, Hanna Cátara da Justa, Nayanne Louise Costacurta Polli, Andreu Senff Ribeiro.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Biologia Celular

Profa. Dra. Janaina Menezes Zanoveli  
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, Institucional**, em 22/06/2022, às 16:17, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **JANAINA MENEZES ZANOVELLI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 24/06/2022, às 09:04, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](http://seu.sei.ufpr.br) informando o código verificador **4636637** e o código CRC **46E8A03**.

## Anexo II- Certificado CEUA/BIO (nº 1296)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1296

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

**STATEMENT**

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO - UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.041588/2019-00

**APROVADO/APPROVAL:** 20/08/2019 - R.O. 07/2019

**TÍTULO:** Neuroproteção induzida por diferentes intervenções em animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.

**TITLE:** Neuroprotection induced by different interventions in animals exposed to an experimental model of glioblastoma.

**AUTORES/AUTHORS:** Luiz Cláudio Fernandes, Amanda Krüger Costa, Ricardo Aurino Pinho, Bruna Aparecida Comotti de Oliveira, Stephanie Rubianne Silva Carvahal, Eduardo Del Bosco Brunetti Cunha, Bruna Berto Gattiboni, Felipe da Silva Dezdério, Luis Felipe Beltrão Marqueze, Andrea Senff Ribeiro.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Fisiologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko  
**Coordenadora da CEUA**



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 17/09/2019, às 17:41, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KATYA NALIWAIKO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/09/2019, às 17:31, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2136327** e o código CRC **3D9F86DD**.

Scanned with CamSci