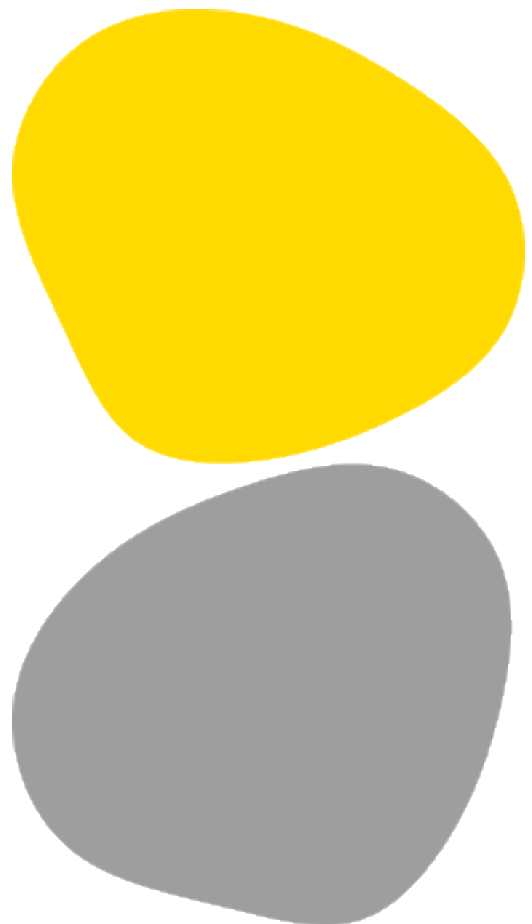




Estudo do efeito de compostos derivados dos naftóis em processos neoplásicos - migração, apoptose e ciclo celular

Alexandra Magalhães Fernandes





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



**Estudo do efeito de compostos derivados dos naftóis em processos neoplásicos – migração,
apoptose e ciclo celular**

Autor

Alexandra Magalhães Fernandes

Orientadores

Prof. Doutora Sílvia Fernandes, TBIO/RISE-Health, ESS-IPP

Prof. Doutora Mónica Vieira, TBIO/RISE-Health, ESS-IPP

*Dissertação de Estágio apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde** – Ramo/Área de Especialização em **Bioquímica Clínica e Metabólica** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.*



Agradecimentos

O presente trabalho não seria possível de realizar sem a ajuda de outras pessoas, que de forma direta ou indireta, prestaram o seu contributo para a elaboração do mesmo.

Gostaria de começar por agradecer à Professora Doutora Sílvia Fernandes por me ter aceite como sua orientanda e por todo o tempo, acompanhamento e ajuda disponibilizada ao longo deste projeto.

Agradeço também à Professora Doutora Mónica Vieira pela orientação neste projeto, assim como todo o apoio prestado ao longo dos 2 anos de mestrado.

Um agradecimento particular à Professora Doutora Cassilda Pereira, à Professora Doutora Rosário Martins e ao Professor Doutor Pedro Coelho pela constante disponibilidade, ajuda e partilha generosa de conhecimentos que sempre me prestaram quando precisei.

Agradeço a todas as pessoas com quem partilhei o laboratório, com um agradecimento especial à Lara Azevedo, Cristiana Ramos e Cláudia Coutinho, pela amizade, apoio e entrega ao longo deste ano.

Agradeço igualmente a todos os meus colegas de turma, pelo companheirismo e amizade criada ao longo destes dois anos.

Por fim, mas de forma alguma menos importantes, agradeço a toda a minha família e amigos, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem incondicionalmente. Um agradecimento especial aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio constante, pelos conselhos e pelo suporte ao longo de toda a minha vida. Foi difícil, mas sem vocês este percurso teria sido impossível.

O meu sincero e genuíno obrigado a todos!!



Resumo

O glioblastoma (GB) é o tumor cerebral maligno primário mais frequente e agressivo do sistema nervoso central, caracterizado por elevada heterogeneidade, comportamento invasivo e resistência às terapias convencionais. Estas limitações evidenciam a necessidade urgente de identificar novas moléculas com potencial terapêutico. Neste contexto, o presente trabalho avaliou os efeitos biológicos de dois isómeros acetilados do naftol, o 1-acetil-2-naftol e o 2-acetil-1-naftol, em células do glioblastoma humano (U251MG).

Foram realizados ensaios de viabilidade celular pelo ensaio de MTT, de migração celular pelo ensaio de *wound healing* e a análise de apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo. O 1-acetil-2-naftol apresentou maior citotoxicidade em células não tumorais (3T3-L1) do que em tumorais, limitando o seu interesse como candidato antitumoral. Em contraste, o 2-acetil-1-naftol exibiu um perfil mais promissor, com redução significativa da viabilidade das células U251MG de forma dependente da concentração e do tempo de exposição. Adicionalmente, demonstrou inibição transitória da migração celular, sobretudo em fases iniciais, e seletividade relativa em relação às células não tumorais. Contudo, após 24 horas, não foram observadas alterações relevantes na indução de apoptose clássica nem no ciclo celular, sugerindo que o efeito do composto poderá depender de mecanismos alternativos ou de tempos de exposição mais prolongados.

Em conjunto, os resultados apontam o 2-acetil-1-naftol como uma molécula de interesse preliminar no contexto do glioblastoma, reforçando que pequenas modificações estruturais podem redefinir seletividade e mecanismos de ação.

Palavras-chave: Glioblastoma; Derivados de naftaleno; Terapias anticancerígenas



Abstract

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive primary malignant brain tumor of the central nervous system, characterized by high heterogeneity, invasive behavior, and resistance to conventional therapies. These limitations highlight the urgent need to identify new molecules with therapeutic potential. In this context, the present work evaluated the biological effects of two acetylated naphthol isomers, 1-acetyl-2-naphthol and 2-acetyl-1-naphthol, in human glioblastoma cells (U251MG).

Cell viability through the MTT assay, migration via wound healing assay, and apoptosis and cell cycle analyses by flow cytometry were performed. 1-acetyl-2-naphthol exhibited higher cytotoxicity in non-tumor cells (3T3-L1) than in tumor cells, limiting its relevance as an antitumor candidate. In contrast, 2-acetyl-1-naphthol displayed a more promising profile, with a significant reduction in U251MG cell viability in a concentration and time dependent manner. Additionally, it demonstrated transient inhibition of cell migration, particularly at early stages, and relative selectivity toward non-tumor cells. However, after 24 hours, no relevant changes were observed in classical apoptosis or cell cycle progression, suggesting that the compound's effects may rely on alternative mechanisms or require longer exposure times.

Overall, the findings identify 2-acetyl-1-naphthol as a preliminary molecule of interest in the glioblastoma context, reinforcing that minimal structural modification, such as acetyl group positioning, can redefine selectivity and mechanisms of action.

Keywords: Glioblastoma; Naphthalene derivatives; Anticancer therapies



Índice

1. Introdução	1
1.1. Glioblastoma	1
1.2. Perfil Migratório e Invasivo	3
1.3. Tratamento.....	5
1.4. Alternativas Terapêuticas.....	8
2. Objetivo.....	10
3. Métodos.....	11
3.1. Linhas Celulares.....	11
3.2. Manutenção e Criopreservação de Linhas Celulares	11
3.3. Passagem das Linhas Celulares	11
3.4. Compostos e Preparação de Soluções.....	12
3.5. Ensaio MTT.....	13
3.6. Ensaio <i>Wound healing</i>	13
3.7. Análise da Apoptose e Ciclo Celular por Citometria de Fluxo.....	15
3.7.1. Avaliação da Morte Celular por Apoptose	15
3.7.2. Avaliação do Ciclo Celular	16
3.8. Análise Estatística	16
4. Resultados	17
4.1. Ensaio MTT.....	17
4.2. Ensaio <i>Wound healing</i>	19
4.3. Avaliação da Morte Celular por Apoptose.....	20
4.4. Avaliação do Ciclo Celular	22
5. Discussão.....	24
6. Conclusão	30
Referências Bibliográficas	31

Índice de Figuras

- Figura 1: Estruturas químicas de compostos derivados do naftaleno. (A) Derivado de naftalimida. (B) Plumbagina, uma naftoquinona natural. (C) 1-acetil-2-naftol. (D) 2-acetil-1-naftol.....9
- Figura 2: Exemplo representativo da quantificação da área da ferida no ensaio wound healing. (A) Imagem microscópica do risco imediatamente após indução da ferida. (B) Delimitação da área da ferida no software ImageJ para quantificação ao longo do tempo.....14
- Figura 3: Efeito de 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol na viabilidade celular (ensaio MTT). (A) U251MG e 3T3-L1 expostos a 1-acetil-2-naftol durante 24h. (B) U251MG e 3T3-L1 expostos a 1-acetil-2-naftol durante 48h. (C) U251MG e 3T3-L1 expostos a 2-acetil-1-naftol durante 24h. (D) U251MG e 3T3-L1 expostos a 2-acetil-1-naftol durante 48h. C (controlo) representa células não tratadas. Resultados apresentados como média \pm SEM. (*) $p < 0,05$ em relação ao controlo (U251MG); (#) $p < 0,05$ em relação ao controlo (3T3-L1); (●) $p < 0,05$ U251MG vs 3T3-L1.....18
- Figura 4: Ensaio de wound healing em células U251MG tratadas com 2-acetil-1-naftol. Imagens de microscopia obtidas às 0h, 12h e 24h de exposição a 2-acetil-1-naftol nas concentrações (0.1; 1; 5; 10; 25 μ M). C (controlo) representa células não tratadas.....19
- Figura 5: Quantificação da migração celular em ensaio wound healing com células U251MG tratadas com 2-acetil-1-naftol. Representação gráfica da percentagem de área recuperada às 12h, 24h e 48h no C (controlo) e nas diferentes concentrações do composto (0.1; 1; 5; 10; 25 μ M). Resultados apresentados como média \pm SEM. Diferenças estatisticamente significativas vs. Controlo: (*) $p < 0,05$20
- Figura 6: Exemplo representativo de citogramas obtidos por citometria de fluxo: (A) Controlo sem fixação/permeabilização; (B) Células tratadas com 0.1 μ M sem fixação/permeabilização; (C) Controlo fixado e permeabilizado; (D) Células tratadas com 0.1 μ M fixadas e permeabilizado; (D) Células tratadas com 0.1 μ M fixadas e permeabilizadas.....21
- Figura 7: Análise da morte celular total e apoptótica em células U251MG tratadas com 2-acetil-1-naftol por 24h. Representação gráfica da percentagem de morte celular total (barras pretas) e da fração correspondente à morte por apoptose (barras cinzentas) após exposição a 2-acetil-1-naftol nas concentrações (0.1; 1; 5; 10; 25 μ M). C (controlo) representa células não tratadas. Resultados apresentados como média \pm SEM. Diferenças estatisticamente significativas observadas apenas na morte celular total: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$22
- Figura 8: Efeito do 2-acetil-1-naftol no ciclo celular de células U251MG após 24h de exposição. Exemplo representativo de histogramas obtidos no software FlowJo, evidenciando a distribuição das células nas fases G0/G1, S e G2/M: (A) Controlo fixado e permeabilizado; (B) Células tratadas com 0.1 μ M



fixadas e permeabilizadas. (C) Representação gráfica da percentagem de células em cada fase do ciclo celular após tratamento com diferentes concentrações do composto (0.1; 1; 5; 10; 25 μM). C (controlo) representa células não tratadas. Resultados apresentados como média \pm SEM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.23



Lista de Abreviaturas

BHE – Barreira hematoencefálica

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (meio de cultura celular DMEM)

DMSO – Dimetilsulfóxido (*Dimethyl sulfoxide*)

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

EMT – Transição epitelial-mesenquimal (*Epithelial-Mesenchymal Transition*)

FBS – Soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

GB – Glioblastoma

GSCs – Células estaminais do glioblastoma (*Glioblastoma Stem-like Cells*)

HIF-1 α – *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*

MEC – Matriz extracelular

MGMT – O6-metilguanina-DNA metiltransferase (*O6-Methylguanine-DNA-Methyltransferase*)

MRPs – Proteínas de resistência a múltiplos medicamentos (*Multidrug Resistance Proteins*)

MMP – Metaloproteinases da matriz (*Matrix Metalloproteinases*)

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NSCs – Células estaminais neurais (*Neural Stem Cells*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PI – Iodeto de propídio (*Propidium Iodide*)

P/S – Penicilina/Estreptomicina

P-gp – Glicoproteína P (*P-glycoprotein*)

RB – Retinoblastoma

RT – Radioterapia

RTK – Recetores tirosina-quinase

SNC – Sistema Nervoso Central

SVZ – Zona subventricular

TERT – Transcriptase reversa da telomerase (*Telomerase Reverse Transcriptase*)

TME – Microambiente tumoral (*Tumor Microenvironment*)

TMZ – Temozolomida

Transportadores ABC – Transportadores *ATP-Binding Cassette*

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)



1. Introdução

1.1. Glioblastoma

O glioblastoma (GB) é o tumor cerebral maligno primário mais comum e agressivo do sistema nervoso central (SNC), sendo classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um glioma astrocítico difuso de grau 4, o grau mais elevado na escala de malignidade para tumores do SNC (1–3). Este tumor destaca-se pela sua rápida proliferação celular, elevada heterogeneidade celular e molecular, bem como pela capacidade de invadir e infiltrar difusamente os tecidos cerebrais circundantes (1,4). Estas características não só lhe conferem uma elevada resistência às atuais abordagens terapêuticas, como também o tornam uma das neoplasias humanas mais letais e de pior prognóstico (1).

Globalmente, o GB apresenta uma incidência anual estimada entre 3 a 5 casos por 100 000 indivíduos, com maior prevalência em países desenvolvidos, como os do Norte e Centro da Europa, América do Norte e Austrália (4–6). A sua ocorrência é mais frequente em indivíduos do sexo masculino, brancos não hispânicos e em pessoas de ascendência caucasiana (2,5). Embora possa ocorrer em qualquer idade, é predominantemente diagnosticado em idades mais avançadas, com uma idade média de diagnóstico aos 64 anos (2,5,7,8).

Apesar dos avanços científicos no desenvolvimento de tratamentos e técnicas para um diagnóstico precoce, o glioblastoma permanece como um tumor incurável e com prognóstico reservado (9,10). Mesmo com tratamentos agressivos, os doentes apresentam, em 6 meses, uma recidiva precoce da doença (11). Este é um padrão clínico que contribui para que os tempos médios de sobrevivência se limitem a 12–15 meses nos casos tratados e a apenas 3–4 meses nos casos em que não recebem qualquer intervenção terapêutica (4,12,13).

A agressividade e a resistência deste tumor ao tratamento estão intimamente associadas às suas características celulares e moleculares, nomeadamente à origem incerta e à elevada heterogeneidade que apresenta (9). Durante anos, assumiu-se que o GB resultava da transformação maligna de astrócitos maduros (14), no entanto, evidências recentes sugerem que a sua origem poderá residir em células estaminais neurais (NSCs) ou progenitores gliais presentes na zona subventricular (SVZ) do cérebro adulto (10,15–19). Estas células possuem capacidade de autorrenovação, diferenciação e migração, propriedades que lhes conferem uma maior suscetibilidade à acumulação de mutações e à transformação neoplásica (15–19).

Neste contexto, destaca-se um subgrupo celular conhecido como células estaminais do glioblastoma (GSCs), que partilham múltiplas propriedades com as NSCs, incluindo a expressão de marcadores de



pluripotência, elevada capacidade proliferativa e plasticidade fenotípica (15–21). As GSCs têm a capacidade de se diferenciar em várias subpopulações tumorais, contribuindo para a heterogeneidade intra-tumoral do glioblastoma (11,15,17,19). Além disso, interagem ativamente com o microambiente tumoral, modulando componentes celulares e moleculares que favorecem a progressão do tumor (11,17,19). Nos últimos tempos, têm sido amplamente associadas à manutenção tumoral, resistência às terapias convencionais e recorrência precoce, assumindo um papel central na biologia do tumor e constituindo um alvo prioritário para novas estratégias terapêuticas (15–17,20,21).

A acumulação progressiva de mutações genéticas nas NSCs e nas GSCs contribui para a transformação maligna e para a complexidade molecular observada no glioblastoma (22). O seu perfil genético é marcado por alterações recorrentes em genes-chave envolvidos na regulação do ciclo celular, proliferação, apoptose e resposta a estímulos externos. Entre os genes mais frequentemente mutados destacam-se *TP53*, *PTEN*, *EGFR*, *TERT*, *ATRX*, *RB1*, *NF1*, *IDH1*, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *PDGFRA* e *CDKN2A/B* (1,7,8,20,23). Estas mutações afetam profundamente o funcionamento de várias vias de sinalização intracelular, cuja desregulação contribui para a agressividade tumoral. Destas vias, três assumem particular relevância no contexto do GB: a via dos recetores tirosina-quinase (RTK), a via p53 e a via da proteína do retinoblastoma (RB) (1,13,23,24).

A via RTK é a via de sinalização celular mais frequentemente desregulada no glioblastoma. A sua ativação, geralmente induzida por mutações ou amplificações em genes como *EGFR*, *PDGFRA*, *VEGFR* e *MET*, promove a proliferação e sobrevivência celular, potencia a angiogénese e facilita mecanismos de invasão e migração tumoral (1,20,25).

A estas alterações soma-se frequentemente a disfunção da via p53, um dos principais mecanismos celulares de defesa contra a transformação maligna. Em condições normais, a proteína p53 coordena a deteção e reparação de danos no DNA, podendo induzir a paragem do ciclo celular ou a apoptose. No entanto, mutações no gene *TP53*, amplificações de *MDM2* ou perda de *CDKN2A* comprometem esta função, permitindo a acumulação de danos genéticos e a sobrevivência de células geneticamente instáveis (1,7,24–27).

Paralelamente, a via RB assume um papel essencial no controlo do ciclo celular, regulando a transição da fase G1 para a fase S. No glioblastoma, esta via encontra-se frequentemente inativada, sobretudo por mutações no gene *RB1*, deleções de *CDKN2A* ou amplificações de *CDK4* e *CDK6*. A sua desregulação permite que as células avancem no ciclo celular de forma contínua, mesmo na ausência de sinais mitogénicos, promovendo uma proliferação celular descontrolada, que contribui para a rápida expansão tumoral e para o comportamento agressivo característico deste tumor (1,7,24–26).



Estas alterações moleculares têm reflexo direto nas características histopatológicas do glioblastoma, cuja morfologia evidencia a sua natureza altamente agressiva. Histologicamente, observa-se uma população de células pouco diferenciadas, marcada por atipia nuclear, pleomorfismo celular, atividade mitótica frequente, proliferação microvascular e necrose em áreas centrais do tumor (5,11,20,22). Estas características estruturais, quando combinadas com os dados moleculares, tornam-se fundamentais para definir o diagnóstico (5,11).

Assim, com base nas características histopatológicas e moleculares deste tumor, a mais recente classificação da Organização Mundial da Saúde para os tumores do Sistema Nervoso Central, a *WHO CNS5* (2021), estabelece que, em adultos, o glioblastoma deve ser diagnosticado como um glioma astrocítico difuso, *IDH wild-type*, de grau 4, na presença de proliferação microvascular e/ou necrose, ou caso se verifique pelo menos um dos seguintes critérios moleculares: mutação do promotor da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*), amplificação do recetor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) ou ganho do cromossoma 7 acompanhado da perda do cromossoma 10 (+7/-10) (3,7,8,11,19,21,28).

1.2. Perfil Migratório e Invasivo

Entre as diversas características que tornam o glioblastoma uma das neoplasias mais agressivas do SNC, destaca-se a sua capacidade de invadir e infiltrar difusamente o tecido cerebral saudável (29). Ao contrário da maioria dos tumores malignos, o glioblastoma raramente metastiza para fora do SNC, no entanto, distingue-se por apresentar um padrão de disseminação local altamente infiltrativo (30,31). As suas células tumorais migram preferencialmente ao longo de estruturas anatómicas específicas, como vasos sanguíneos, fibras de mielina e espaços perivasculares, o que lhes permite infiltrar-se de forma difusa e não circunscrita pelo parênquima cerebral (29,30,32).

Apesar dos mecanismos subjacentes a este comportamento altamente invasivo e migratório permanecerem em grande parte por esclarecer, evidências recentes têm demonstrado que as interações dinâmicas entre as células tumorais e os diversos componentes do microambiente tumoral (TME), desempenham um papel determinante não apenas na regulação da invasividade e capacidade migratória, mas também, na proliferação e sobrevivência celular (15,30,33).

O TME do glioblastoma é composto por uma variedade de elementos celulares, que inclui células endoteliais, astrócitos, microglia, macrófagos, neurónios e células imunes, assim como por componentes não celulares, como a matriz extracelular (MEC), citocinas, vários fatores de crescimento e condições específicas, como hipoxia e acidose (33,34).



Entre os diversos componentes do microambiente tumoral, a hipoxia, caracterizada pela baixa disponibilidade de oxigénio, destaca-se como um dos principais reguladores da progressão do glioblastoma (30,35). À medida que o tumor cresce de forma rápida e desordenada, o fornecimento de oxigénio pelos vasos sanguíneos torna-se insuficiente, levando à formação de regiões extensas e persistentes de hipoxia no interior do tumor. Em resposta a esta privação de oxigénio, ocorre a ativação do fator de transcrição HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*), que promove a expressão de múltiplos genes envolvidos na adaptação celular, sobrevivência e progressão tumoral (35).

Entre os principais alvos do HIF-1 α encontra-se o *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), um potente indutor da angiogénese (35–37). A angiogénese, processo responsável pela formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente, encontra-se profundamente desregulada no GB, sendo impulsionada principalmente pela expressão aumentada de *VEGF*. A ativação do *VEGF* estimula a proliferação e migração de células endoteliais, conduzindo a formação de vasos neoformados (36,37). Contudo, estes vasos são estruturalmente anómalos e funcionalmente disfuncionais, o que contribui para a manutenção do estado de hipoxia e para a instabilidade do microambiente tumoral. Além disso, a arquitetura irregular destes vasos cria vias adicionais para a migração celular, facilitando ainda mais a disseminação local das células tumorais (34,37).

No entanto, para que essa migração ocorra, é essencial que as células tumorais adquiram propriedades que lhes permitam desprender-se da massa tumoral primária e migrar pelo tecido cerebral (14,38). Um dos primeiros passos neste processo é a perda da adesão célula-célula, frequentemente associada à diminuição da expressão de proteínas de adesão responsáveis pela coesão e integridade celular (38). Um dos principais mecanismos que desencadeiam esta perda de adesão, promovendo, simultaneamente, a aquisição de um fenótipo mais migratório, é a ativação do processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT) (38–41).

Este processo é regulado por várias vias de sinalização, incluindo TGF- β , Wnt/ β -catenina, PI3K/Akt, Notch, RTKs e Hedgehog, que, quando ativadas, promovem a expressão de fatores de transcrição como Snail, Slug, ZEB 1/2, LEF e Twist 1/2. Estes fatores suprimem a expressão de marcadores epiteliais, como E-caderina, claudinas e ocludinas, ao mesmo tempo que induzem a expressão de marcadores mesenquimais, como N-caderina, vimentina e fibronectina, conferindo às células tumorais um fenótipo mais fusiforme, dinâmico, migratório e invasivo (32,42,43).

Com a aquisição de um comportamento migratório, as células tumorais tornam-se progressivamente dependentes de mecanismos que lhes permitam interagir de forma dinâmica e adaptativa com o microambiente tumoral (44,45). Entre os principais mediadores deste processo, destacam-se as



integrinas, proteínas transmembranares que atuam como recetores de adesão celular (46). Estas moléculas desempenham um papel crucial ao promover a ligação entre as células tumorais e os componentes da MEC, funcionando simultaneamente como mediadores de sinalização bidirecional entre o ambiente extracelular e o interior da célula (14,46,47). No contexto do glioblastoma, as integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ revelam-se particularmente relevantes na promoção da migração e invasão tumoral. Este efeito resulta da sua capacidade de potenciar a adesão das células à MEC e de ativar vias de sinalização intracelular, como FAK, Rho-GTPases, Shc/MAP-Kinases e Src Family Kinases (14).

À medida que a ligação célula-matriz se intensifica, a MEC deixa de atuar meramente como suporte estrutural, passando a exercer um papel ativo na modulação da invasividade (34,47). Constituída por colagénio, laminina, fibronectina, proteoglicanos e outras glicoproteínas estruturais, a MEC representa um obstáculo físico e bioquímico à progressão celular, que as células tumorais necessitam de contornar (48,49). Para ultrapassar este obstáculo, as células do GB secretam diversas enzimas proteolíticas, nomeadamente metaloproteinases da matriz (MMP-2, MMP-9 e MMP-14) e catepsinas, que degradam seletivamente os componentes da MEC, criando trajetos que facilitam a sua disseminação local (42,48,49).

Contudo, a invasividade celular não depende apenas da capacidade de interagir com o microambiente externo. Para que o movimento migratório ocorra de forma eficaz, é igualmente essencial que ocorra uma reconfiguração da arquitetura interna da célula (43). Neste contexto, a reorganização dinâmica do citoesqueleto, especialmente dos filamentos de actina, assume um papel determinante (29,38,43,50). Este processo é regulado por pequenas GTPases da família Rho, como RhoA, Rac1 e Cdc42, que coordenam a polimerização e organização da actina, promovendo a formação de estruturas celulares especializadas, como lamelipódios e filopódios (14,51,52). Estas estruturas conferem às células tumorais a plasticidade e motilidade necessárias para contornar as barreiras impostas pelo microambiente e infiltrar o parênquima cerebral circundante (29,52).

1.3. Tratamento

Apesar dos avanços significativos na caracterização molecular e celular do glioblastoma, as opções terapêuticas atualmente disponíveis continuam a apresentar resultados limitados (53–55). O atual padrão de tratamento segue o protocolo estabelecido por *Stupp et al.*, em 2005, baseado numa abordagem multimodal que integra a máxima resseção cirúrgica possível, seguida de radioterapia (RT) e quimioterapia com temozolomida (TMZ) (55–57).



ART tem início logo após a cirurgia, sendo administrada ao longo de seis semanas, com uma dose total de 60 Gy dividida em 30 frações. Em doentes idosos ou clinicamente frágeis, podem ser utilizados regimes hipofracionados, como 40 Gy em 15 frações ou 20 Gy em 5 frações (55,58). Paralelamente à RT, realiza-se a quimioterapia concomitante com TMZ, administrada por via oral na dose diária de 75 mg/m², desde o primeiro até ao último dia de radioterapia. Esta é seguida por uma fase adjuvante, que consiste na administração de TMZ na dose de 150–200 mg/m² por 5 dias consecutivos, repetida a cada 4 semanas, até um máximo de seis ciclos (56,58–60).

Este protocolo permanece, até hoje, como a principal referência terapêutica para doentes com glioblastoma recém-diagnosticados. Os seus principais objetivos são reduzir a carga tumoral, controlar a proliferação celular residual e prolongar o tempo até à recidiva (59). No entanto, mesmo sob este regime intensivo, o tempo médio de sobrevivência global mantém-se limitado a aproximadamente 15 meses, com uma taxa de sobrevivência de cinco anos inferior a 10% (2,22).

As razões para a ineficácia terapêutica são múltiplas e encontram-se profundamente interligadas com as próprias características biológicas do GB. A natureza altamente invasiva e infiltrativa deste tumor impede, na maioria dos casos, a remoção cirúrgica completa (61,62). Embora a cirurgia seja essencial para reduzir a carga tumoral e aliviar sintomas, raramente é curativa (56,63). A infiltração difusa das células tumorais no tecido cerebral saudável dificulta a identificação de limites claros entre o tumor e o parênquima normal, tornando impossível garantir a sua remoção completa (61,64). Além disso, a localização frequente do tumor em áreas importantes do cérebro impõe restrições à extensão da resseção, uma vez que, uma abordagem mais agressiva pode comprometer funções neurológicas vitais (62,64). Por estas razões, mesmo após cirurgias aparentemente bem-sucedidas, a recidiva local é quase inevitável, ocorrendo geralmente poucos meses após a intervenção (65).

A radioterapia, cuja principal função é induzir a morte das células tumorais através de danos no DNA, constitui uma das etapas centrais do atual protocolo terapêutico. No entanto, as células tumorais apresentam uma resistência intrínseca à radioterapia, sustentada por mecanismos de reparação do DNA altamente eficientes, bem como pela capacidade de induzir paragem do ciclo celular e evitar a apoptose. Estes mecanismos permitem às células tumorais corrigir os danos induzidos e escapar à morte celular (60,66,67). Além disso, a radioterapia convencional pode afetar negativamente o tecido cerebral saudável, especialmente em regiões adjacentes ao tumor, levando a risco de toxicidade neurológica e disfunção cognitiva. Esta vulnerabilidade do cérebro impõe limites à dose máxima de radiação que pode ser administrada com segurança, restringindo a possibilidade de intensificar o tratamento (68,69).



Paralelamente, a quimioterapia com TMZ enfrenta também limitações significativas na eficácia clínica. A TMZ, agente alquilante oral, exerce a sua ação citotóxica através da metilação do DNA, particularmente na posição O6 da guanina. Estes danos genotóxicos comprometem a integridade genómica e desencadeiam a morte celular (13,53,60,67). No entanto, a eficácia da TMZ é fortemente condicionada pela expressão da enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), codificada por um gene cujo promotor pode encontrar-se metilado ou não. Em tumores com promotor não metilado, a expressão ativa da MGMT permite reparar eficientemente os danos induzidos pela TMZ, reduzindo significativamente a sua eficácia (4,13,53,67). Para além deste mecanismo, a resistência à quimioterapia é agravada pela sobreexpressão de transportadores de efluxo, como os transportadores ABC, a glicoproteína P (P-gp) e as proteínas de resistência a múltiplos medicamentos (MRPs), que bombeiam os fármacos para fora das células, diminuindo as suas concentrações intracelulares (21,58,67). Além disso, a elevada heterogeneidade tumoral agrava ainda mais esta problemática, uma vez que diferentes regiões do tumor, bem como subpopulações celulares distintas, podem apresentar sensibilidade muito diversas à TMZ (57,67,70).

A todas estas limitações do atual tratamento soma-se ainda a presença da barreira hematoencefálica (BHE), uma estrutura física cujas características estruturais e funcionais dificultam a penetração e a distribuição eficaz de diversos fármacos ao tecido tumoral (13,71,72). A BHE é uma barreira semipermeável altamente seletiva, composta por células endoteliais da microvasculatura cerebral, unidas por junções apertadas e sustentadas por pericitos, astrócitos e membrana basal (71,73,74). A sua principal função é manter a homeostasia do SNC, restringindo a entrada de substâncias potencialmente nocivas, ao mesmo tempo que, permite a passagem de moléculas essenciais (57,58,74-76).

Contudo, essa seletividade, embora seja fundamental para proteger o SNC, constitui um obstáculo significativo à administração de agentes terapêuticos, uma vez que, apenas pequenas moléculas lipofílicas conseguem atravessar a BHE por difusão passiva (57,74,75). Como a maioria dos fármacos oncológicos apresenta características hidrofílicas ou elevada massa molecular, não consegue ultrapassar a barreira de forma eficiente. Compostos com alguma capacidade de passagem, como a TMZ, frequentemente atingem o tecido tumoral em concentrações subterapêuticas, devido à ação dos transportadores de efluxo ativos que os removem do SNC (13,67,73,77).

Adicionalmente, a natureza altamente vascularizada e heterogénea do GB provoca alterações regionais na integridade da BHE, resultando em zonas de permeabilidade variável ao longo do tumor (76). No núcleo tumoral, onde a barreira se encontra frequentemente comprometida, a permeabilidade aumenta, facilitando a entrada de fármacos (67,77). No entanto, estas regiões muitas vezes já se



encontram necróticas ou metabolicamente menos ativas. Já nas zonas periféricas, onde se concentram as células invasivas responsáveis pela progressão e recidiva do tumor, a BHE permanece funcional e intacta, limitando significativamente a penetração e ação dos fármacos (67,72,77).

Em conjunto, estes fatores contribuem para a recidiva precoce e para os resultados clínicos ainda insatisfatórios associados ao tratamento do glioblastoma (67).

1.4. Alternativas Terapêuticas

A ausência de uma terapia eficaz e verdadeiramente promissora para o tratamento do glioblastoma reforça a urgência de se investigar e desenvolver novas abordagens terapêuticas que superem a resistência tumoral, ultrapassem a BHE e proporcionem melhorias significativas na sobrevida e na qualidade de vida dos doentes (9).

Neste contexto, têm vindo a ser exploradas diversas abordagens inovadoras que procuram ultrapassar as limitações das estratégias convencionais. A imunoterapia destaca-se pelo seu potencial em reativar o sistema imunitário contra o tumor, com destaque para os inibidores de *checkpoints* imunológicos, células CAR-T dirigidas a antígenos como *EGFRvIII* ou *IL13R α 2*, e vacinas personalizadas baseadas em neoantígenos tumorais (9,63,75,78,79). Paralelamente, os vírus oncolíticos e as terapias genéticas emergem como alternativas promissoras, utilizando vírus modificados, como o DNX-2401, ou ferramentas como o CRISPR para modular a expressão génica tumoral e potenciar a resposta imune (62,63,75,78). Avanços na nanotecnologia têm igualmente permitido o desenvolvimento de sistemas de entrega inteligentes de medicamentos, como o ultrassom focalizado (FUS) e nanopartículas funcionalizadas (ex.: lipossomas, polímeros, exossomas), capazes de atravessar a BHE e libertar fármacos de forma seletiva no microambiente tumoral (9,21,63,80,81). Além disso, o recurso a terapias combinadas e personalizadas, desenhadas com base no perfil molecular do tumor e ajustadas com recurso a tecnologias como a inteligência artificial, tem surgido como tendência crescente, com o objetivo de adaptar o tratamento às características específicas de cada doente (63,82,83).

A par destas estratégias, a investigação de compostos químicos com potencial bioativo tem ganho cada vez mais relevância, com especial destaque para os derivados de naftaleno. O anel de naftaleno, presente em numerosos compostos farmacologicamente ativos, tem demonstrado uma notável versatilidade estrutural e funcional, estando associados a uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos antitumorais, anti-inflamatórios, antioxidantes, antibacterianos e antifúngicos (84,85).

Entre os derivados mais promissores destacam-se as naftoquinonas e as naftalimidaz, cujas propriedades citotóxicas têm sido amplamente exploradas em diversos modelos de cancro, incluindo no

glioblastoma. Estudos recentes indicam que estas moléculas são capazes de induzir apoptose, causar stress oxidativo, bloquear o ciclo celular e inibir significativamente o crescimento tumoral, tanto *in vitro* como *in vivo* (86,87).

Li et al. (2025) demonstraram que um derivado de naftalimida, (Figura 1A), induziu uma resposta bifásica em células de glioblastoma U87-MG com p53 *wild-type*, em concentrações mais baixas, provocou paragem do ciclo celular na fase G0/G1, enquanto em doses mais elevadas desencadeou apoptose (88). De forma semelhante, *Lee et al. (2024)* demonstraram que dois derivados de 1,8-naftalimida, inibiram eficazmente a proliferação de células U87-MG, causando danos no DNA, paragem do ciclo em G2/M, apoptose e inibição da topoisomerase II (86). Em ambos os estudos, observou-se uma redução significativa do crescimento tumoral em modelos murinos, sem efeitos tóxicos relevantes. Já *Zhan et al. (2022)* demonstraram que a plumbagina (Figura 1B), uma naftoquinona natural, atravessa eficazmente a barreira hematoencefálica e inibe o crescimento do glioblastoma através da indução de ferroptose, mediada pela inibição da GPX4 e ativação da NQO1 (89).

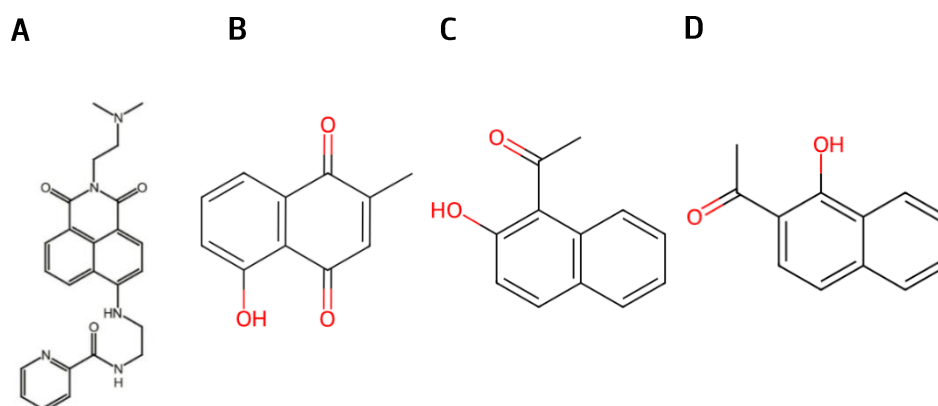


Figura 1: Estruturas químicas de compostos derivados do naftaleno. (A) Derivado de naftalimida. (B) Plumbagina, uma naftoquinona natural. (C) 1-acetil-2-naftol. (D) 2-acetil-1-naftol.

Tendo em conta o potencial terapêutico demonstrado por diversos derivados do naftaleno em modelos de glioblastoma, torna-se relevante explorar novas moléculas estruturalmente semelhantes. Os compostos 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol, dois isómeros derivados dos naftóis, apresentam características estruturais e potencial bioativo que justificam a sua investigação. Apesar de pouco estudados e com pouca informação disponível na literatura, estes compostos poderão revelar atividade relevante contra o glioblastoma ou outros tipos de tumor. Portanto, a avaliação da sua atividade em linhas celulares de glioblastoma poderá contribuir para a identificação de novos candidatos terapêuticos e impulsionar o desenvolvimento de estratégias inovadoras para o seu tratamento.



2. Objetivo

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos biológicos dos compostos 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol em células de glioblastoma humano e células não tumorais, de forma a determinar o seu potencial como agentes terapêuticos.

Para tal, foram realizados ensaios *in vitro* com o objetivo específico de:

- Avaliar a viabilidade celular após tratamento com 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol, através do ensaio de MTT, na linha tumoral U251MG comparativamente com as células normais 3T3-L1;
- Analisar a capacidade migratória das células U251MG após exposição ao 2-acetil-1-naftol, utilizando o ensaio de *wound healing*;
- Determinar a indução de apoptose e eventuais alterações no ciclo celular provocadas pelo 2-acetil-1-naftol nas células U251MG, por citometria de fluxo.



3. Métodos

3.1. Linhas Celulares

Neste estudo, foram utilizadas linhas celulares de U251MG (glioblastoma humano), gentilmente cedidas pela Professora Doutora Sara Granja (ICV/3Bs, Universidade do Minho) e 3T3-L1 (pré-adipócitos de rato), usados como linha celular normal nos ensaios realizados.

3.2. Manutenção e Criopreservação de Linhas Celulares

As linhas celulares U251MG e 3T3-L1 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, High-Glucose 4,5 g/L, Pan Biotech, Alemanha) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS, Alfagene®, Portugal) e 1% (v/v) de antibiótico-antimicótico (Penicilina/Estreptomicina, P/S; Alfagene®, Portugal).

As culturas celulares foram mantidas em frascos de cultura T25 e T75 (Corning®, EUA) e incubadas a uma temperatura de 37 °C a uma pressão parcial de 5% de CO₂, numa estufa humidificada (PHCbi, MCO-170AICUVL-PA). O meio de cultura foi renovado a cada dois a três dias, até se atingir a confluência celular.

Para a preservação das linhas celulares, estas foram congeladas a uma densidade de 5×10^5 a 1×10^6 células por criotubo, em meio DMEM suplementado com 50% de FBS, 1% P/S e com 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Scientific, EUA), a -80 °C. Posteriormente, para criopreservação prolongada, os criotubos foram transferidos para um contentor de azoto líquido.

Sempre que necessário, as células foram descongeladas o mais rapidamente possível e suspensas em meio DMEM sem soro (Sigma-Aldrich®), sendo posteriormente centrifugadas a 800 rpm, a 20 °C, durante 5 minutos (Gyrozen Co; Ltd; Coreia do Sul; 1248R). Após centrifugação, o sobrenadante contendo DMSO foi descartado e o pellet celular ressuspendido em 5 mL de meio DMEM suplementado com 20% de FBS e 1% de P/S. A suspensão celular foi então transferida para frascos de cultura T25 ou T75 e incubados 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% P/S, sendo posteriormente renovado a cada dois a três dias, até as células atingirem confluência.

3.3. Passagem das Linhas Celulares

A passagem de células foi realizada sempre que as células atingiam aproximadamente 90% de confluência, de forma a garantir nutrientes e espaço suficientes para manter as suas características e condições de crescimento. Quando essa confluência foi atingida, o meio foi removido e as células foram



lavadas com o tampão fosfato salino (PBS, Alfa Aesar™), com o objetivo de eliminar possíveis resíduos de meio de cultura retidos no frasco. Após a lavagem com PBS, as células foram tripsinizadas com 1–2 mL de tripsina 0,25%–EDTA 0,02% (PAN Biotech, Alemanha) durante aproximadamente 5 minutos, a 37°C, para promover o destacamento celular. Após o destacamento, foram adicionados 4 mL de meio DMEM com soro, com o intuito de inativar a ação da tripsina. Em seguida, todo o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 1000 rpm, a 20 °C, durante 5 minutos. No final da centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet celular ressuspensionado em 1–2 mL de meio apropriado (DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% P/S para cultura celular e DMEM suplementado com 20% de FBS e 1% P/S para congelamento celular). As contagens celulares foram efetuadas por observação microscópica (EVOS XL Core, Invitrogen by ThermoFisher Scientific Corporation, EUA) utilizando um hemocítmetro (Câmara de Neubauer), após coloração de 10 µL de suspensão celular com 10 µL de azul de tripano 0,4% (Gibco). Por fim, de acordo com a concentração celular determinada, um volume apropriado da suspensão celular é adicionado ao volume necessário de meio e transferido para um novo frasco ou para placas de ensaio, ficando a incubar nas condições supracitadas.

3.4. Compostos e Preparação de Soluções

Foram utilizados dois isómeros de acetilnaftol: 1-acetil-2-naftol (CAS: 574-19-6) e 2-acetil-1-naftol (CAS: 711-79-5), ambos pertencentes à família dos naftóis. Os compostos foram adquiridos comercialmente à Aldrich Chemical Co® (Darmstadt, Alemanha), com pureza de fração molar de 0,99.

Devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso, os compostos foram dissolvidos em DMSO para preparação de soluções *stock* (100 mM). Estas soluções foram filtradas com filtro de 0,22 µm e armazenadas a –20 °C em tubos Falcon de 50 mL, protegidas da luz.

Para os ensaios, foram preparadas soluções intermédias 100x concentradas para cada concentração final de teste pretendida (0.1; 0.5; 1; 5; 10; 25; 50 µM), por diluição da solução *stock* em DMSO. Estas soluções foram igualmente armazenadas a –20 °C.

De forma a evitar instabilidade em soluções aquosas, as soluções 10x concentradas foram preparadas no dia anterior ao tratamento celular ou, alternativamente, no próprio dia do ensaio, por diluição das soluções 100x concentradas em meio DMEM sem soro. Quando preparadas com antecedência, foram armazenadas a 4 °C até à sua utilização.



Imediatamente antes do tratamento celular, foram preparadas as soluções finais de trabalho, por diluição das soluções 10x concentradas em meio DMEM sem soro, sendo então aplicadas às culturas celulares.

3.5. Ensaio MTT

O ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), tem como objetivo avaliar a viabilidade celular. O MTT é um sal tetrazólio de cor amarela que, em contacto com células vivas, é reduzido a formazan, um composto de cor roxa. Essa reação ocorre somente em células viáveis, permitindo quantificá-las por espectrofotometria.

Neste ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Suíça) à densidade de 1×10^5 células/poço e incubadas durante 48 horas a 37 °C com 5% de CO₂. Após este período, o meio foi removido de todos os poços e foram adicionados os compostos em estudo, previamente diluídos em meio DMEM sem soro, em diferentes concentrações (0.1; 0.5; 1; 5; 10; 25; 50 µM), deixando-se a incubar durante 24 e 48 horas.

No final de cada tempo de incubação (24 h e 48 h), foram adicionados 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL) a cada poço, procedendo-se a uma nova incubação durante 2 h 30 min a 3 h, de modo a permitir a formação dos cristais de formazan. De seguida, o meio foi cuidadosamente removido e adicionado 150 µL de DMSO a cada poço, para solubilização dos cristais formados. A absorvância foi medida a 570 nm num leitor de microplacas (Thermo Scientific™, EUA; Multiskan SkyHigh).

Como controlos, foram utilizados poços contendo apenas DMEM (branco), células tratadas com DMEM e 1% de DMSO (controlo) e células tratadas com 50% de DMSO (controlo positivo de morte). Os ensaios foram realizados com 4 réplicas por condição. Para a experiência, foram realizados 3-5 ensaios independentes.

3.6. Ensaio *Wound healing*

Com base nos resultados de viabilidade celular, foi selecionado o composto 2-acetil-1-naftol em estudo para os ensaios seguintes. Assim, o ensaio de *wound healing* foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade migratória das células U251MG na presença e ausência do composto 2-acetil-1-naftol em estudo.

As células foram semeadas em placas de 6 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Suíça) a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/poço e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% P/S, a 37 °C e 5% de CO₂, até à confluência total.

Em cada poço foi realizado um risco linear, com a ponta estéril de uma pipeta de 200 µL, de modo a criar a “ferida” e assegurar reprodutibilidade entre os poços. Após este período, o meio de cultura foi removido e as células lavadas cuidadosamente com PBS estéril, de forma a eliminar resíduos de soro que poderiam interferir no ensaio.

De seguida, as células foram tratadas com soluções de 2-acetil-1-naftol, previamente preparadas em meio DMEM sem soro. Com base nos resultados de viabilidade celular, foram selecionadas 5 concentrações (0.1; 1; 5; 10; 25 µM) do composto 2-acetil-1-naftol, acima do IC50 de ambas as linhas celulares e com taxas de viabilidade a rondar os 55–80%.

A evolução da migração celular foi monitorizada através de um microscópio invertido de fluorescência (EVOS FL Auto, Invitrogen by ThermoFisher Scientific Corporation, EUA). Imediatamente após o tratamento e a realização da ferida (tempo 0 h), foram registadas imagens em regiões diferentes e específicas de cada poço, de modo a servir como uma referência espacial. Essa marcação permitiu que, nos tempos subsequentes de incubação (12 h, 24 h e 48 h), as fotografias fossem obtidas exatamente nos mesmos locais do registo inicial, garantindo consistência e comparabilidade entre os diferentes momentos experimentais.

A quantificação da área da ferida em cada tempo experimental foi realizada utilizando o *software ImageJ* (National Institutes of Health, EUA), com recurso à ferramenta *MRI Wound Healing Tool* (Figura 2).

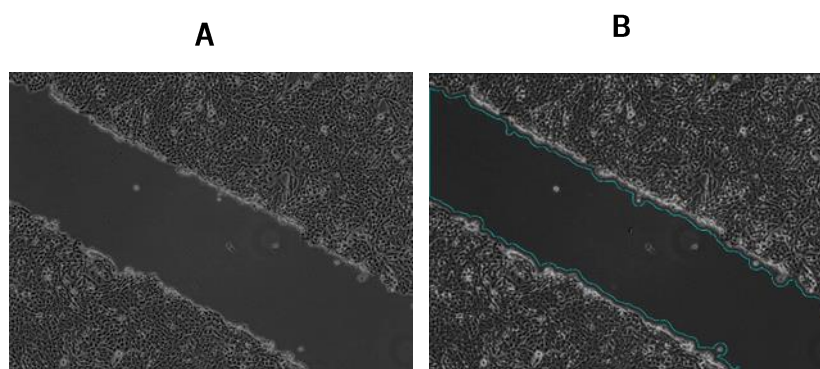


Figura 2: Exemplo representativo da quantificação da área da ferida no ensaio wound healing. (A) Imagem microscópica do risco imediatamente após indução da ferida. (B) Delimitação da área da ferida no software ImageJ para quantificação ao longo do tempo.

O cálculo da percentagem de área recuperada da ferida foi efetuado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de área recuperada} = \frac{(A0h - At)}{A0h} \times 100$$

onde A0h corresponde à área inicial da ferida no tempo 0 h e At à área da ferida em cada tempo experimental (12 h, 24 h e 48 h).

Foram realizados dois ensaios independentes por condição, com duas medições independentes em locais diferentes em cada ferida, resultando em 4 repetições por cada condição experimental.



3.7. Análise da Apoptose e Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

A análise da apoptose e ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo, utilizando a marcação com iodeto de propídio (PI) em células permeabilizadas e não permeabilizadas, com o objetivo de avaliar o conteúdo de DNA e a integridade da membrana celular.

As células U251MG foram cultivadas em placas de 6 poços à densidade de $7,5 \times 10^5$ células/poço e mantidas em meio DMEM suplementadas com 10% de FBS e 1% P/S, a 37 °C e 5% de CO₂, até atingirem aproximadamente 90% de confluência. Após lavagem com PBS contendo 1% de FBS, as células foram tratadas com o composto 2-acetil-1-naftol, previamente diluído em meio DMEM sem soro, em diferentes concentrações finais (0.1; 1; 5; 10; 25 μM). Como controlos, incluíram-se células não tratadas incubadas apenas com meio DMEM sem soro e células tratadas com DMSO (controlo positivo de morte celular).

Após um período de incubação de 24 h, as células foram destacadas por tripsinização, recolhidas, centrifugadas a 400 g durante 5 min, a 4 °C e lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de FBS. O pellet celular obtido foi dividido em duas frações: uma submetida a fixação e permeabilização com etanol 70% a -20 °C e Triton X-100, e outra mantida a fresco, sem fixação e permeabilização.

A fixação foi realizada com adição gota a gota de etanol 70%, sob agitação no vórtex, para garantir uma adequada preservação e evitar aglomeração celular. As amostras foram mantidas a -20 °C durante, no mínimo, 2 horas, seguidas de duas centrifugações a 850 g por 5 minutos a 4 °C e duas lavagens com PBS. Após este período, as células (fixadas e não fixadas) foram incubadas com uma mistura de PBS, PI (1 mg/mL), RNase A (10 mg/mL) e, no caso das células fixadas, foi adicionado Triton X-100 a 1% (v/v). O volume de mistura adicionada foi ajustado de acordo com o número de condições, de modo a garantir uma concentração final uniforme em todas as amostras.

A aquisição das amostras foi realizada por citometria de fluxo (Attune NxT Flow Cytometer CytKick Autosampler) e a análise dos dados foi realizada no *software FlowJo* (versão 10.10.0, BD Biosciences).

3.7.1. Avaliação da Morte Celular por Apoptose

A análise de apoptose foi realizada por citometria de fluxo após coloração com PI. Apesar de o PI não ser um marcador específico para morte celular por apoptose, a fixação/permeabilização com etanol a 70% e Triton X-100 permite a deteção da fragmentação característica do DNA neste processo, possibilitando a inferência da percentagem de células em apoptose. Assim, a quantificação baseou-se na identificação da fração de células com conteúdo de DNA inferior a 2n (sub-G₀/G₁), resultante da fragmentação característica do DNA apoptótico.



O processamento incluiu: (i) exclusão de detritos celulares por *gating* em FSC-H vs. SSC-H; (ii) eliminação de dupletos e agregados celulares através da relação FSC-A vs. FSC-H; e (iii) análise da fluorescência de PI em histogramas univariados (BL3-A).

A percentagem de células apoptóticas foi determinada com base no pico sub- G_0/G_1 e expressa em relação ao total de eventos adquiridos (BL3-H).

3.7.2. Avaliação do Ciclo Celular

A análise do ciclo celular foi realizada a partir das mesmas aquisições obtidas para a avaliação da apoptose, utilizando os histogramas de fluorescência de PI para estimar o conteúdo de DNA celular.

Após exclusão de detritos e eliminação de dupletos, os histogramas foram ajustados no *software FlowJo* a modelos univariados de ciclo celular (*Watson pragmatic*), permitindo a determinação da proporção de células em cada fase: G_0/G_1 (2n), S (síntese), G_2/M (4n).

Os resultados foram expressos em percentagem relativa ao total de células viáveis em cada condição experimental.

3.8. Análise Estatística

Os resultados apresentados dizem respeito a pelo menos três experiências independentes, e são expressos sob a forma de média \pm SEM. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para comparações entre dois grupos independentes, foi aplicado o teste *t Student* (amostras independentes) quando os pressupostos de normalidade foram satisfeitos, ou o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* quando esses pressupostos não se verificaram. Quando comparados mais de dois grupos, recorreu-se à análise de variância unidirecional (*One-way ANOVA*) para dados paramétricos ou ao teste de *Kruskal-Wallis* para dados não paramétricos. Em análises envolvendo mais do que uma variável independente, foi aplicada a análise de variância bidirecional (*Two-way ANOVA*). Considerou-se um nível de significância de $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas e representações gráficas foram realizadas no *software GraphPad Prism* (versão 8.0.2.263, San Diego, CA, EUA).



4. Resultados

4.1. Ensaio MTT

Com o objetivo de avaliar o efeito dos compostos 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol na viabilidade celular, foi realizado o ensaio de MTT nas linhas celulares U251MG e 3T3-L1, após 24 h e 48 h de exposição a diferentes concentrações (0.1; 0.5; 1; 5; 10; 25; 50 μM).

Às 24 h, o 1-acetil-2-naftol reduziu significativamente a viabilidade das células não tumorais 3T3-L1, quando comparado com o controlo, nas concentrações de 1 μM (87,8%; $p=0,048$) e 25 μM (80,5%; $p=0,048$). Nas células U251MG não se observaram diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, registaram-se discrepâncias entre as duas linhas celulares nas concentrações de 0.5 μM (U251MG=113,8% vs. 3T3-L1=95,2%; $p=0,041$) e 10 μM (U251MG=102,8% vs. 3T3-L1=93,7%; $p=0,017$). Nestes casos, as células 3T3-L1 apresentaram menor viabilidade, enquanto as U251MG exibiram valores de viabilidade superiores aos do controlo (100%), sugerindo um possível estímulo proliferativo na linha tumoral (Figura 3A).

No mesmo intervalo temporal, o 2-acetil-1-naftol induziu uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade nas 3T3-L1 tratadas com concentrações de 0.1 μM (78,4%; $p=0,010$), 0.5 μM (57,8%; $p=0,048$), 10 μM (89,3%; $p=0,049$) e 50 μM (89,2%; $p=0,031$). Nas células U251MG, apenas a concentração de 1 μM provocou uma diminuição significativa da viabilidade celular (44,7%; $p=0,040$), não se tendo detetado alterações relevantes nas restantes concentrações testadas. A comparação direta entre as linhas celulares revelou diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular quando usada a concentração de 5 μM (U251MG=80,2% vs. 3T3-L1=91,7%; $p=0,033$) e 25 μM (U251MG=72,5% vs. 3T3-L1=91,4%; $p=0,043$) e, apesar de não estatisticamente significativo, observou-se um valor próximo do limiar de significância na dose de 50 μM (U251MG=75,3% vs. 3T3-L1=89,2%; $p=0,056$). Nestas situações, verifica-se que o composto reduz a viabilidade da linha tumoral, sendo este efeito significativamente diferente do observado na linha normal tratada de igual forma (Figura 3C).

Após 48 h, o 1-acetil-2-naftol manteve o efeito inibitório nas células 3T3-L1, com reduções significativas em 0.5 μM (83,5%; $p=0,025$), 5 μM (86,5%; $p=0,040$) e 10 μM (88,6%; $p=0,049$). Outras concentrações apresentaram valores próximos de significância (1 μM : 78%, $p=0,053$; 25 μM : 73,2%, $p=0,064$; 50 μM : 62,3%, $p=0,058$). Nas U251MG, não se registaram alterações estatisticamente significativas (Figura 3B).

No caso do 2-acetil-1-naftol, às 48 h, observou-se redução significativa da viabilidade nas U251MG apenas na dose de 1 μM (33%; $p=0,032$). Concentrações de 0.1 μM (47,7%) e 0.5 μM (37,5%)



apresentaram tendência para a redução, apesar de não atingirem a significância estatística ($p=0,056$). Nas 3T3-L1, as concentrações de $0.1 \mu\text{M}$ (60% ; $p=0,029$) e $0.5 \mu\text{M}$ ($43,1\%$; $p=0,029$) mantiveram a diminuição já observada às 24 h, enquanto a concentração de $1 \mu\text{M}$ revelou uma tendência próxima da significância (43% ; $p=0,057$). As células tumorais tratadas com $10 \mu\text{M}$ de 2-acetil-1-naftol apresentaram viabilidade celular de $60,4\%$, significativamente inferior à exibida pela linha celular normal ($93,4\%$) quando expostas às mesmas condições ($p=0,016$). O mesmo padrão foi observado nas células tratadas com $5 \mu\text{M}$ (U251MG= $68,5\%$ vs. 3T3-L1= $95,5\%$) e $25 \mu\text{M}$ (U251MG= $67,7\%$ vs. 3T3-L1= $97,3\%$), apesar de não ser atingida a significância estatística ($p=0,064$) (Figura 3D).

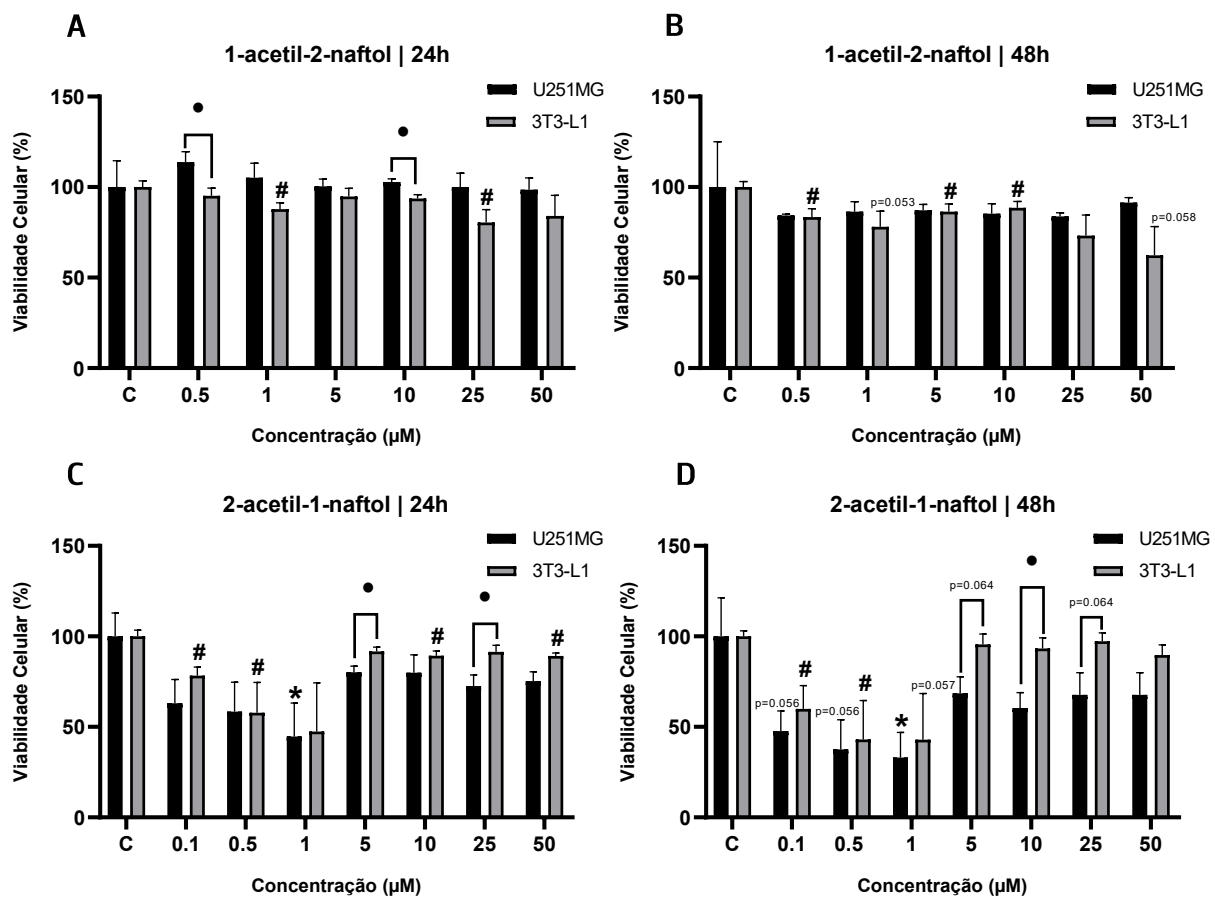


Figura 3: Efeito de 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol na viabilidade celular (ensaio MTT). (A) U251MG e 3T3-L1 expostos a 1-acetil-2-naftol durante 24h. (B) U251MG e 3T3-L1 expostos a 1-acetil-2-naftol durante 48h. (C) U251MG e 3T3-L1 expostos a 2-acetil-1-naftol durante 24h. (D) U251MG e 3T3-L1 expostos a 2-acetil-1-naftol durante 48h. C (controle) representa células não tratadas. Resultados apresentados como média \pm SEM. (*) $p<0,05$ em relação ao controle (U251MG); (#) $p<0,05$ em relação ao controle (3T3-L1); (●) $p<0,05$ U251MG vs 3T3-L1.

4.2. Ensaio *Wound healing*

Para avaliar o efeito do composto 2-acetil-1-naftol na capacidade migratória das células U251MG, realizou-se o ensaio de *wound healing*, monitorizando, de 12 h em 12 h, a variação da área da “ferida” criada ao longo de 48 h de exposição. A Figura 4 apresenta imagens representativas da evolução da migração celular nas diferentes concentrações testadas, enquanto a Figura 5 mostra a quantificação da percentagem de área recuperada em função do tempo.

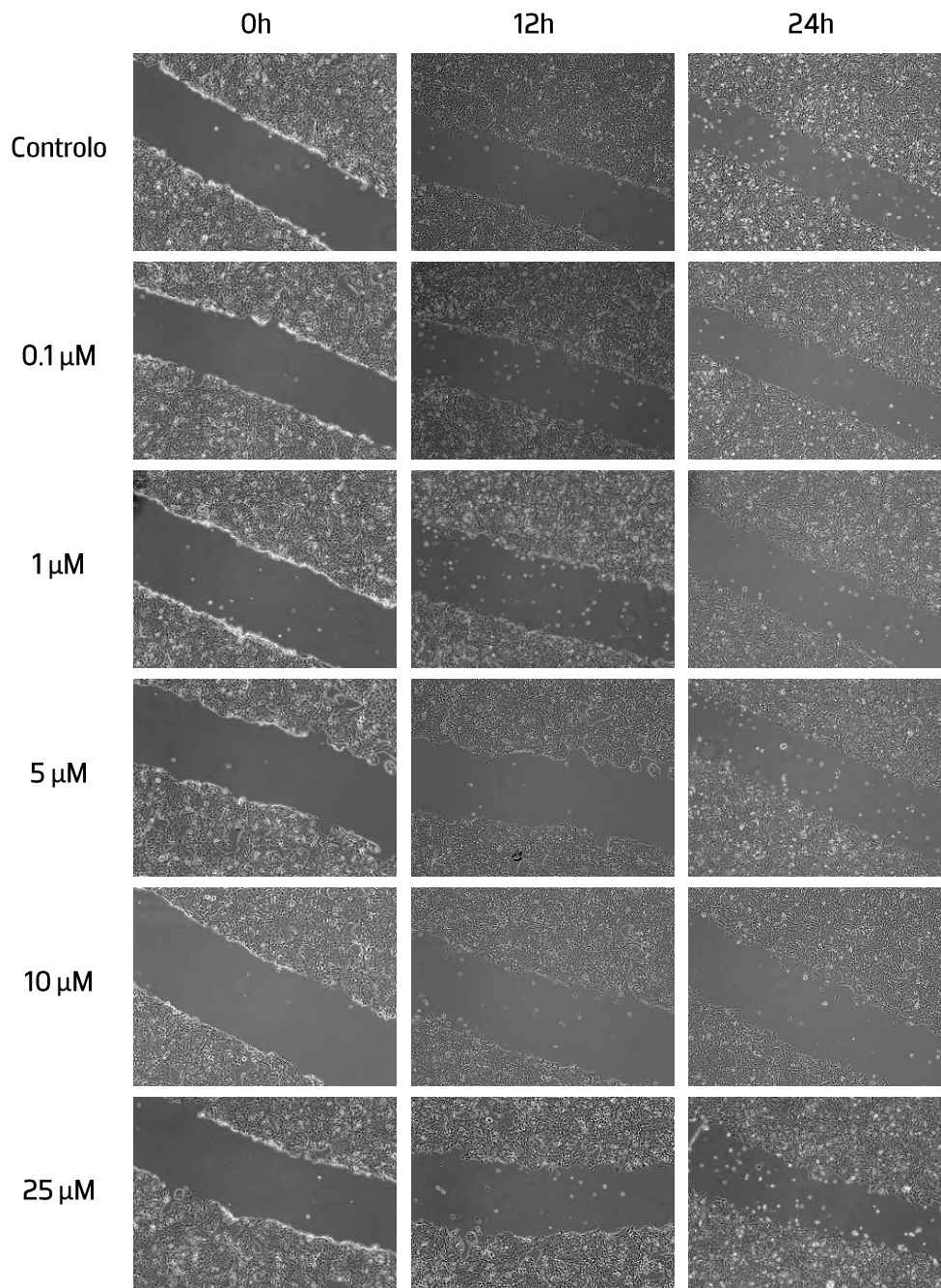


Figura 4: Ensaio de wound healing em células U251MG tratadas com 2-acetil-1-naftol. Imagens de microscopia obtidas às 0h, 12h e 24h de exposição a 2-acetil-1-naftol nas concentrações (0.1; 1; 5; 10; 25 μM). C (controlo) representa células não tratadas.

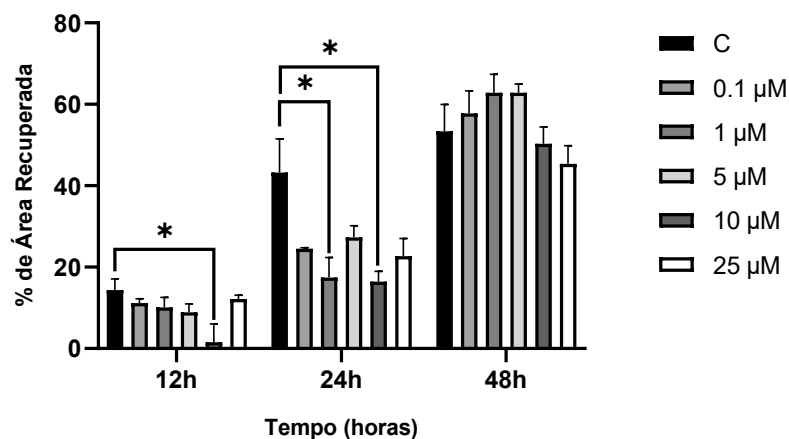


Figura 5: Quantificação da migração celular em ensaio wound healing com células U251MG tratadas com 2-acetil-1-naftol. Representação gráfica da percentagem de área recuperada às 12h, 24h e 48h no C (controlo) e nas diferentes concentrações do composto (0.1; 1; 5; 10; 25 μM). Resultados apresentados como média ± SEM. Diferenças estatisticamente significativas vs. Controlo: (*) $p < 0,05$.

Às 12 h, observou-se que as células do controlo começaram a migrar para a zona da ferida, enquanto nas culturas tratadas com 10 μM a área permanecia maioritariamente aberta, refletindo uma recuperação significativamente reduzida (1,5% de área recuperada vs. controlo, $p = 0,050$).

Após 24 h, o efeito inibitório tornou-se mais evidente, as células tratadas com 1 μM ($p = 0,037$) e 10 μM ($p = 0,021$) apresentaram uma redução significativa da migração, recuperando apenas 17,5% e 16,4% da área, respetivamente, em contraste com o controlo, que exibiu 43,2% de encerramento da ferida. Já as concentrações de 0.1 μM (24,5%; $p = 0,065$) e 25 μM (22,7%; $p = 0,071$) mostraram tendência para a diminuição da migração, embora sem atingir significância estatística. A análise das imagens microscópicas confirma este padrão, evidenciando menor número de células a ocupar a área da ferida nas condições tratadas quando comparadas com o controlo (Figura 4).

Às 48 h, todas as condições testadas apresentaram valores de migração semelhantes, e não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os dados quantitativos (Figura 5) indicam que o encerramento da “ferida” foi praticamente completo em todos os grupos, sugerindo que o efeito inibitório do 2-acetil-1-naftol é mais marcado nas fases iniciais da migração celular.

4.3. Avaliação da Morte Celular por Apoptose

Com o objetivo de avaliar o efeito do composto 2-acetil-1-naftol na morte celular e, em particular, na morte celular por apoptose, as células U251MG foram analisadas por citometria de fluxo após 24 h de exposição a diferentes concentrações (0.1; 1; 5; 10; 25 μM) (Figura 6 e 7).

A análise revelou que a morte celular total diminuiu significativamente em comparação com o controlo (7,1%) a partir da concentração de $1\ \mu\text{M}$, registando-se valores médios de 3,9% a $1\ \mu\text{M}$ ($p=0,022$), 3% a $5\ \mu\text{M}$ ($p=0,006$), 3,5% a $10\ \mu\text{M}$ ($p=0,024$) e 3,5% a $25\ \mu\text{M}$ ($p=0,009$). Na concentração de $0,1\ \mu\text{M}$ (5,6%) não se observaram diferenças relevantes relativamente ao controlo (Figura 7).

Por outro lado, a fração de morte celular atribuída à apoptose manteve-se baixa e sem alterações significativas em todas as condições testadas, oscilando entre 0,9% ($10\ \mu\text{M}$) e 1,7% ($0,1\ \mu\text{M}$), valores próximos aos observados no controlo (1,6%) (Figura 7).

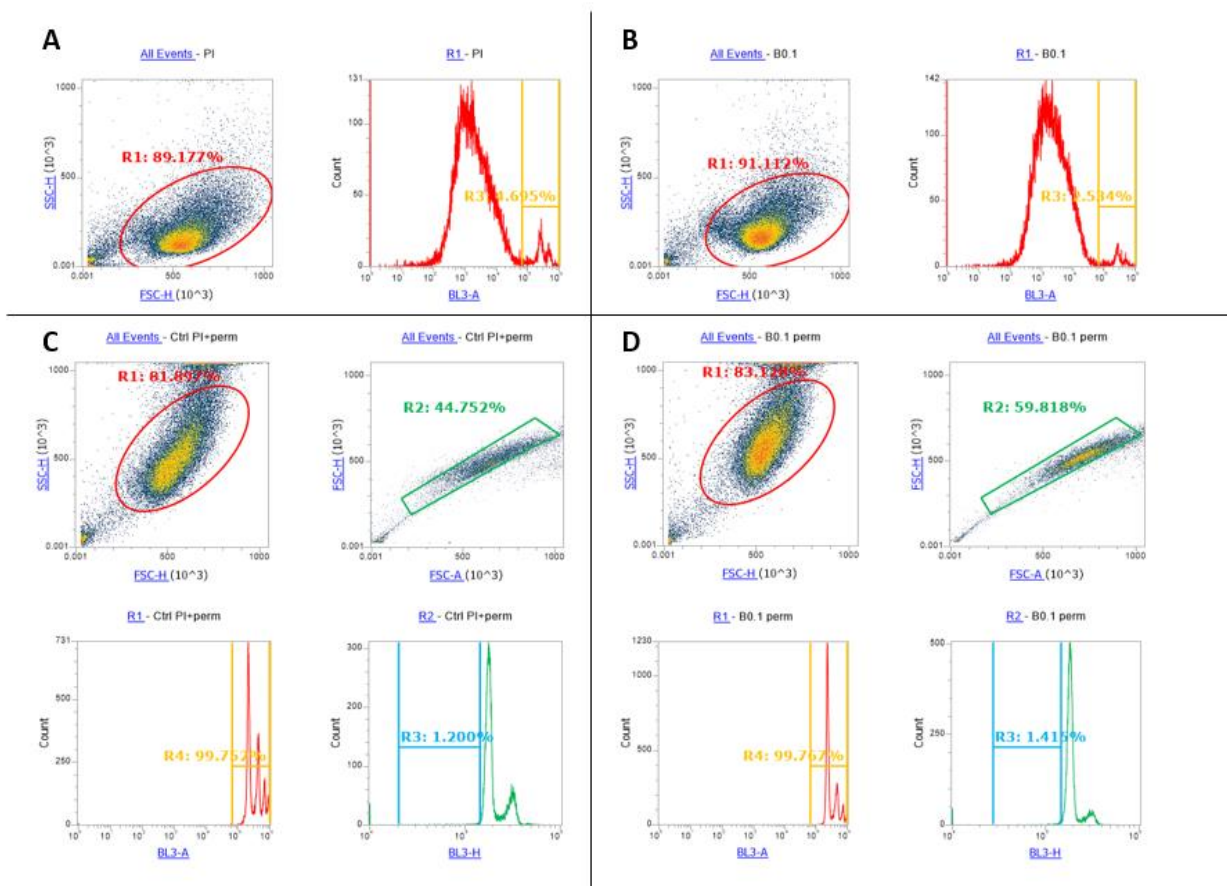


Figura 6: Exemplo representativo de citogramas obtidos por citometria de fluxo: (A) Controlo sem fixação/permeabilização; (B) Células tratadas com $0,1\ \mu\text{M}$ sem fixação/permeabilização; (C) Controlo fixado e permeabilizado; (D) Células tratadas com $0,1\ \mu\text{M}$ fixadas e permeabilizadas.

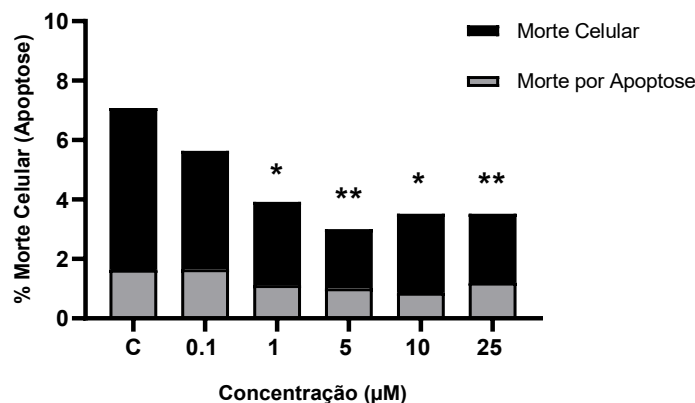


Figura 7: Análise da morte celular total e apoptótica em células U251MG tratadas com 2-acetil-1-naftol por 24h. Representação gráfica da percentagem de morte celular total (barras pretas) e da fração correspondente à morte por apoptose (barras cinzentas) após exposição a 2-acetil-1-naftol nas concentrações (0.1; 1; 5; 10; 25 µM). C (controlo) representa células não tratadas. Resultados apresentados como média ± SEM. Diferenças estatisticamente significativas observadas apenas na morte celular total: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

4.4. Avaliação do Ciclo Celular

Com o objetivo de avaliar se o composto 2-acetil-1-naftol interfere na progressão do ciclo celular, a distribuição das células U251MG nas fases G0/G1, S e G2/M foi analisada por citometria de fluxo após 24 h de exposição a diferentes concentrações (0.1; 1; 5; 10; 25 µM) (Figura 8).

A análise revelou que, em todas as condições testadas, a população celular manteve uma distribuição semelhante à observada no controlo, não se registando diferenças estatisticamente significativas. De uma forma geral, a fração de células na fase G0/G1 variou entre 64,8% e 83,8%, valores próximos ao do controlo (66,3%). Na fase S, as percentagens oscilaram entre 7,5% e 19,2%, comparáveis ao valor de 28,4% observado no controlo. Finalmente, a fase G2/M apresentou variações entre 5,3% e 10,9%, igualmente próximos ao valor do controlo (10,8%).

As Figuras 8A e 8B apresentam histogramas representativos da distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular, enquanto a Figura 8C mostra o resumo gráfico dos valores médios obtidos nos três ensaios independentes.

Em conjunto, estes resultados indicam, que após 24 h de exposição, o 2-acetil-1-naftol não induz alterações relevantes no ciclo celular da linha U251MG, sugerindo que o composto não afeta a progressão do ciclo celular nem promove bloqueios específicos nas fases G0/G1, S ou G2/M.

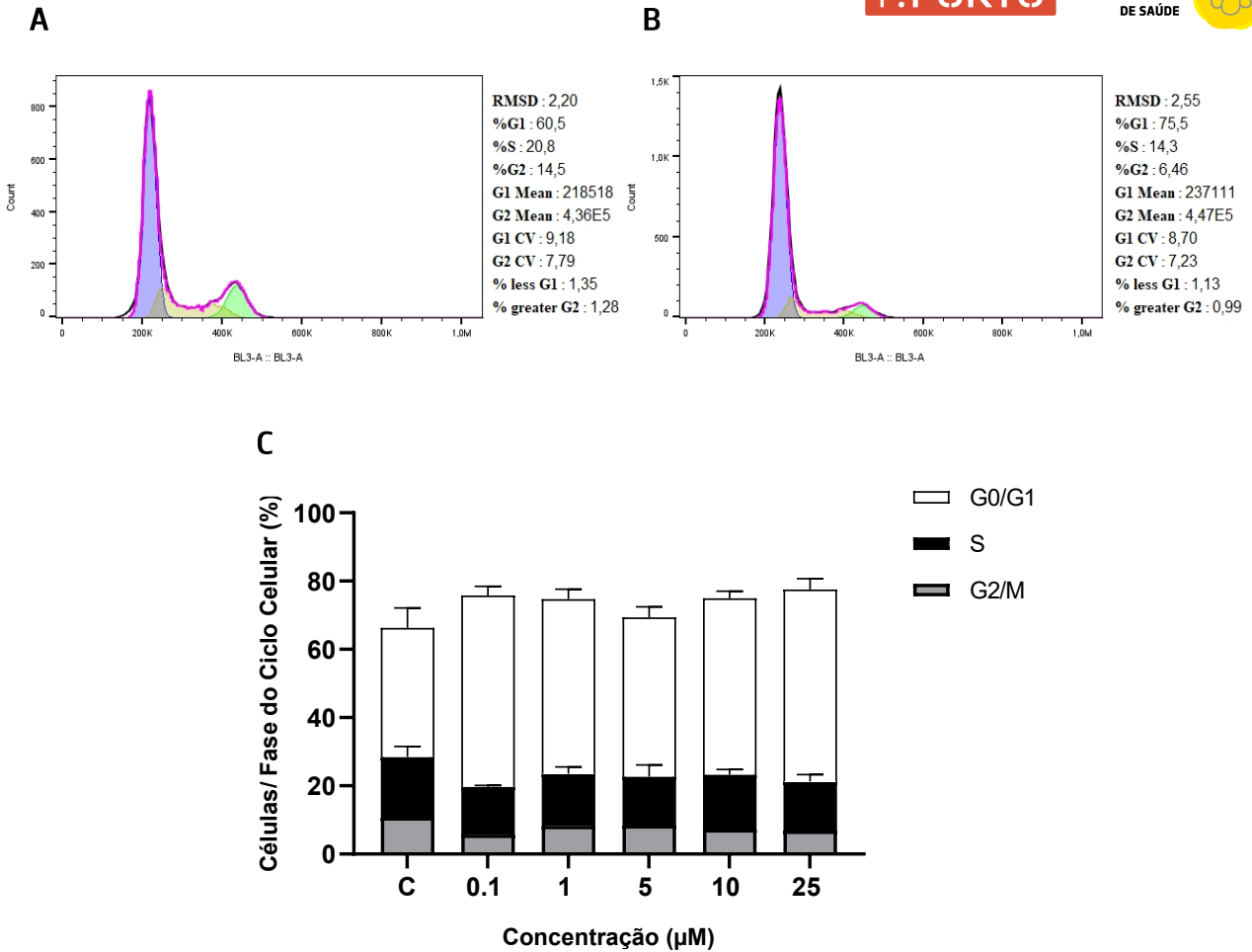


Figura 8: Efeito do 2-acetil-1-naftol no ciclo celular de células U251MG após 24h de exposição. Exemplo representativo de histogramas obtidos no software FlowJo, evidenciando a distribuição das células nas fases G0/G1, S e G2/M: (A) Controlo fixado e permeabilizado; (B) Células tratadas com 0.1 μM fixadas e permeabilizadas. (C) Representação gráfica da percentagem de células em cada fase do ciclo celular após tratamento com diferentes concentrações do composto (0.1; 1; 5; 10; 25 μM). C (controlo) representa células não tratadas. Resultados apresentados como média ± SEM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.



5. Discussão

O glioblastoma é o tumor cerebral maligno primário mais comum e agressivo do SNC, associado a um prognóstico reservado e a opções terapêuticas limitadas. Até ao momento, não existe uma abordagem realmente eficaz capaz de alterar de forma significativa a evolução clínica desta neoplasia, o que torna urgente a investigação e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos biológicos dos compostos 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol em células de glioblastoma humano (U251MG), de forma a determinar um possível potencial terapêutico. Para tal, foram realizados ensaios *in vitro* que permitiram analisar parâmetros fundamentais da biologia tumoral, incluindo: viabilidade celular, capacidade migratória e indução da apoptose com possíveis alterações no ciclo celular.

A avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT demonstrou que os compostos 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol apresentam efeitos distintos sobre as linhas celulares tumorais U251MG e não tumorais 3T3-L1, dependentes tanto da concentração como do tempo de exposição.

No caso do 1-acetil-2-naftol, observou-se que este composto reduziu significativamente a viabilidade das células não tumorais 3T3-L1, tanto às 24 h como às 48 h, sobretudo em concentrações baixas a intermédias (0.5-25 μM). Por outro lado, nas células tumorais U251MG não se registaram reduções significativas em nenhum dos tempos analisados. Contudo, em algumas condições (0.5; 1; 5; 10 μM às 24h), a viabilidade das U251MG foi superior à do controlo, sugerindo um possível efeito proliferativo ou pró-sobrevivência seletivo em células tumorais. Estes resultados sugerem que o 1-acetil-2-naftol, apresenta maior citotoxicidade para células normais do que para células tumorais, condição que limita o seu interesse como potencial agente antitumoral.

Por outro lado, o 2-acetil-1-naftol apresentou um comportamento distinto e potencialmente mais interessante. Às 24 h, verificou-se uma redução significativa da viabilidade nas células não tumorais 3T3-L1 em concentrações muito baixas (0.1-0.5 μM) mas também em doses mais elevadas (10 e 50 μM), enquanto nas células tumorais U251MG os efeitos foram menos pronunciados, observando-se apenas uma redução significativa na concentração de 1 μM . No entanto, após 48 h, tornou-se evidente um padrão distinto. Nas células U251MG, a redução significativa da viabilidade manteve-se na concentração de 1 μM , verificando-se uma tendência de redução em concentrações próximas (0.1-0.5 μM), enquanto nas células 3T3-L1 a diminuição previamente observada em doses baixas (0.1-0.5 μM) se manteve. Importa ainda notar que, em concentrações mais elevadas (5-25 μM), observou-se uma viabilidade consistentemente inferior nas U251MG em comparação com as 3T3-L1, sugerindo que o 2-acetil-1-



naftol pode exercer atividade antiproliferativa seletiva em células de glioblastoma, em condições específicas de concentração e tempo de exposição.

Estes resultados vão parcialmente ao encontro do que tem sido descrito para compostos estruturalmente relacionados. *Shinkai et al. (2022)* demonstram que a eleuterina, uma naftoquinona, reduziu de forma dependente do tempo e da dose a viabilidade de células de glioma, acompanhada por fenótipos compatíveis com apoptose (90). De forma semelhante, *Xu et al. (2022)* mostraram que análogos naftalénicos apresentam atividade citotóxica variável em células U251, com IC₅₀ que se alteram drasticamente entre análogos próximos, evidenciando que pequenas modificações estruturais podem ter um grande impacto na potência e seletividade (91). Esta noção é suportada por dados termoquímicos de derivados de naftol, que mostram como alterações mínimas na posição de grupos substituintes influenciam significativamente propriedades eletrónicas e de estabilidade (92). Um princípio que se observa diretamente nos nossos resultados, uma vez que a simples diferença posicional do grupo acetil entre os dois isómeros resultou em perfis biológicos contrastantes.

Apesar disso, algumas condições metodológicas e interpretativas são necessárias. O ensaio MTT avalia a atividade redutora celular como *proxy* do metabolismo mitocondrial, e não uma contagem direta de células. Compostos que interfiram no metabolismo energético ou no reagente podem enviesar os resultados. Por isso, é essencial confirmar estes dados com ensaios complementares (como quantificação de ATP, exclusão de corantes ou ensaio de clonogenicidade) e por análises de apoptose e ciclo celular, que permitam esclarecer se a diminuição de viabilidade decorre de morte celular programada, inibição proliferativa ou alterações metabólicas (90,93). Além disso, vários valores-p ficaram próximos do limiar de significância ($p=0,05$) e o elevado número de comparações (múltiplas doses/tempo) aumenta o risco de falsos positivos. Portanto, estes resultados devem ser interpretados como tendência que carece de validação adicional.

De forma global, os dados obtidos apontam para diferenças importantes no mecanismo de ação dos dois isómeros. O 1-acetil-2-naftol aparenta ter baixa eficácia em células tumorais e maior citotoxicidade em células normais, enquanto o 2-acetil-1-naftol, embora também afete células não tumorais, demonstra uma tendência de maior impacto sobre a viabilidade das células tumorais U251MG, sobretudo em exposições prolongadas. Assim, considerando que o 1-acetil-2-naftol não apresentou efeitos relevantes na linha tumoral U251MG e revelou elevada toxicidade para células não tumorais, os ensaios subsequentes de migração, apoptose e ciclo celular foram conduzidos apenas com o composto 2-acetil-1-naftol.



Uma vez estabelecido o impacto deste isómero sobre a viabilidade celular, tornou-se essencial investigar se o seu efeito se estende a processos-chave no comportamento tumoral, como a capacidade migratória. A migração celular é um parâmetro fundamental na progressão do glioblastoma, estando diretamente associada ao seu carácter altamente invasivo e à recorrência clínica. Por esse motivo, a etapa seguinte do trabalho consistiu na avaliação do efeito do 2-acetil-1-naftol na migração celular através do ensaio de *wound healing*.

De uma forma geral, os resultados evidenciam que o composto exerce um efeito inibitório na migração entre as 12 h e as 24 h de exposição.

Às 12 h, verificou-se uma redução da migração nas culturas tratadas, mais evidente em concentrações elevadas (10 μM), onde a recuperação da área da ferida foi significativamente inferior ao controlo. Esta tendência tornou-se mais evidente às 24 h, momento em que concentrações intermédias (1 e 10 μM) apresentaram também uma inibição significativa da migração, com valores de encerramento da ferida de 2,5 vezes inferiores aos do controlo. Importa salientar que concentrações baixas (0.1 μM) e altas (25 μM) mostraram apenas uma tendência de redução, sem alcançar significância estatística, o que sugere a existência de uma janela de concentração mais eficaz para a inibição migratória. Expectavelmente, às 48 h todas as condições testadas exibiram o encerramento praticamente completo da ferida em todos os grupos.

Importa referir que, não tendo sido utilizado um inibidor de proliferação (*ex. mitomycin C*), o ensaio *wound healing* não permite dissociar migração de proliferação celular, podendo, parte do encerramento da ferida resultar de proliferação local (94). Ainda assim, a omissão do soro no meio de cultura e a avaliação de diferenças em *timepoints* até às 24 h permite avaliar e considerar válidos os efeitos observados pelo composto na migração celular.

Este comportamento pode refletir diferentes mecanismos de ação do composto sobre a dinâmica celular. Por um lado, a inibição precoce da migração poderá estar associada a perturbações do citoesqueleto ou da adesão celular, processos cruciais nas fases iniciais de mobilidade celular (95). Por outro lado, a perda de efeito às 48 h poderá dever-se a mecanismos compensatórios intrínsecos das células tumorais, como a ativação de vias de sobrevivência e plasticidade fenotípica que lhes permitem ultrapassar a inibição inicial, à instabilidade química do composto no meio ou ainda a efeitos proliferativos residuais que facilitam o preenchimento da ferida (96,97). Estas hipóteses têm sido descritas em estudos com outros compostos bioativos, em que efeitos iniciais de inibição migratória acabam por ser superados ao longo do tempo, refletindo a elevada capacidade adaptativa das células de glioblastoma (96,98).



De forma global, estes resultados sugerem que o 2-acetil-1-naftol apresenta um efeito modulador da migração, mais pronunciado em fases iniciais, o que poderá traduzir-se num potencial papel como agente adjuvante na limitação da capacidade invasiva tumoral (99). No entanto, o desaparecimento do efeito em períodos prolongados reforça a necessidade de estudos complementares, nomeadamente ensaios de invasão em matriz extracelular tridimensional, análises do citoesqueleto e avaliação da expressão de marcadores de migração e invasão (como MMPs, vimentina e integrinas), de modo a clarificar os mecanismos subjacentes e o real impacto do composto no comportamento invasivo das células de glioblastoma (96,100).

Para além da migração, outro aspeto crucial no comportamento agressivo do glioblastoma é a capacidade das células resistirem à morte programada e sustentarem uma proliferação desregulada. Assim, de forma a complementar os dados do ensaio de *wound healing* e aprofundar o impacto do 2-acetil-1-naftol no fenótipo tumoral, tornou-se essencial avaliar se o composto interfere com a apoptose e com a progressão do ciclo celular.

A avaliação do impacto do 2-acetil-1-naftol sobre a morte celular revelou uma diminuição significativa da fração de morte celular total a partir de 1 μM , em comparação com o controlo. Contudo, a componente atribuída especificamente à apoptose manteve-se residual e sem diferenças relevantes entre condições, com valores muito próximos dos observados no grupo não tratado. Estes dados sugerem que, após 24 h de exposição, o composto não induziu de forma consistente a via apoptótica clássica em células U251MG. Este resultado contrasta com a maioria dos estudos que avaliaram derivados de naftaleno em células U251MG, nos quais compostos estruturalmente relacionados induziram apoptose de forma clara. Por exemplo, *Lee et al. (2024)* demonstraram que derivados de 1,8-naftalimida induziram significativamente a apoptose em U251, associada à intercalação com DNA e à inibição da atividade da topoisomerase II, levando à ativação de caspases e redução da viabilidade celular (86). De forma semelhante, *Wang et al. (2017)* demonstraram que a juglona, outro derivado de naftoquinona, induziu apoptose robusta em U251, acompanhada de ativação de caspase-3, alterações morfológicas típicas de apoptose, além de inibir a migração celular e a angiogénese (101).

No que respeita à progressão do ciclo celular, a distribuição das células pelas fases G0/G1, S e G2/M não apresentou alterações significativas em nenhuma das concentrações testadas. A ausência de bloqueios específicos no ciclo celular, bem como a manutenção de perfis semelhantes ao controlo, reforçam a ideia de que o 2-acetil-1-naftol não interfere de forma direta com os pontos de *checkpoint* proliferativos nas primeiras 24 h de exposição. Este comportamento difere do observado com outros derivados de naftaleno, que frequentemente induzem bloqueios específicos do ciclo celular, seja na fase



G0/G1 ou G2/M, em células de glioblastomas (97,101). Evidenciando que pequenas alterações estruturais, como a posição e a natureza do grupo acetil presente no 2-acetil-1-naftol, podem modular de forma significativa tanto a indução de apoptose como a interação dos reguladores do ciclo celular, influenciando a capacidade de induzir paragens proliferativas.

Importa, no entanto, discutir as limitações metodológicas desta abordagem. A deteção da apoptose baseou-se na análise da população sub-G1, obtida após fixação com etanol a 70%, permeabilização com Triton X-100, coloração com PI na presença de RNase A. Embora este método seja aceite para a identificação de fragmentação de DNA compatível com apoptose, não é considerado o padrão-ideal, pois pode subestimar eventos precoces ou confundir necrose com apoptose tardia (102,103). Métodos mais específicos, como a dupla marcação com Annexin V/PI ou ensaios de ativação de caspases, permitem uma distinção mais robusta entre diferentes tipos de morte celular e fases da apoptose (102,104). A indisponibilidade deste reagente no presente estudo condicionou a metodologia usada para a análise, pelo que os resultados devem ser interpretados com cautela.

Outra limitação relevante é o tempo de exposição considerado. A avaliação restrita a 24 h não exclui a possibilidade de efeitos apoptóticos tardios ou de alterações transitórias do ciclo celular que possam emergir em período mais longos. Estudos prévios demonstraram que, por vezes, a ativação da apoptose ou a indução de bloqueios do ciclo celular ocorre apenas após 48 h-72 h de tratamento (105,106). Assim, futuras análises em tempos adicionais, bem como a utilização de metodologias complementares, serão fundamentais para clarificar se o 2-acetil-1-naftol pode, em condições específicas, desencadear apoptose ou interferir na maquinaria de progressão do ciclo celular.

Em conjunto, os resultados indicam que, nas condições testadas, o 2-acetil-1-naftol não promove a ativação de vias apoptóticas clássicas nem induz bloqueios detetáveis no ciclo celular em células U251MG. Para além das limitações apontadas, os resultados podem também sugerir que o impacto do composto se manifesta preferencialmente noutros processos, como a viabilidade e a migração celular, já evidenciados nos ensaios anteriores.

A análise transversal dos ensaios realizados evidencia uma convergência funcional clara entre os efeitos do 2-acetil-1-naftol na viabilidade, migração e morte celular das células de glioblastoma U251MG. A concentração de 1 μ M destacou-se como ponto de ação comum nos diferentes testes, revelando simultaneamente uma redução significativa da viabilidade celular e uma inibição precoce da migração, sem indução de apoptose ou bloqueios no ciclo celular. Estes resultados são particularmente relevantes porque sugerem que o composto poderá interferir seletivamente com processos essenciais à sobrevivência e plasticidade tumoral, como a integridade mitocondrial, equilíbrio redox ou a regulação do



citoesqueleto, sem recorrer a mecanismos clássicos de morte celular (95,107,108). Esta ação diferenciada, reforça a hipótese de que o 2-acetil-1-naftol poderá constituir uma nova classe de moduladores do fenótipo tumoral, capaz de modular de forma não convencional o comportamento das células tumorais.

Embora não tenham sido observadas ativações consistentes de apoptose ou alterações no ciclo celular, este comportamento não deve ser interpretado como ausência de efeito, mas antes como uma possibilidade do composto poder induzir estados de quiescência ou senescência celular, fenómenos que não se traduzem imediatamente em morte, mas que comprometem a capacidade proliferativa e invasiva das células (109). A inibição da migração observada nas primeiras 24 h reforça esta hipótese, apontando para uma possível perturbação da adesão celular ou da dinâmica actina/microtúbulos, que são também processos cruciais tanto para a motilidade quanto para a sobrevivência de células tumorais altamente invasivas (50). Já a reversibilidade parcial dos efeitos migratórios às 48 h poderá refletir mecanismos compensatórios ativados pelas células tumorais, como a reprogramação fenotípica ou a ativação de vias de sobrevivência, frequentemente descritas em glioblastoma como estratégias de evasão terapêutica (110,111).

Importa, por fim, destacar que não existem trabalhos publicados acerca da avaliação dos isómeros 1-acetil-2-naftol e 2-acetil-1-naftol em células de glioblastoma, revelando que diferenças estruturais subtis têm impacto marcante na atividade biológica. Entre os dois compostos testados, o 2-acetil-1-naftol destacou-se como o mais promissor, apresentando efeitos consistentes na redução da viabilidade e na modulação da migração tumoral. Estes resultados abrem caminho para investigações futuras, onde o 2-acetil-1-naftol deverá ser explorado em maior detalhe através de ensaios complementares (clonogenicidade, metabolismo, vias de sinalização), em modelos tridimensionais e *in vivo*. Assim, o presente estudo não se limita às observações aqui reportadas, mas estabelece um ponto de partida sólido para considerar o 2-acetil-1-naftol como potencial agente adjuvante em estratégias inovadoras contra o glioblastoma.



6. Conclusão

O glioblastoma continua a ser um dos tumores mais agressivos e resistentes do sistema nervoso central, justificando a procura por novas abordagens terapêuticas. Neste contexto, o presente estudo avaliou, de forma comparativa, os efeitos de dois isómeros acetilados de naftol em células de glioblastoma humano (U251MG).

Em contraste, o 2-acetil-1-naftol apresentou um perfil mais promissor, reduzindo a viabilidade das células U251MG de forma dependente da concentração e do tempo de exposição e inibindo transitoriamente a migração celular, com seletividade relativa em relação às células normais.

Apesar deste efeito, não se observaram alterações relevantes na apoptose clássica nem na progressão do ciclo celular após 24 horas, sugerindo que o impacto do composto poderá depender de mecanismos alternativos ou de tempos de exposição mais prolongados.

De forma global, o 2-acetil-1-naftol surge como uma molécula de interesse preliminar no contexto do glioblastoma, sublinhando que modificações estruturais mínimas, como a posição do grupo acetil, podem redefinir seletividade e mecanismos de ação. Este contributo fornece uma base importante para estudos futuros que explorem o potencial terapêutico deste composto e a sua integração em novas estratégias contra o glioblastoma.



Referências Bibliográficas

1. Lan Z, Li X, Zhang X, Lan Z, Li X, Zhang X. Glioblastoma: An Update in Pathology, Molecular Mechanisms and Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2024 Mar 6 [cited 2025 Aug 30];25(5):3040. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/5/3040/htm>
2. Ostrom QT, Price M, Neff C, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016–2020. *Neuro Oncol* [Internet]. 2023 Oct 4 [cited 2025 Aug 30];25(Supplement_4): iv1–99. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/neuonc/noad149>
3. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2025 Aug 30];23(8):1231–51. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
4. Sipos D, Raposa BL, Freihat O, Simon M, Mekis N, Cornacchione P, et al. Glioblastoma: Clinical Presentation, Multidisciplinary Management, and Long-Term Outcomes. *Cancers* [Internet]. 2025 Jan 5 [cited 2025 Aug 30];17(1):146. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/17/1/146/htm>
5. Kazemi K, Amini A, Omidifar N, Aghabdollahian S, Raei MJ, Gholami A. Empowering rapid diagnosis and treatment of glioblastoma with biofunctionalized carbon quantum dots: a review. *Cancer Nanotechnology* [Internet]. 2025 Mar 14 [cited 2025 Aug 30];16(1):1–32. Available from: <https://cancer-nano.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12645-025-00317-2>
6. Pellerino A, Caccese M, Padovan M, Cerretti G, Lombardi G. Epidemiology, risk factors, and prognostic factors of gliomas. *Clin Transl Imaging* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2025 Aug 30];10(5):467–75. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40336-022-00489-6>
7. Roda D, Veiga P, Melo JB, Carreira IM, Ribeiro IP. Principles in the Management of Glioblastoma. *Genes* [Internet]. 2024 Apr 17 [cited 2025 Aug 30];15(4):501. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/15/4/501/htm>
8. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers* [Internet]. 2022 May 13 [cited 2025 Aug 30];14(10):2412. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/10/2412/htm>



9. Rong L, Li N, Zhang Z. Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* [Internet]. 2022 Apr 15 [cited 2025 Aug 30];41(1):1–18. Available from: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-022-02349-7>
10. Li X, Kim HJ, Yoo J, Lee Y, Nam CH, Park J, et al. Distant origin of glioblastoma recurrence: neural stem cells in the subventricular zone serve as a source of tumor reconstruction after primary resection. *Mol Cancer* [Internet]. 2025 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];24(1):1–17. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12943-025-02273-2>
11. Obrador E, Moreno-Murciano P, Oriol-Caballo M, López-Blanch R, Pineda B, Gutiérrez-Arroyo JL, et al. Glioblastoma Therapy: Past, Present and Future. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2024 Feb 21 [cited 2025 Aug 30];25(5):2529. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/5/2529/htm>
12. Kan LK, Drummond K, Hunn M, Williams D, O'Brien TJ, Monif M. Potential biomarkers and challenges in glioma diagnosis, therapy and prognosis. *BMJ Neurol Open* [Internet]. 2020 Aug 24 [cited 2025 Aug 30];2(2):69. Available from: <https://neurologyopen.bmj.com/content/2/2/e000069>
13. Nguyen HM, Guz-montgomery K, Lowe DB, Saha D. Pathogenetic Features and Current Management of Glioblastoma. *Cancers* [Internet]. 2021 Feb 18 [cited 2025 Aug 30];13(4):856. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/4/856/htm>
14. Velásquez C, Mansouri S, Mora C, Nassiri F, Suppiah S, Martino J, et al. Molecular and Clinical Insights into the Invasive Capacity of Glioblastoma Cells. *J Oncol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Aug 30];2019(1):1740763. Available from: <https://doi/pdf/10.1155/2019/1740763>
15. White J, White MPJ, Wickremesekera A, Peng L, Gray C. The tumour microenvironment, treatment resistance and recurrence in glioblastoma. *Journal of Translational Medicine* [Internet]. 2024 Jun 6 [cited 2025 Aug 30];22(1):1–14. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-024-05301-9>
16. Li S, Dong L, Pan Z, Yang G. Targeting the neural stem cells in subventricular zone for the treatment of glioblastoma: an update from preclinical evidence to clinical interventions. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];14(1):1–11. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-023-03325-4>



17. Sahoo OS, Mitra R, Nagaiah NKH. The hidden architects of glioblastoma multiforme: Glioma stem cells. *MedComm – Oncology* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2025 Aug 30];3(1):e66. Available from: <https://doi/pdf/10.1002/mog2.66>
18. Loras A, Gonzalez-Bonet LG, Gutierrez-Arroyo JL, Martinez-Cadenas C, Marques-Torrejon MA. Neural Stem Cells as Potential Glioblastoma Cells of Origin. *Life* [Internet]. 2023 Mar 29 [cited 2025 Aug 30];13(4):905. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/4/905/htm>
19. Ismailov A, Spallone A, Belogurov A, Herbert A, Poptsova M. Molecular biology of the deadliest cancer – glioblastoma: what do we know? *Front Immunol* [Internet]. 2025 Mar 21 [cited 2025 Aug 30];16:1530305. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11968700/>
20. Tilak M, Holborn J, New LA, Lalonde J, Jones N. Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Targeting in Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021 Feb 12 [cited 2025 Aug 30];22(4):1831. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1831/htm>
21. Chiariello M, Inzalaco G, Barone V, Gherardini L. Overcoming challenges in glioblastoma treatment: targeting infiltrating cancer cells and harnessing the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2023 Dec 21 [cited 2025 Aug 30];17:1327621. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10767996/>
22. Shah JL, Li GH, Soltys SG. Glioblastoma Multiforme. *CyberKnife Stereotactic Radiosurgery: Brain* [Internet]. 2024 May 6 [cited 2025 Aug 30];1:85–98. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558954/>
23. Kim HJ, Park JW, Lee JH. Genetic Architectures and Cell-of-Origin in Glioblastoma. *Front Oncol* [Internet]. 2021 Jan 21 [cited 2025 Aug 30];10:615400. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2020.615400/full>
24. Sherman JH, Bobak A, Arsiwala T, Lockman P, Aulakh S. Targeting drug resistance in glioblastoma (Review). *Int J Oncol* [Internet]. 24 Jul 9 [cited 2025 Aug 30];65(2):80. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2024.5668#b10-ijo-65-02-05668>
25. Dakal TC, Kakde GS, Maurya PK. Genomic, epigenomic and transcriptomic landscape of glioblastoma. *Metabolic Brain Disease* [Internet]. 2024 Aug 24 [cited 2025 Aug 30];39(8):1591–611. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11011-024-01414-8>
26. Pouyan A, Ghorbanlo M, Eslami M, Jahanshahi M, Ziaei E, Salami A, et al. Glioblastoma multiforme: insights into pathogenesis, key signaling pathways, and therapeutic strategies. *Molecular Cancer*



- [Internet]. 2025 Feb 26 [cited 2025 Aug 30];24(1):1–51. Available from: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-025-02267-0>
27. Zhang Y, Dube C, Gibert M, Cruickshanks N, Wang B, Coughlan M, et al. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2025 Aug 30];10(9):297. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/10/9/297/htm>
 28. Guo X, Gu L, Li Y, Zheng Z, Chen W, Wang Y, et al. Histological and molecular glioblastoma, IDH-wildtype: a real-world landscape using the 2021 WHO classification of central nervous system tumors. *Front Oncol* [Internet]. 2023 Jul 6 [cited 2025 Aug 30];13:1200815. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2023.1200815/full>
 29. Seker-Polat F, Degirmenci NP, Solaroglu I, Bagci-Onder T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2025 Aug 30];14(2):443. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8773542/>
 30. Erices JI, Bizama C, Niechi I, Uribe D, Rosales A, Fabres K, et al. Glioblastoma Microenvironment and Invasiveness: New Insights and Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2025 Aug 30];24(8):7047. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10139189/>
 31. Kurdi M, Baeesa S, Okal F, Bamaga AK, Faizo E, Fathaddin AA, et al. Extracranial metastasis of brain glioblastoma outside CNS: Pathogenesis revisited. *Cancer Rep* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];6(12):1905. Available from: <https://doi/pdf/10.1002/cnr2.1905>
 32. Li J, Feng L, Lu Y. Glioblastoma multiforme: Diagnosis, treatment, and invasion. *J Biomed Res* [Internet]. 2022 Oct 28 [cited 2025 Aug 30];37(1):47. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9898042/>
 33. Ohnishi T. Current Status and Future Perspective in Glioma Invasion Research. *Brain Sciences* [Internet]. 2024 Mar 26 [cited 2025 Aug 30];14(4):309. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3425/14/4/309/htm>
 34. Da Ros M, De Gregorio V, Iorio AL, Giunti L, Guidi M, de Martino M, et al. Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2018 Sep 22 [cited 2025 Aug 30];19(10):2879. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/10/2879/htm>
 35. Cortes Ballen AI, Amosu M, Ravinder S, Chan J, Derin E, Slika H, et al. Metabolic Reprogramming in Glioblastoma Multiforme: A Review of Pathways and Therapeutic Targets. *Cells* [Internet]. 2024



- Sep 19 [cited 2025 Aug 30];13(18):1574. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/18/1574/htm>
36. Mosteiro A, Pedrosa L, Ferrés A, Diao D, Sierra À, González JJ. The Vascular Microenvironment in Glioblastoma: A Comprehensive Review. *Biomedicines* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2025 Aug 30];10(6):1285. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9219822/>
 37. Nowacka A, Śniegocki M, Smuczyński W, Bożiłow D, Ziółkowska E. Angiogenesis in Glioblastoma—Treatment Approaches. *Cells* [Internet]. 2025 Mar 11 [cited 2025 Aug 30];14(6):407. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/14/6/407/htm>
 38. Xu J, Shi P, Yang L, Cui H. Basic mechanism of mobilizing cell movement during invasion of glioblastoma and target selection of targeted therapy. *J Adv Res* [Internet]. 2025 May 8 [cited 2025 Aug 30]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123225002863>
 39. Colella B, Faienza F, Di Bartolomeo S. EMT Regulation by Autophagy: A New Perspective in Glioblastoma Biology. *Cancers* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2025 Aug 30];11(3):312. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6468412/>
 40. Iwadate Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2025 Aug 30];11(3):1615. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4774466/>
 41. Crivii CB, Boşca AB, Melincovici CS, Constantin AM, Mărginean M, Dronca E, et al. Glioblastoma Microenvironment and Cellular Interactions. *Cancers* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2025 Aug 30];14(4):1092. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8870579/>
 42. Vollmann-Zwerenz A, Leidgens V, Feliciello G, Klein CA, Hau P. Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2020 Mar 12 [cited 2025 Aug 30];21(6):1932. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/1932/htm>
 43. Liu CA, Chang CY, Hsueh KW, Su HL, Chiou TW, Lin SZ, et al. Migration/Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Therapeutic Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2018 Apr 8 [cited 2025 Aug 30];19(4):1115. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/1115/htm>
 44. Wu L, Chai R, Lin Z, Wu R, Yao D, Jiang T, et al. Evolution-driven crosstalk between glioblastoma and the tumor microenvironment. *Cancer Biol Med* [Internet]. 2023 May 15 [cited 2025 Aug 30];20(5):319. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10246441/>



45. Yuile A, Wei JQ, Mohan AA, Hotchkiss KM, Khasraw M. Interdependencies of the Neuronal, Immune and Tumor Microenvironment in Gliomas. *Cancers* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2025 Aug 30];15(10):2856. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10216320/>
46. Ellert-Miklaszewska A, Poleszak K, Pasierbinska M, Kaminska B. Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2020 Jan 30 [cited 2025 Aug 30];21(3):888. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/888/htm>
47. So JS, Kim H, Han KS. Mechanisms of Invasion in Glioblastoma: Extracellular Matrix, Ca²⁺ Signaling, and Glutamate. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2021 Jun 2 [cited 2025 Aug 30];15:663092. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2021.663092/full>
48. Marino S, Menna G, Di Bonaventura R, Lisi L, Mattogno P, Figà F, et al. The Extracellular Matrix in Glioblastomas: A Glance at Its Structural Modifications in Shaping the Tumoral Microenvironment—A Systematic Review. *Cancers* [Internet]. 2023 Mar 21 [cited 2025 Aug 30];15(6):1879. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/6/1879/htm>
49. Percuoco V, Herlin E, Prada F, Riva M, Pessina F, Staartjes VE, et al. Glioblastoma invasion patterns from a clinical perspective—a systematic review. *Neurosurg Rev* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];47(1):1–20. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10143-024-02944-6>
50. Keller M, Blom M, Conze LL, Guo M, Hägerstrand D, Aspenström P. Altered cytoskeletal status in the transition from proneural to mesenchymal glioblastoma subtypes. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];12(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-14063-7>
51. Becker KN, Pettee KM, Sugrue A, Reinard KA, Schroeder JL, Eisenmann KM. The Cytoskeleton Effectors Rho-Kinase (ROCK) and Mammalian Diaphanous-Related (mDia) Formin Have Dynamic Roles in Tumor Microtubule Formation in Invasive Glioblastoma Cells. *Cells* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 Aug 30];11(9):1559. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9103681/>
52. Al-Koussa H, Atat O El, Jaafar L, Tashjian H, El-Sibai M. The Role of Rho GTPases in Motility and Invasion of Glioblastoma Cells. *Anal Cell Pathol (Amst)* [Internet]. 2020 Jan 31 [cited 2025 Aug 30];2020:9274016. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7013281/>



53. Angom RS, Nakka NMR, Bhattacharya S. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. *Brain Sci* [Internet]. 2023 Nov 1 [cited 2025 Aug 30];13(11):1536. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10669378/>
54. Bae WH, Maraka S, Daher A. Challenges and advances in glioblastoma targeted therapy: the promise of drug repurposing and biomarker exploration. *Front Oncol* [Internet]. 2024 Oct 8 [cited 2025 Aug 30];14:1441460. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1441460/full>
55. Rodgers LT, Villano JL, Hartz AMS, Bauer B. Glioblastoma Standard of Care: Effects on Tumor Evolution and Reverse Translation in Preclinical Models. *Cancers* [Internet]. 2024 Jul 24 [cited 2025 Aug 30];16(15):2638. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/15/2638/htm>
56. McMahon DJ, Gleeson JP, O'Reilly S, Bambury RM. Management of newly diagnosed glioblastoma multiforme: current state of the art and emerging therapeutic approaches. *Medical Oncology* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2025 Aug 30];39(9):1–12. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12032-022-01708-w>
57. Liguori GL. Challenges and Promise for Glioblastoma Treatment through Extracellular Vesicle Inquiry. *Cells* [Internet]. 2024 Feb 13 [cited 2025 Aug 30];13(4):336. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/4/336/htm>
58. Yalamarty SSK, Filipczak N, Li X, Subhan MA, Parveen F, Ataide JA, et al. Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). *Cancers* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2025 Aug 30];15(7):2116. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10093719/>
59. Nabian N, Ghalehtaki R, Zeinalizadeh M, Balaña C, Jablonska PA. State of the neoadjuvant therapy for glioblastoma multiforme—Where do we stand?. *Neurooncol Adv* [Internet]. 2024 Jan 1 [cited 2025 Aug 30];6(1). Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/naajnl/vdae028>
60. Cruz N, Herculano-Carvalho M, Roque D, Faria CC, Cascão R, Ferreira HA, et al. Highlighted Advances in Therapies for Difficult-To-Treat Brain Tumours Such as Glioblastoma. *Pharmaceutics* [Internet]. 2023 Mar 13 [cited 2025 Aug 30];15(3):928. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/3/928/htm>
61. Chang C, Chavarro VS, Gerstl JVE, Blitz SE, Spanehl L, Dubinski D, et al. Recurrent Glioblastoma—Molecular Underpinnings and Evolving Treatment Paradigms. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Jun 1



- [cited 2025 Aug 30];25(12):6733. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11203521/>
62. Shah S. Novel Therapies in Glioblastoma Treatment: Review of Glioblastoma; Current Treatment Options; and Novel Oncolytic Viral Therapies. *Medical Sciences* [Internet]. 2023 Dec 23 [cited 2025 Aug 30];12(1):1. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3271/12/1/1/htm>
63. Tang J, Karbhari N, Campian JL. Therapeutic Targets in Glioblastoma: Molecular Pathways, Emerging Strategies, and Future Directions. *Cells* [Internet]. 2025 Mar 26 [cited 2025 Aug 30];14(7):494. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/14/7/494/htm>
64. Manoharan VT, Abdelkareem A, Gill G, Brown S, Gillmor A, Hall C, et al. Spatiotemporal modeling reveals high-resolution invasion states in glioblastoma. *Genome Biol* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];25(1):1–32. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-024-03407-3>
65. Sacko O, Benouaich-Amiel A, Brandicourt P, Niaré M, Charni S, Cavandoli C, et al. The Impact of Surgery on the Survival of Patients with Recurrent Glioblastoma. *Asian J Neurosurg* [Internet]. 2021 Mar [cited 2025 Aug 30];16(1):1. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8202372/>
66. Burko P, D'Amico G, Miltykh I, Scalia F, Conway de Macario E, Macario AJL, et al. Molecular Pathways Implicated in Radioresistance of Glioblastoma Multiforme: What Is the Role of Extracellular Vesicles? *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2023 Mar 2 [cited 2025 Aug 30];24(5):4883. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4883/htm>
67. Rončević AR, Koruga N, Soldo Koruga A, Rončević RR. Why Do Glioblastoma Treatments Fail? *Future Pharmacology* [Internet]. 2025 Feb 1 [cited 2025 Aug 30];5(1):7. Available from: <https://www.mdpi.com/2673-9879/5/1/7/htm>
68. Minniti G, Niyazi M, Alongi F, Navarra P, Belka C. Current status and recent advances in reirradiation of glioblastoma. *Radiation Oncology* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];16(1):1–14. Available from: <https://ro-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13014-021-01767-9>
69. Soffietti R, Pellerino A, Bruno F, Mauro A, Rudà R. Neurotoxicity from Old and New Radiation Treatments for Brain Tumors. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2025 Aug 30];24(13):10669. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10342178/>



70. Mendes M, António M, Daniel-Da-Silva AL, Sereno J, Oliveira R, Arnaut LG, et al. A switch-on chemo-photothermal nanotherapy impairs glioblastoma. *Mater Horiz* [Internet]. 2025 Jun 30 [cited 2025 Aug 30];12(13):4771–87. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2025/mh/d5mh00351b>
71. Tang L, Feng Y, Gao S, Mu Q, Liu C. Nanotherapeutics Overcoming the Blood-Brain Barrier for Glioblastoma Treatment. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021 Nov 25 [cited 2025 Aug 30];12:786700. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8655904/>
72. Noorani I, de la Rosa J. Breaking barriers for glioblastoma with a path to enhanced drug delivery. *Nat Commun* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];14(1):1–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-41694-9>
73. Giantini-Larsen AM, Pandey A, Garton ALA, Rampichini M, Winston G, Goldberg JL, et al. Therapeutic manipulation and bypass of the blood-brain barrier: powerful tools in glioma treatment. *Neurooncol Adv* [Internet]. 2025 Jan 6 [cited 2025 Aug 30];7(1):2025. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/naajnl/vdae201>
74. Cruz JVR, Batista C, Afonso B de H, Alexandre-Moreira MS, Dubois LG, Pontes B, et al. Obstacles to Glioblastoma Treatment Two Decades after Temozolomide. *Cancers* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2025 Aug 30];14(13):3203. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9265128/>
75. Liu Y, Zhou F, Ali H, Lathia JD, Chen P. Immunotherapy for glioblastoma: current state, challenges, and future perspectives. *Cellular & Molecular Immunology* [Internet]. 2024 Oct 15 [cited 2025 Aug 30];21(12):1354–75. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41423-024-01226-x>
76. Mathew-Schmitt S, Peindl M, Neundorf P, Dandekar G, Metzger M, Nickl V, et al. Blood-tumor barrier in focus - investigation of glioblastoma-induced effects on the blood-brain barrier. *J Neurooncol* [Internet]. 2024 Oct 1 [cited 2025 Aug 30];170(1):67–77. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11060-024-04760-w>
77. Thombre R, Mess G, Kempinski Leadingham KM, Kapoor S, Hersh A, Acord M, et al. Towards standardization of the parameters for opening the blood-brain barrier with focused ultrasound to treat glioblastoma multiforme: A systematic review of the devices, animal models, and therapeutic compounds used in rodent tumor models. *Front Oncol* [Internet]. 2022 Feb 16 [cited 2025 Aug 30];12:1072780. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.1072780/full>



78. Zhou Y, Shi F, Zhu J, Yuan Y. An update on the clinical trial research of immunotherapy for glioblastoma. *Front Immunol* [Internet]. 2025 May 2 [cited 2025 Aug 30];16:1582296. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2025.1582296/full>
79. Ma K, Hu P. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Glioblastoma. *Cancers* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];15(23):5652. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10705370/>
80. Carpentier A, Stupp R, Sonabend AM, Dufour H, Chinot O, Mathon B, et al. Repeated blood–brain barrier opening with a nine–emitter implantable ultrasound device in combination with carboplatin in recurrent glioblastoma: a phase I/II clinical trial. *Nat Commun* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];15(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-45818-7>
81. Duan M, Cao R, Yang Y, Chen X, Liu L, Ren B, et al. Blood–Brain Barrier Conquest in Glioblastoma Nanomedicine: Strategies, Clinical Advances, and Emerging Challenges. *Cancers* [Internet]. 2024 Oct 1 [cited 2025 Aug 30];16(19):3300. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11475686/>
82. Weller J, Potthoff AL, Zeyen T, Schaub C, Duffy C, Schneider M, et al. Current status of precision oncology in adult glioblastoma. *Mol Oncol* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];18(12):2927. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11619805/>
83. Khalighi S, Reddy K, Midya A, Pandav KB, Madabhushi A, Abedalthagafi M. Artificial intelligence in neuro–oncology: advances and challenges in brain tumor diagnosis, prognosis, and precision treatment. *NPJ Precis Oncol* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Aug 30];8(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41698-024-00575-0>
84. Luo L, Jia JJ, Zhong Q, Zhong X, Zheng S, Wang G, et al. Synthesis and anticancer activity evaluation of naphthalene–substituted triazole spirodienones. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2020 Mar 5 [cited 2025 Aug 30];213:113039. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8569940/>
85. Vasudha D, Jagadeesh A, Konidala SK, Yasin H, Mali SN, Bhandare RR, et al. Development of Orally Active Anti-Inflammatory Agents: In Vivo and In Silico Analysis of Naphthalene–Chalcone Derivatives Based on 2–Acetyl–6–Methoxy Naphthalene. *Chemical Physics Impact* [Internet]. 2024 Jun 1 [cited 2025 Aug 30];8:100472. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667022424000161>



86. Lee CC, Chang CH, Huang YC, Shih TL. Novel 1,8-Naphthalimide Derivatives Inhibit Growth and Induce Apoptosis in Human Glioblastoma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2025 Aug 30];25(21):11593. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11546702/>
87. Sumiyoshi A, Shibata S, Lazarova D, Zhelev Z, Aoki I, Bakalova R. Tolerable treatment of glioblastoma with redox-cycling ‘mitocans’’: a comparative study in vivo. *Redox Rep* [Internet]. 2023 Aug 15 [cited 2025 Aug 30];28(1):2220531. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10435007/>
88. Lin KH, Li JY, Chen RJ, Wang YJ, Wang HH, Peng HY, et al. Naphthalimide derivative attenuates tumor growth of wild-type p53-expressing U87 glioma cells in vitro and in vivo through a biphasic dose-dependent mechanism: A switch from cell cycle to apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2025 Jun 1 [cited 2025 Aug 30];187:118097. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332225002914>
89. Zhan S, Lu L, Pan S shan, Wei X qian, Miao R rong, Liu X hui, et al. Targeting NQO1/GPX4-mediated ferroptosis by plumbagin suppresses in vitro and in vivo glioma growth. *Br J Cancer* [Internet]. 2022 Jul 20 [cited 2025 Aug 30];127(2):364. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9296534/>
90. Shinkai VMT, Sampaio IMO, dos Santos EG, Galué-Parra AJ, Ferreira DP, Baliza DDMS, et al. In Vitro Cytotoxic Effects and Mechanisms of Action of Eleutherine Isolated from *Eleutherine plicata* Bulb in Rat Glioma C6 Cells. *Molecules* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Sep 17];27(24):8850. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/24/8850/htm>
91. Xu L, Ma H, An X, Li Y, Zhang Q, Liu X, et al. Total synthesis, structure revision and cytotoxic activity of Sch 53825 and its derivatives. *RSC Advances* [Internet]. 2022 Jun 14 [cited 2025 Sep 17];12:17629-36. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/ra/d2ra02898k>
92. Freitas VLS, Ribeiro da Silva MDMC. Structural and Energetic Insights on Two Dye Compounds: 1-Acetyl-2-Naphthol and 2-Acetyl-1-Naphthol. *Molecules* [Internet]. 2020 Aug 22 [cited 2025 Sep 17];25(17):3827. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/17/3827/htm>
93. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Sep 17];22(23):12827. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8657538/>
94. Varankar SS, Bapat SA. Migratory metrics of wound healing: A Quantification Approach for in vitro Scratch Assays. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Dec 18 [cited 2025 Sep 26];8:426246. Available



from:

<https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2018.00633/full>

95. Santoro F, Merlino F, Brancaccio D, Camerino I, Belli S, Cimmino A, et al. Glioblastoma Cell Migration, Invasion and Vasculogenic Mimicry Downmodulated by Novel uPAcyclin Derivatives. *Cells* [Internet]. 2025 Feb 1 [cited 2025 Sep 23];14(4):259. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/14/4/259/htm>
96. Yuan C, Liao Y, Liao S, Huang M, Li D, Wu W, et al. Triptolide inhibits the progression of Glioblastoma U251 cells via targeting PROX1. *Front Oncol* [Internet]. 2023 Mar 10 [cited 2025 Sep 17];13:1077640. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10038275/>
97. Zhang J, Fu M, Wu J, Fan F, Zhang X, Li C, et al. The Anti-Glioma Effect of Juglone Derivatives through ROS Generation. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 Jun 14 [cited 2025 Sep 17];13:911760. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9237211/>
98. Liu Y, Chen Y, Zhu R, Xu L, Xie HQ, Zhao B. Rutaecarpine Inhibits U87 Glioblastoma Cell Migration by Activating the Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathway. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2021 Dec 9 [cited 2025 Sep 23];14:765712. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2021.765712/full>
99. Franco P, Camerino I, Merlino F, D'Angelo M, Cimmino A, Carotenuto A, et al. α V-Integrin-Dependent Inhibition of Glioblastoma Cell Migration, Invasion and Vasculogenic Mimicry by the uPAcyclin Decapeptide. *Cancers* [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2025 Sep 23];15(19):4775. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/19/4775/htm>
100. Chen Y, Xu X, Ding K, Tang T, Cai F, Zhang H, et al. TRIM25 promotes glioblastoma cell growth and invasion via regulation of the PRMT1/c-MYC pathway by targeting the splicing factor NONO. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Sep 23];43(1):1–17. Available from: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-024-02964-6>
101. Wang J, Liu K, Wang XF, Sun DJ. Juglone reduces growth and migration of U251 glioblastoma cells and disrupts angiogenesis. *Oncol Rep* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2025 Sep 17];38(4):1959. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5652942/>
102. Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis* [Internet].



- 2022 Aug 1 [cited 2025 Sep 23];27(7–8):482. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9308588/>
103. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* [Internet]. 2006 Aug 9 [cited 2025 Sep 23];1(3):1458–61. Available from: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.238>
104. Martinez MM, Reif RD, Pappas D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods* [Internet]. 2010 Jul 3 [cited 2025 Sep 23];2(8):996–1004. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/ay/c0ay00247j>
105. Zhang X, Zhao L, Xiao J, Wang Y, Li Y, Zhu C, et al. 5-Demethylnobiletin mediates cell cycle arrest and apoptosis via the ERK1/2/AKT/STAT3 signaling pathways in glioblastoma cells. *Front Oncol* [Internet]. 2023 Apr 17 [cited 2025 Sep 23];13:1143664. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2023.1143664/full>
106. Liu J, Zhang Y, Chen L, Yu F, Li X, Tao D, et al. Polyphyllin I induces G2/M phase arrest and apoptosis in U251 human glioma cells via mitochondrial dysfunction and the JNK signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2025 Sep 23];49(6):479–86. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmx033>
107. Esteban-Román NF, Taddei E, Castro-Velázquez E, Villafuentes-Vidal L, Velez-Herrera A, Rubio-Osornio M, et al. Redox-Regulated Pathways in Glioblastoma Stem-like Cells: Mechanistic Insights and Therapeutic Implications. *Brain Sciences* [Internet]. 2025 Aug 19 [cited 2025 Sep 24];15(8):884. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3425/15/8/884/htm>
108. Li W, Xu X. Advances in mitophagy and mitochondrial apoptosis pathway-related drugs in glioblastoma treatment. *Front Pharmacol* [Internet]. 2023 Jun 30 [cited 2025 Sep 24];14:1211719. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2023.1211719/full>
109. Hajimohammadebrahim-Ketabforoush M, Zali A, Shahmohammadi M, Hamidieh AA. Metformin and its potential influence on cell fate decision between apoptosis and senescence in cancer, with a special emphasis on glioblastoma. *Front Oncol* [Internet]. 2024 Aug 29 [cited 2025 Sep 24];14:1455492. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1455492/full>
110. Amirmahani F, Kumar S, Muthukrishnan SD. Epigenetic mechanisms of plasticity and resistance in glioblastoma: therapeutic targets and implications. *Frontiers in Epigenetics and Epigenomics*



- [Internet]. 2025 May 16 [cited 2025 Sep 24];3:1519449. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/epigenetics-and-epigenomics/articles/10.3389/freae.2025.1519449/full>
111. Yabo YA, Niclou SP, Golebiewska A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro Oncol* [Internet]. 2022 May 4 [cited 2025 Sep 24];24(5):669–82. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/neuonc/noab269>
112. ChemSpider: Pesquisa e compartilhe química - Página inicial [Internet]. [cited 2025 Sep 24]. Available from: <https://www.chemspider.com/>



P. PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

BIOQUÍMICA EM SAÚDE