

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIENCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIENCIAS DA SAUDE**

ADALISA REINKE

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES
REATIVAS DE OXIGENIO DE CÉLULAS GL261 EXPOSTAS A TEMOZOLAMIDA
ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO.**

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2019

ADALISA REINKE

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES
REATIVAS DE OXIGENIO DE CÉLULAS GL261 EXPOSTAS A TEMOZOLAMIDA
ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO.**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coorientador: Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R372a Reinke, Adalisa.

Avaliação da viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio de células GL261 expostas a temozolamida associada a nanopartículas de ouro / Adalisa Reinke. - 2019.

43 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Felipe Dal Pizzol.

Coorientação: Cesar Lock Silveira.

1. Glioblastoma - Tratamento. 2. Temozolamida - Uso terapêutico. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Felipe Dal Pizzol e ao meu Coorientador Dr. Paulo Lock Silveira pelos dois anos e meio que tive de orientação.

Agradeço também aos alunos do Laboratório de Fisiopatologia Experimental, em especial a Giulia e ao Jonathann que me ajudaram na execução deste projeto. Meu muito obrigada.

RESUMO

Dentre as neoplasias malignas, as que ocorrem no sistema nervoso central (SNC), representam um grande desafio para a oncologia clínica e para a pesquisa. O glioblastoma é um glioma de grau IV, caracterizado por alta malignidade, presença de necrose (células mortas) e o aumento de vasos sanguíneos em torno do tumor. Dentre os tratamentos existentes está o uso de Temozolamida na quimioterapia, que embora possa causar toxicidade hematológica e náusea, tem um perfil de efeito colateral mais favorável do que outros regimes quimioterápicos comumente usados. No entanto, por razões que ainda precisam ser elucidadas, a resposta clínica não é totalmente eficiente, requerendo ainda investigação sob o efeito exato da TMZ na malignidade das células de glioblastoma. Em adição a isso, o ouro, em porções nanométricas (NPAu) tem apresentado propriedades anticancerígenas e antioxidantes. Com isso o objetivo desse estudo foi verificar o efeito da temozolamida associada ou não a nanopartículas de ouro sobre células GL261. Células GL261 foram cultivadas em meio DMEM em placas de 96 poços durante 24h. Em seguida foi adicionado TMZ e/ou NPAu em diferentes concentrações e incubadas por mais 24h a 37°C. 24h após foi avaliado a viabilidade celular através do MTT e a produção de ERO através de DCF. Nossos resultados mostraram que quando o TMZ foi associado as NPAu, todas as concentrações utilizadas fizeram com que houvesse uma redução na viabilidade celular e um aumento na produção de ERO quando utilizada a concentração de 250 uM/ml + 7,8 ug/ml. Tomados em conjunto nossos dados sugerem que o TMZ tem seu efeito potencializado quando associado as NPAu, no entanto ainda são necessários mais estudos testando outras concentrações e outros parâmetros envolvidos.

Palavras-chave: glioblastoma, temozolamida, nanopartículas de ouro, citotoxicidade, MTT.

ABSTRACT

Among the malignancies, those that occur in the central nervous system (CNS), represent a major challenge for clinical oncology and research. Glioblastoma is a grade IV glioma characterized by high malignancy, presence of necrosis (dead cells) and enlargement of blood vessels around the tumor. Among existing treatments is the use of Temozolamide in chemotherapy, which although may cause hematological toxicity and nausea, has a more favorable side effect profile than other commonly used chemotherapy regimens. However, for reasons that still need to be elucidated, the clinical response is not fully efficient, requiring further investigation into the exact effect of TMZ on glioblastoma cell malignancy. In addition to this, gold in nanometric portions (NPAu) has shown anticancer and antioxidant properties. Thus, the aim of this study was to verify the effect of temozolamide associated or not with gold nanoparticles on GL261 cells. GL261 cells were cultured in DMEM in 96-well plates for 24h. TMZ and / or NPAu were then added at different concentrations and incubated for an additional 24h at 37°C. 24h later cell viability by MTT and ROS production by DCF were evaluated. Our results showed that when TMZ was associated with NPAu, all concentrations used resulted in a reduction in cell viability and an increase in ROS production when 250 uM / ml + 7.8 ug / ml were used. Taken together, our data suggest that TMZ has its potentiated effect when associated with NPAu, however further studies are needed to test other concentrations and other parameters involved.

Keyword: glioblastoma, temozolamida, gold nanoparticles, cytotoxicity, MTT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Viabilidade celular de células GL261 quando tratadas com TMZ nas concentrações de 500, 250, 100 e 50 uM/ml por 24h.....	22
Figura 2: Viabilidade celular de células GL261 quando tratadas com NPAu nas concentrações de 65, 23,3, 7,8, 2,6 ug/ml por 24h.....	23
Figura 3: Viabilidade celular de células GL261 quando tratadas com TMZ + NPAu nas concentrações de 500uM de TMZ + 2,6 ug/ml de NPAu, 250uM de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu, 100uM de tmz + 23,3 ug/ml e 50uM e 65 ug/ml por 24hr.....	24
Figura 4: Produção de espécies reativas de oxigênio em células GL261 quando tratadas com TMZ nas concentrações de 500, 250, 100 e 50 uM/ml por 24h.....	25
Figura 5: Produção de espécies reativas de oxigênio em células GL261 quando tratadas com NPAu nas concentrações de 65, 23,3, 7,8, 2,6 ug/ml por 24h.....	26
Figura 6: Produção de espécies reativas de oxigênio em células GL261 quando tratadas com TMZ + NPAu nas concentrações de 500uM de TMZ + 2,6 ug/ml de NPAu, 250uM de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu, 100uM de tmz + 23,3 ug/ml e 50uM e 65 ug/ml por 24hr.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações utilizadas de Temozolamida, Nanopartículas de Ouro de 20nm e a associação das duas em células GL261.....	21
Tabela 2: Análise comparativa dos dados obtidos em termos de porcentagem de viabilidade celular das células GL261 quando exposta ao TMZ, NPAu e a associação de ambos em diferentes concentrações.....	24
Tabela 3: Análise comparativa dos dados obtidos em termos de porcentagem de produção de ERO em células GL261 quando exposta ao TMZ, NPAu e a associação de ambos em diferentes concentrações.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE – Barreira hematoencefálica

DCF - Diclorofluoreceína

DMEM - Meio modificado por Dulbecco's, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EGF - Fator de crescimento epidérmico, do inglês *Epidermal growth factor*

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ESMO - Sociedade Europeia de Oncologia Médica, do inglês *European Society for Medical Oncology*

GBM - Glioblastoma

HRT – Terapia de radiação hipofracionada, do inglês *Hypofractionated radiation therapy*

INCA – Instituto nacional do câncer

MTT - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 1,3-diphenylformazan

NCCN - Rede Nacional Abrangente de Câncer, do inglês *National comprehensive cancer network*

NF-κB - Fator nuclear kappa B, do inglês *Nuclear factor kappa B*

NPAu – Nanopartículas de ouro

PBS - Tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*

SNC – Sistema nervoso central

TMZ – Temozolamida

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 GLIOBLASTOMA.....	12
1.2 TRATAMENTOS.....	13
1.2.1 Temozolamida.....	15
1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 METODOLOGIA.....	20
3.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	20
3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	20
3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	21
3.4 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	22
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
4 RESULTADOS.....	23
4.1 VIABILIDADE CELULAR.....	23
4.2 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	26
5 DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Ainda que o avanço na medicina tenha sido considerável nas últimas décadas, o diagnóstico precoce, a terapia adequada e um resultado promissor para pacientes com câncer continuam a ser grandes desafios. Sendo assim, o câncer ainda representa uma das principais preocupações de saúde pública, por apresentar alta complexidade e ser uma doença muito agressiva (Kaufmann e Chiocca, 2014; Zottel et al., 2019). A estimativa para o Brasil (2018/2019) indica a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano (INCA, 2018).

Quanto a malignidade, um câncer pode ser caracterizado como benigno quando células desordenadas crescem em apenas um local específico do corpo, de forma devagar, e trazem semelhanças aos tecidos originais. Esse tipo de câncer raramente constitui risco de morte. Já um câncer caracterizado como maligno, apresenta um crescimento desordenado e incontrolável das células, em grande quantidade e agressivo, o que deixa a pessoa debilitada e, em grande parte dos casos, traz risco de morte a curto, médio ou longo prazo, conforme as condições clínicas e avanço da doença em cada situação (Ministério da Saúde, 2019).

Dentre as neoplasias malignas, as que ocorrem no sistema nervoso central (SNC), representam um grande desafio para a oncologia clínica e para a pesquisa. A mortalidade dos pacientes com cânceres do SNC é uma das mais altas entre todos os cânceres, já que estes têm morfologia complexa e são relativamente resistentes ao tratamento (Bailey et al., 2018; Zottel et al., 2019). Para o Brasil a estimativa para o biênio 2018-2019 é de 5,62 casos novos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres, correspondendo à décima e à nona posições, respectivamente (INCA, 2018).

Como a neoplasia mais frequente dentre os tumores do SNC, tem-se os gliomas. Histologicamente, são classificados como astrocitoma (incluindo glioblastoma), oligodendroglioma, ependimoma e tumores oligodendrogliais e astrocíticos mistos e classificados de acordo com o grau de malignidade, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, do Grau I ao Grau IV. A grande maioria é caracterizada por crescimento infiltrativo difuso no parênquima do sistema nervoso central (Lenting et al., 2017). Entre os gliomas, os glioblastomas representam a forma mais comum e letal de tumor cerebral maligno primário. É a forma mais agressiva

sendo comumente associada ao desencorajamento do prognóstico de sobrevida e desfecho fatal dentro de 12 meses a 18 meses após o diagnóstico (Lim et al., 2018).

1.1 GLIOBLASTOMA

O glioblastoma (GBM) é um glioma de grau IV, ou seja, de alta malignidade, que ocorre mais precisamente nos astrócitos. As características histológicas que diferenciam o GBM de todos os outros graus são a presença de necrose (células mortas) e o aumento de vasos sanguíneos em torno do tumor. Suas células podem migrar para longe do tumor, entretanto, o GBM raramente se espalhará em outras partes do corpo. (American Brain Tumor Association, 2014). Embora os GBM ocorram quase exclusivamente no cérebro, eles também podem aparecer no tronco cerebral, cerebelo e na medula espinhal (Davis, 2016).

GBM podem se dividir ainda em primários e secundários. Os primários (90% dos GBM) se desenvolvem abruptamente a partir de células gliais, de forma agressiva, sendo mais comum em pessoas acima de 55 anos. Já os GBM secundários são encontrados mais comumente em pacientes jovens, podendo surgir a partir de metástases de tumores em outros órgãos, ou através da progressão de gliomas de baixo grau (astrocitomas difusos ou anaplásicos) (Kabat et al, 2010; American Brain Tumor Association, 2014). Ambos distinguem se principalmente pelas vias genéticas que se desenvolvem, como mostrado por Watanabe et al., (1996) onde mutações em TP53 foram incomuns em GBM primários, mas ocorreram com alta incidência em GBM secundários e a superexpressão do receptor de EGF (EGFR) prevaleceu nos GBM primários, mas foi rara nos GBM secundários (Ohgaki e Kleihues, 2013).

À medida que o GBM vai aumentando de tamanho, devido a sua alta taxa de proliferação, ele passa a afetar as funções normais do cérebro. Uma vez que o crânio não pode expandir em resposta ao crescimento do tumor, os primeiros sintomas são geralmente devido ao aumento da pressão no cérebro. Dores de cabeça, convulsões, perda de memória e mudanças no comportamento são os sintomas mais comuns. Perda de movimento ou sensação em um lado do corpo, disfunção de linguagem e deficiências cognitivas também podem ocorrer (American Brain Tumor Association, 2014; Mayo Clinic, 2019).

O crescimento do tumor é caracterizado por mudanças significativas tais como aumento dos sinais de fatores crescimento, insensibilidade a sinais

anticrescentes, falha no processo de apoptose, proliferação desregulada, angiogênese aumentada e aquisição de propriedades invasivas (Hanahan e Weinberg, 2000). Entre os diversos eventos bioquímicos, foi demonstrada a existência de conexões moleculares entre as vias de inflamação e estresse oxidativo e o desenvolvimento do câncer. Uma resposta inflamatória bem regulada pode ser um potencial anti-tumorigênico, porém, uma inflamação crônica é prejudicial e, entre outros efeitos deletérios, frequentemente predispõe as células a uma transformação oncogênica (Conti et al., 2010).

Concomitante a isso, o potencial carcinogênico induzido pelo estresse oxidativo está relacionado à capacidade das espécies reativas de oxigênio (ERO) em induzir genotoxicidade e interferir em processos celulares cruciais. A acumulação de ERO pode danificar diretamente o DNA, através do aumento da mutação celular e/ou do aumento do fenótipo oncogênico, onde as alterações no DNA envolvendo quebras de cadeias, substituição de purinas ou pirimidinas e ligações cruzadas entre DNA e proteína acabam sendo as principais responsáveis pelo processo de carcinogênese (Tudek et al., 2010; Rinaldi et al., 2016).

As razões pelas quais o tratamento do GBM continua sendo um grande desafio são diversas. Estas incluem a natureza infiltrativa do tumor, o que limita a completa remoção cirúrgica; a alta taxa proliferativa de células malignas; o aparecimento de clones celulares resistentes ao tratamento, pouco depois da terapia inicial; o impedimento relativo da barreira hematoencefálica, impedindo o acesso de agentes sistêmicos ao parênquima cerebral; a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal e mutações genéticas específicas dentro do tumor; e a sensibilidade especial de certas áreas do cérebro à terapia de radiação (Delgado-López e Corrales-García, 2016).

1.2 TRATAMENTOS

Com o passar dos anos e avanço na tecnologia, houve um progresso em técnicas de ressecção cirúrgica do tumor, radioterapia e estratégias quimioterápicas, entretanto a sobrevida média global do paciente atualmente é por volta de 15 meses (Ampie et al., 2015; Batash et al., 2017). Isso pode estar atribuído a diversos fatores tais como às limitações do tratamento, a natureza difusa do GBM e a compreensão incompleta da fisiopatologia do tumor (Carlsson et al., 2014).

Quanto a ressecção cirúrgica, esta pode variar de uma biópsia a uma ressecção quase total, dependendo de inúmeros fatores que incluem a localização do tumor e as comorbidades médicas do paciente. Devido à localização do tumor - onde movimento, sensação ou fala podem ser afetados - alguns tumores não podem ser completamente removidos. Logo, a remoção parcial do tumor pode ser realizada para diminuir a quantidade de inchaço no cérebro ou para reduzir a atividade convulsiva. Os objetivos da cirurgia são obter tecido tumoral para o diagnóstico e planejamento do tratamento, remover o máximo de tumor possível e reduzir os sintomas causados pela presença do tumor (American Brain Tumor Association, 2014).

Evidências retrospectivas sugerem que, quando possível, seja realizada a ressecção total bruta, uma vez que tem sido associada a maiores tempos de sobrevida e taxas de progressão do tumor em todos os grupos etários (Brown et al., 2016; Braun e Ahluwalia, 2017). O benefício da cirurgia também foi demonstrado em um estudo, onde a idade média dos pacientes era de 59,4 anos, no qual os autores modelaram os fatores que afetam a sobrevida individualizada após a ressecção cirúrgica, encontrando através disto, uma vantagem de sobrevida associada a qualquer grau de ressecção (Marko et al., 2014). No entanto, como as células possuem característica altamente invasiva, esses tumores podem não ser totalmente removidos, sendo necessário radioterapia e/ou quimioterapia para tratar o tumor remanescente (American Brain Tumor Association, 2014).

A radiação pós-operatória está associada a um benefício de sobrevida e a uma melhor qualidade de vida quando comparada aos cuidados de suporte isolados (Braun e Ahluwalia, 2017). Existem diferentes tipos de radiação, sendo a radiação de feixe externo a radiação “padrão”, dada cinco dias por semana por cinco ou seis semanas. A radiação convencional para GBM geralmente é direcionada ao local do tumor e à área ao redor do tumor. Uma forma de “radiação local” pode ser usada para aumentar a radiação convencional, onde esta trata o tumor enquanto protege as células saudáveis que rodeiam o tumor (American Brain Tumor Association, 2014).

Em um estudo realizado com pacientes de ≥ 70 anos de idade, que receberam apenas cuidados de suporte ou radioterapia, foi visto um claro benefício de sobrevida (de 12,2 semanas) (Keime-Guibert et al., 2007). Outros regimes de tratamento têm sido investigados desde então, incluindo a terapia de radiação hipofracionada (HRT), em que a terapia de radiação é entregue em 3 semanas ou menos (Braun e Ahluwalia, 2017). Além disso, drogas sensibilizadoras de radiação e

quimioterapia durante a radioterapia estão sendo estudadas como formas de tornar as células tumorais mais sensíveis à radiação ou aumentar os seus efeitos (American Brain Tumor Association, 2014).

No que diz respeito a quimioterapia, o uso de temozolamida (TMZ) é o padrão de tratamento em combinação com a radioterapia para pacientes jovens. A quimioterapia, além da radioterapia seguida de TMZ adjuvante, melhorou significativamente a sobrevida média (2 e 5 anos) em um grande estudo randomizado. Os tratamentos começam com a avaliação da rapidez com que a doença se desenvolveu (diretrizes ESMO) ou com a idade do paciente, seguida de status de desempenho (diretrizes NCCN). Portanto, para pacientes com até 70 anos de idade ou pacientes com bom status com mais de 70 anos, a terapia concomitante é recomendada (Stupp et al., 2009; Batash et al., 2017).

1.2.1 Temozolamida

O tratamento de radiação por feixe externo com TMZ concomitante e adjuvante tornou-se padrão para pacientes adultos com GBM, após estudo de referência publicado por Stupp et al., em 2005. A ação do TMZ se dá por meio da metilação do DNA, uma vez que esgota a enzima de reparo O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), tornando-o especialmente eficaz naqueles pacientes cujos tumores abrigam um promotor MGMT metilado (Newlands et al., 1997).

O TMZ é um agente oral com boa capacidade de penetração através da barreira hematoencefálica, devido a sua característica lipofílica, proporcionando modesta atividade antitumoral contra metástases cerebrais. Embora possa causar toxicidade hematológica e náusea, tem um perfil de efeito colateral mais favorável do que outros regimes quimioterápicos comumente usados, como procarbazina, lomustina e vincristina (Agarwala e Kirkwood, 2000; Ryabaya et al., 2017; Chua et al., 2019). No entanto, por razões que ainda precisam ser elucidadas, a resposta clínica não é totalmente eficiente, requerendo ainda investigação sob o efeito exato da TMZ na malignidade das células de glioma e no mecanismo subjacente (Wang et al., 2016).

Para pacientes GBM recém-diagnosticados, um tratamento de seis semanas de TMZ é administrado concomitantemente à radiação. Alguns oncologistas recomendam tomar o TMZ uma hora antes da radioterapia para maximizar seu efeito

radiossensibilizador, embora por razões práticas a administração noturna possa ser mais viável para alguns pacientes (American Brain Tumor Association, 2014).

Drogas quimioterápicas alquilantes, como o TMZ, vem demonstrando induzir autofagia citoprotetora em células cancerígenas, incluindo linhas celulares de GBM (Kanzawa et al., 2004). Em alguns casos, a autofagia retarda a apoptose em células tumorais por drogas antineoplásicas e o tratamento dessas células com os inibidores de autofagia aumenta a ação de drogas quimioterápicas induzindo citotoxicidade aditiva ou sinérgica e apoptose (Ma et al., 2011; Guo et al., 2012). Ryabaya et al., (2017) mostraram que a combinação de inibidores de autofagia cloroquina ou LY294002 e TMZ induziu citotoxicidade aumentada de agentes alquilantes em linhas celulares de melanoma humano, tornando esta combinação um potente tratamento antitumoral para o melanoma metastático.

As alterações induzidas pela TMZ podem variar com base na dose e no método de entrega (Sanchez-Perez et al., 2013; Mathios et al., 2016). Embora TMZ melhore o prognóstico para pacientes com glioma, sua eficácia clínica é parcial e limitada, necessitando de mais bases técnicas e científicas.

1.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Além da descoberta de novas drogas, a entrega destas ao cérebro é um grande desafio no tratamento de doenças do SNC. Procedimentos invasivos, como a ressecção de tumores, nem sempre são eficazes para o tratamento do câncer e são extremamente complicados e delicados. Uma alternativa possível para superar esse problema é usar a entrega sistêmica; no entanto, a barreira hematoencefálica (BHE) é um obstáculo devido à sua baixa permeabilidade, exigindo doses mais elevadas de fármacos, o que provoca aumento dos efeitos colaterais. A BHE inibe a administração de agentes terapêuticos ao SNC e evita que um grande número de drogas, incluindo antibióticos, antineoplásicos e neuropeptídeos, passe pelos capilares endoteliais para o cérebro (Aryal et al., 2015; Glaser et al., 2017).

Na investigação por novas drogas, os avanços nas ciências de biomateriais têm se focado recentemente em nanopartículas para entrega em local específico de drogas anticâncer. Tais nanopartículas têm características distintas, incluindo alta estabilidade termodinâmica, boa biocompatibilidade, e circulação prolongada na corrente sanguínea, além de as mesmas ultrapassarem a BHE (nanopartículas de

metais) (Thambi e Park, 2014; Sintov et al., 2016). O ouro, em porções nanométricas tem demonstrado um efeito antiinflamatório devido a sua capacidade de reduzir citocinas pró-inflamatórias e a infiltração de macrófagos (Dohnert et al., 2012; Paula et al., 2015; Hwang et al., 2015; Somasuntharam et al., 2016). As nanopartículas de ouro (NPAu) vêm sendo investigadas ativamente em uma ampla variedade de aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade e fácil conjugação com as biomoléculas. Os compostos de ouro receberam grande atenção como agentes anti-inflamatórios porque podem inibir a expressão de NF- κ B e as reações inflamatórias subsequentes (Paula et al., 2015).

Estudos têm implicado que os mecanismos biológicos da radiosensibilização de NPAu podem estar envolvidos na detenção do ciclo celular e apoptose mediada pelo estresse oxidativo, necrose ou danos ao DNA. A eficácia de NPAu como potencial sensibilizador de radiação também foi determinada em múltiplas linhagens de células cancerígenas, no entanto, se NPAu também pode sensibilizar as células de glioma para a radiação ainda não está claro (Peidang et al., 2016). As NPAu também se tornaram objeto de estudos recentes como um potencial agente anticancerígeno devido à sua baixa toxicidade e capacidade de potencializar células tumorais para a terapia de radiação em virtude do elevado número atômico (Z) do ouro, estas podem aumentar a dose de radiação efetiva administrada às células tumorais através da propagação de elétrons e radicais livres induzidos pela radiação. Esses radicais livres podem danificar diretamente o DNA e induzir indiretamente a apoptose celular. Além disso, estudos mostram que o uso de NPAu como adjuvante à terapia de radiação melhora a sobrevivência de camundongos com tumores cerebrais (Joh et al., 2013; Sun et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar o efeito da temozolamida associada ou não a nano partículas de ouro sobre células GL261.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade por MTT em células GL261 tratadas com TMZ;
- Avaliar a citotoxicidade por MTT em células GL261 tratadas com NPAu;
- Avaliar a citotoxicidade por MTT em células GL261 tratadas com TMZ associada a NPAu;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio em células GL261 tratadas com TMZ;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio em células GL261 tratadas com NPAu;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio em células GL261 tratadas com TMZ associada a NPAu.

3 METODOLOGIA

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

Para este projeto foi utilizada a linhagem celular de GBM murino GL261. Estas foram cultivadas em meio DMEM de alta glicose (Gibco by Life technologies), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco by Life technologies) e 1% de penicilina / estreptomicina (Gibco, Invitrogen). Para o crescimento, as mesmas foram mantidas em incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, e monitoradas a cada 2 dias para avaliar seu crescimento e o consumo de seu meio.

3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

NPAu de tamanhos médios de 20nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich et al., (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) (Nuclear, SP, Brasil).

O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor. Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroáurico, foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 90 °C e sob agitação a 700 rpm. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando a 200 rpm durante 20 minutos. As soluções adquirem as colorações correspondentes a cada tamanho de NPAu sintetizadas apresentando um pH de 5,8. Por conseguinte, o pH foi ajustado a pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, centrifugadas (13.000 rpm por 15 min), lavadas duas vezes com água ultrapura e, finalmente, disperso em solução salina onde a concentração da solução também foi ajustada.

As NPAu foram sintetizadas pelo Grupo de pesquisa em Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos do Laboratório de Fisiopatologia experimental da UNESC.

3.3 VIABILIDADE CELULAR - MTT

Esse método visa avaliar a viabilidade celular, pela redução do MTT {(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan} que em sua forma oxidada é solúvel em água e possui uma coloração amarela. Ao ser reduzido, o MTT se transforma em formazan, um sal de coloração roxa e insolúvel em água. Essa reação de redução ocorre nas mitocôndrias das células, fazendo com que a viabilidade celular seja diretamente proporcional à produção de formazan (MOSSMANN, 1993).

Com isso, as células foram colocadas em placas de 96 poços, com concentração de 1.10^5 /poço e incubadas por 24 horas em DMEM completo a fim de proporcionar o crescimento e aderência das mesmas. Após um período de 24 horas, o TMZ, as NPAu ou a associação dos dois foram adicionados aos poços, nas concentrações conforme a Tabela 1. Para este plaqueamento, foi retirado o meio completo da garrafa e descartado. Em seguida foi feita a lavagem dessa garrafa com PBS e colocado tripsina incubando-a por 5 minutos. Logo após retirou se a tripsina, passando a para um falcon e completando o mesmo com o dobro do meio. Centrifugou-se esse material por cerca de 2 minutos a 1200rpm. Essa centrifugação gerou um pellet de células vivas, do qual foi retirado 10 μ l e colocado em 990 μ l de DMEM completo, homogeneizado e colocado na câmara de Neubauer para contagem das células vivas.

O controle positivo do teste foi realizado utilizando apenas células GL261 incubadas com DMEM completo, e para o controle negativo apenas DMEM completo, mimetizando 100% de células mortas. Após todos os procedimentos, a placa foi incubada por 24 horas em incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. No dia seguinte, o tratamento foi retirado e em seguida foi adicionado uma solução de 5mg/ml de MTT diluído em PBS, sendo pipetado na placa 200 μ l/poço desta mistura e incubado por 3 horas. Após estas 3 horas, foi retirada a solução de MTT e adicionado 150 μ l/poço de álcool isopropílico, a fim de solubilizar os cristais de formazan. Por fim, 100 μ l do conteúdo dos poços foram transferidos para outra placa e a mesma foi lida em um leitor por absorvância, em comprimento de onda de 540nm. A viabilidade celular foi determinada pela comparação dos resultados das absorvâncias dos tratamentos com as absorvâncias do controle (considerado como 100% de viabilidade).

Tabela 1: Concentrações utilizadas de Temozolamida, Nanopartículas de Ouro de 20nm e a associação das duas em células GL261.

GL261 +TMZ	GL261 + NPAu 20nm	GL261 + TMZ + NPAu 20nm
500uM/ml	65ug/ml	500uM/ml + 2,6ug/ml
250uM/ml	23,3ug/ml	250uM/ml + 7,8ug/ml
100uM/ml	7,8ug/ml	100uM/ml + 23,3ug/ml
50uM/ml	2,6ug/ml	50uM/ml + 65ug/ml

3.4 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A geração de ERO intracelular foi mensurada usando 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCF-DA), conforme relatado por Lebel (1990) com algumas modificações. Células GL261 (1×10^5) foram cultivadas em placas estéreis de 96 poços por 24 horas. Em seguida foi retirado o meio de cultura e adicionado TMZ, NPAu ou a associação dos dois nas concentrações conforme a Tabela 1. Após 24hrs o tratamento foi removido e as células foram lavadas com PBS. Em seguida foi adicionado 200ul de uma solução de HBSS com DCF-DA (concentração final de 10uM) por poço e incubado por 30min a 37°C, protegendo a placa da luz. Após a incubação essa solução foi removida e adicionado apenas HBSS. A formação do derivado fluorescente oxidado (DCF) foi monitorado com excitação de 480nm e emissão de 525nm em espectrofotômetro SpectraMax (Califórnia, EUA).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos em média e desvio padrão e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey (viabilidade celular) e pelo teste de Newman-Kels (Produção de ERO). O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas pelo programa Graph Pad Prisma 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR

Para determinar se a TMZ afeta a viabilidade celular, as células GL261 foram cultivadas em meio DMEM por 24h a 37°C, e em seguida tratadas com TMZ nas concentrações de 500, 250, 100 e 50 uM/ml por mais 24h a 37°C. Um ensaio MTT foi então utilizado para a análise da viabilidade celular. Os resultados indicaram que a viabilidade celular de células GL261 tratadas com TMZ diminuiu nas concentrações de 500 e 250 uM/ml como mostra a Figura 1, quando comparadas com o grupo controle de células GL261 não tratadas.

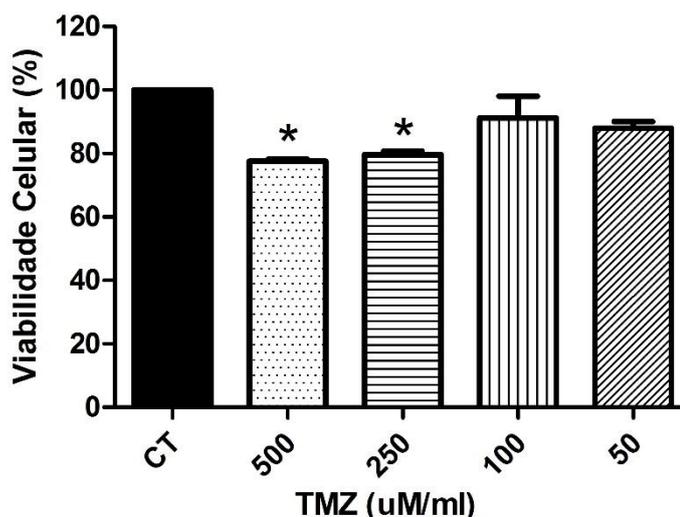


Figura 1: Viabilidade celular de células GL261 quando tratadas com TMZ nas concentrações de 500, 250, 100 e 50 uM/ml por 24h. O grupo controle mimitiza 100% de células viáveis não tratadas. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística entre o grupo controle e as concentrações de TMZ foram obtidas através do teste one-way ANOVA seguido de Tukey considerando um $p < 0,05$. *resultado significativo, quando comparado ao controle (CT).

Para determinar se as NPAu afetam a viabilidade celular de células GL261, foi realizado o mesmo teste citado acima, no entanto com as concentrações de 65, 23,3, 7,8 e 2,6 ug/ml, também por um período de 24hr a 37°C. Os resultados indicaram que a viabilidade celular de células GL261 tratadas com NPAu diminuiu nas

concentrações de 65 e 23,3 ug/ml como mostra a Figura 2, quando comparadas com o grupo controle de células GL261 não tratadas.

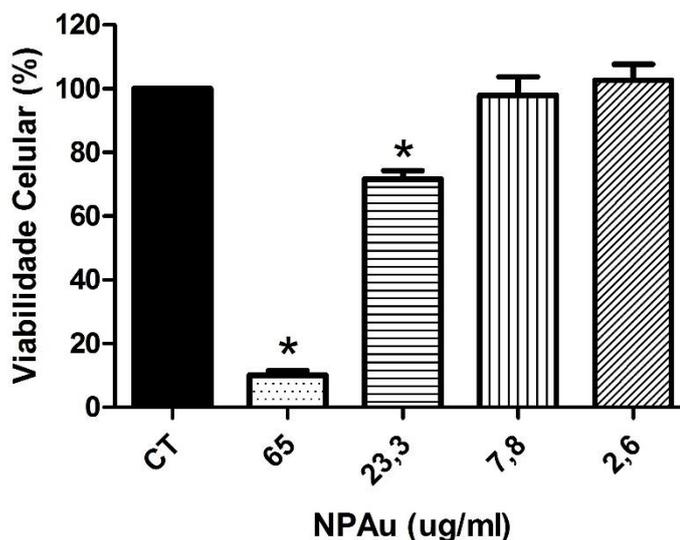


Figura 2: Viabilidade celular de células GL261 quando tratadas com NPAu nas concentrações de 65, 23,3, 7,8, 2,6 ug/ml por 24h. O grupo controle mimetiza 100% de células viáveis não tratadas. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística entre o grupo controle e as concentrações de TMZ foram obtidas através do teste one-way ANOVA seguido de Tukey considerando um $p < 0,05$. *resultado significativo, quando comparado ao controle (CT).

A TMZ e as NPAu foram também utilizadas em conjunto para analisar a viabilidade celular das células GL261, através do MTT. As mesmas foram utilizadas nas concentrações de 500uM de TMZ + 2,6 ug/ml de NPAu, 250uM de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu, 100uM de TMZ + 23,3 ug/ml e 50uM de TMZ e 65 ug/ml de NPAu, incubadas também por 24hr a 37°C. Os resultados mostraram que a viabilidade celular de células GL261 tratadas com a associação de TMZ + NPau diminuiu em todas as concentrações testadas como mostra a Figura 3, quando comparadas com o grupo controle de células GL261 não tratadas.

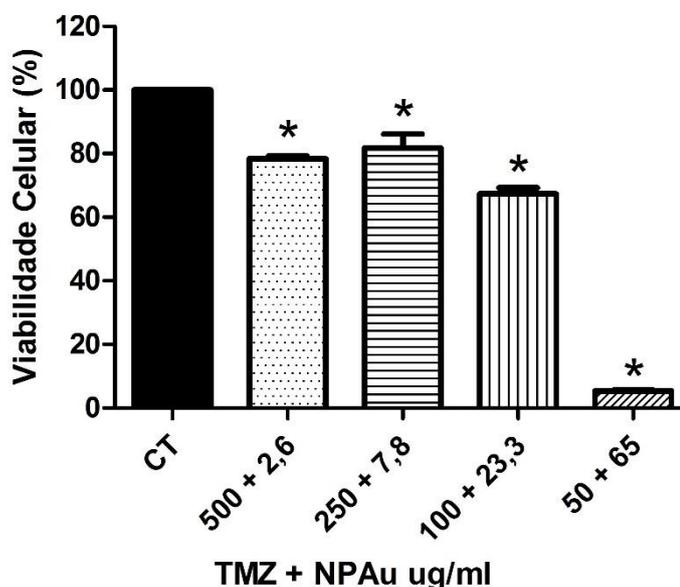


Figura 3: Viabilidade celular de células GL261 quando tratadas com TMZ + NPAu nas concentrações de 500uM de TMZ + 2,6 ug/ml de NPAu, 250uM de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu, 100uM de tmz + 23,3 ug/ml e 50uM e 65 ug/ml por 24hr. O grupo controle mimetiza 100% de células viáveis não tratadas. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística entre o grupo controle e as concentrações de TMZ foram obtidas através do teste one-way ANOVA seguido de Tukey considerando um $p < 0,05$. *resultado significativo, quando comparado ao controle (CT).

A Tabela 2 faz um comparativo de todos os dados obtidos quanto a viabilidade celular em relação a exposição das células GL261 ao TMZ, as NPAu e a associação de ambos em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que a associação da concentração de 100mM/ml de TMZ com a concentração de 23,3ug/ml fez com que a viabilidade celular diminuísse consideravelmente quando comparada a viabilidade das células expostas a apenas um dos dois compostos.

Tabela 2: Análise comparativa dos dados obtidos em termos de porcentagem de viabilidade celular das células GL261 quando exposta ao TMZ, NPAu e a associação de ambos em diferentes concentrações.

Concentrações			Sobrevida (%)		
TMZ (uM/ml)	NPAu (ug/ml)	TMZ + NPAu	TMZ	NPAu	TMZ + NPAu
500	65	500 + 2,6	77,5	10	78,3
250	23,3	250 + 7,8	79,6	71,7	81,8
100	7,8	100 + 23,3	91,1	97,9	67,3
50	2,6	50 + 65	87,9	100	5,3

4.2 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A produção de espécies reativas de oxigênio celulares foi determinada pelos níveis de oxidação do DCFH. Para isso, as células GL261 foram cultivadas em meio DMEM por 24h a 37°C, e em seguida tratadas com TMZ nas concentrações de 500, 250, 100 e 50 uM/ml por mais 24h a 37°C. Como pode ser observado na Figura 4, as concentrações de TMZ de 500 e 250 uM/ml não mostraram diferença significativa na produção de ERO. No entanto quando as células foram expostas as concentrações de 100 e 50 uM/ml houve significativa diminuição na produção de ERO, quando comparado ao grupo controle.

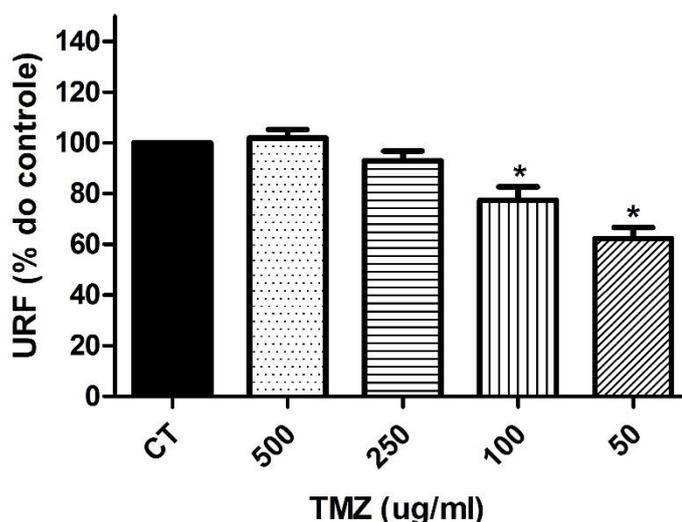


Figura 4: Produção de espécies reativas de oxigênio em células GL261 quando tratadas com TMZ nas concentrações de 500, 250, 100 e 50 uM/ml por 24h. O grupo controle mimitiza 100% de células não tratadas. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística entre o grupo controle e as concentrações de TMZ foram obtidas através do teste Newman-Keuls considerando um $p < 0,05$. *resultado significativo, quando comparado ao controle (CT).

Para analisar se as NPAu afetam a produção de ERO em células GL261, foi realizado o mesmo teste citado acima, no entanto com as concentrações de 65, 23,3, 7,8 e 2,6 ug/ml, também por um período de 24hr a 37°C. Como mostra a Figura 5, as células que foram expostas as concentrações de 65 e 2,6 ug/ml mostraram uma diminuição significativa na produção de espécies reativas de oxigênio quando comparado ao grupo controle. As concentrações de 23,3 e 7,8 ug/ml não mostraram diferença significativa.

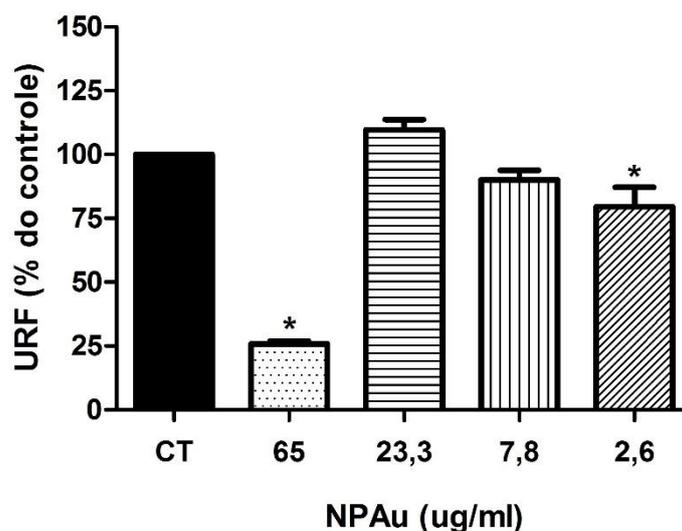


Figura 5: Produção de espécie reativas de oxigênio em células GL261 quando tratadas com NPAu nas concentrações de 65, 23,3, 7,8, 2,6 ug/ml por 24h. O grupo controle mimetiza 100% de células não tratadas. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística entre o grupo controle e as concentrações de TMZ foram obtidas através do teste Newman-Keuls considerando um $p < 0,05$. *resultado significativo, quando comparado ao controle (CT).

A produção de ERO também foi avaliada em células GL261 expostas a associação do TMZ com NPAu nas concentrações de 500uM de TMZ + 2,6 ug/ml de NPAu, 250uM de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu, 100uM de TMZ + 23,3 ug/ml de NPAu e 50uM de TMZ e 65 ug/ml de NPAu, incubadas também por 24hr a 37°C. Como pode-se ver na Figura 6, as células GL261, quando expostas a concentração de 250uM de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu, mostrou um aumento significativo na produção de ERO. No entanto quando exposta a concentração de 50uM de TMZ e 65 ug/ml de NPAu, foi visto uma diminuição significativa na produção de ERO quando comparado ao grupo controle. As concentrações de 250uM de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu e 100uM de TMZ + 23,3 ug/ml de NPAu não mostraram diferenças significativas.

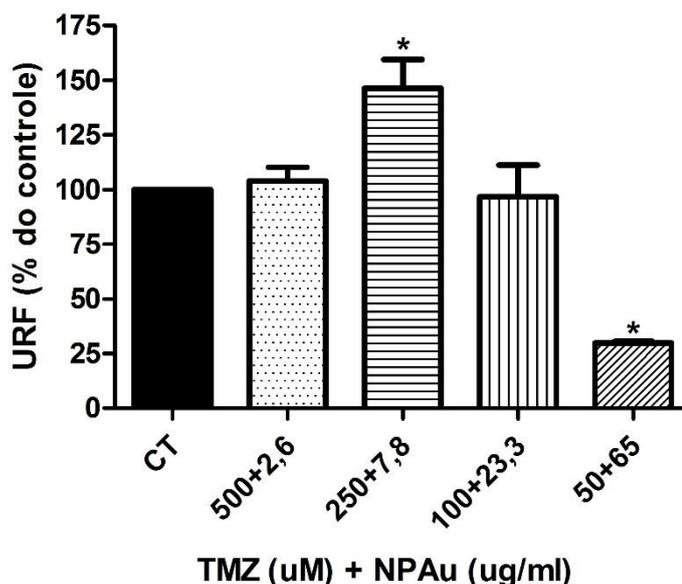


Figura 6: Produção de espécie reativas de oxigênio em células GL261 quando tratadas com TMZ + NPAu nas concentrações de 500uM de TMZ + 2,6 ug/ml de NPAu, 250uM de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu, 100uM de TMZ + 23,3 ug/ml e 50uM de TMZ e 65 ug/ml de NPAu por 24hr. O grupo controle mimetiza 100% de células não tratadas. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística entre o grupo controle e as concentrações de TMZ foram obtidas através do teste Newman-Keuls considerando um $p < 0,05$. *resultado significativo, quando comparado ao controle (CT).

A Tabela 3 faz um comparativo de todos os dados obtidos quanto a produção de ERO em relação a exposição das células GL261 ao TMZ, as NPAu e a associação de ambos em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que a associação da concentração de 250mM/ml de TMZ com a concentração de 7,8ug/ml fez com que as ERO aumentassem consideravelmente quando comparada a produção de ERO das células expostas a apenas um dos dois compostos.

Tabela 3: Análise comparativa dos dados obtidos em termos de porcentagem de produção de ERO em células GL261 quando exposta ao TMZ, NPAu e a associação de ambos em diferentes concentrações.

Concentrações			Produção de ROS (%)		
TMZ (uM/ml)	NPAu (ug/ml)	TMZ + NPAu	TMZ	NPAu	TMZ + NPAu
500	65	500 + 2,6	101,9	25,7	103,9
250	23,3	250 + 7,8	92,9	109,67	146,3
100	7,8	100 + 23,3	77,4	90	96,7
50	2,6	50 + 65	62,3	79,5	29,7

5 DISCUSSÃO

Como o tipo mais comum de tumor no cérebro, o GBM tem uma alta taxa de morbidade e mortalidade e penetra facilmente no parênquima cerebral. Originado das células gliais, o GBM inclui tumores de tipos de células astrocíticas, oligodendrial, ependimárias ou mistas (Danyu et al., 2011). As causas primárias do GBM ainda não foram identificadas com precisão, no entanto, fatores ambientais como a exposição a radiações ionizantes de maior intensidade são atribuídos à maioria dos casos, e a predisposição genética é responsável por 5-10% dos casos de glioma (Kumari et al., 2018).

Medicamentos metilantes como o TMZ são amplamente utilizados no tratamento de tumores cerebrais, incluindo GBM. Este, é um agente de metilação do DNA que transfere um grupo metil na sexta posição da guanina no DNA (Zhang et al., 2010). O O-6-metilguanina, um aduto de DNA, causa a parada do ciclo celular e, finalmente, a morte celular (Johannessen et al., 2008; Zhang et al., 2012; Kumari et al., 2018). Até o momento, os principais mecanismos de resistência conhecidos da TMZ estão relacionados à capacidade de reparo de DNA das células (Johannessen e Bjerkvig, 2012). No entanto, devido à fraca resposta ao fármaco ou recidiva do tumor observada no tratamento com TMZ, é razoável especular outros mecanismos que podem estar envolvidos na resistência aos medicamentos. Neste contexto Zhang et al., (2010) demonstraram que o tratamento de células de GBM com TMZ aumentou os níveis de ERO. Isso estava relacionado à ativação da proteína quinase ativada por AMP, levando à apoptose celular. Assim, o estresse oxidativo induzido pelo tratamento com TMZ pode desempenhar um papel importante na morte celular induzida por este fármaco (Rocha et al., 2016).

Nos dias atuais, a nanotecnologia é um termo amplo que oferece um novo sistema de administração de medicamentos, podendo esta, introduzir avanços na superação dos problemas de solubilidade, estabilidade e melhoria do direcionamento e distribuição de drogas anticâncer (Fanciullino et al., 2013). As nanopartículas consistem em diferentes materiais biodegradáveis, tais como lipídios, lipossomas ou metais como ouro, polímeros naturais ou sintéticos, para desenvolver sistemas de liberação de fármacos para ampla variedade de agentes terapêuticos (Hamzawy et al., 2017).

Sendo assim, primeiramente em nosso estudo, as células GL261 foram tratadas utilizando diferentes concentrações de TMZ. As concentrações usadas foram escolhidas conforme as utilizadas em alguns outros trabalhos (Ryabaya et al., 2017; Resende et al., 2018; Kumari et al., 2018). Como pode ser visto na Figura 1, a viabilidade celular foi significativamente diminuída quando as células foram expostas 24h ao TMZ nas concentrações de 500uM e 250uM. Resultado semelhante foi visto por Resende et al., (2018) onde células das linhagens U87MG (GBM humano), U251MG e U138MG (astrocitoma), foram expostas ao TMZ em uma concentração de 250uM por 2, 48 e 72h. O TMZ causou um declínio progressivo na viabilidade celular dessas linhagens celulares com valores que variaram de 92% (2 h) a 52% (72 h). Isso pode estar relacionado ao fato de o TMZ atuar durante a replicação do DNA, tendo como consequência a parada do ciclo celular na fase G2 em células tumorais astrocíticas, o que por fim leva a morte celular (Sang et al., 2014).

Em outro estudo realizado por Kumari et al., (2018), utilizando a mesma linhagem celular do nosso estudo, as células foram expostas ao TMZ em concentrações de 500uM e 100uM por 48h. Os resultados mostraram que, em ambas as concentrações, a viabilidade celular foi significativamente diminuída quando comparada ao controle, corroborando assim com nossos achados.

Quanto a produção de ERO em células tratadas apenas com TMZ, em diferentes concentrações, os grupos mostraram resultado significativo apenas nas concentrações de 100 e 50 uM/ml, onde houve uma diminuição na produção de ERO. Esse resultado corrobora com a análise da viabilidade celular, onde pode ser visto que essas mesmas concentrações não foram efetivas na diminuição da viabilidade celular. Em células cancerígenas, as ERO são geralmente consideradas oncogênicas porque foram implicadas na iniciação, progressão e metástase de cânceres, mas isso não é claro, já que as ERO também podem ser cruciais para a depuração do tumor. Com isso, o aumento na produção do estresse oxidativo pode estar diretamente ligado a mortalidade das células cancerígenas, uma vez que, uma das abordagens que vem sendo estudadas para matar células cancerosas, é introduzir um nível de ERO (exógeno) ainda maior nestas células, de modo a desencadear a morte celular (Takeuchi et al., 1996; Yang et al., 2013; Yang et al., 2018).

O TMZ é frequentemente usado como terapia padrão para o glioma, no entanto o efeito curativo da TMZ é frequentemente comprometido devido ao reparo do dano ao DNA nas células tumorais. Portanto, o mecanismo subjacente aos efeitos

inibitórios da TMZ na progressão do tumor requer investigação adicional (Wang et al., 2016).

Além da descoberta de novas drogas, a entrega destas drogas ao cérebro é um grande desafio no tratamento de doenças do SNC. Procedimentos invasivos, como a ressecção de tumores, nem sempre são eficazes para o tratamento do câncer e são extremamente complicados e delicados. Uma alternativa possível para superar esse problema é usar a entrega sistêmica; no entanto, a BHE é um obstáculo devido à sua baixa permeabilidade, exigindo doses mais elevadas de fármacos, o que provoca aumento dos efeitos colaterais. Com o intuito de melhorar o transporte e atravessar a BHE, e ainda tentar diminuir a concentração das drogas já utilizadas, muitos pesquisadores vêm estudando novas nanotecnologias para superar esses obstáculos (Pardridge, 2015; Glaser et al., 2017).

Em adição, em nosso estudo foi também utilizado NPAu em diferentes concentrações, incubadas durante 24h também em linhagem celular GL261. As concentrações escolhidas foram similares as de Steiner (2016), com algumas modificações. Como mostra a Figura 2, a viabilidade celular foi consideravelmente diminuída quando as células GL261 foram expostas as concentrações de 65 e 23,3 ug/ml de NPAu pelo período de 24h.

Steiner (2016) em seu trabalho com linhagem celular de melanoma B16F10, mostrou que concentrações de 70µg/ml, 23,3 µg/ml e 7,8 µg/ml apresentaram diminuição da viabilidade celular em sua linhagem B16F10 quando comparadas com o controle, apresentando 97,5%, 45,3% e 4,0% de morte celular, respectivamente, sendo em parte semelhante aos nossos resultados. Resultado similar também pode ser visto no estudo feito por Hussein et al., (2016) onde estes avaliaram o efeito das nanopartículas de ouro em células normais (linfócitos de pessoas saudáveis) e em células de câncer da linhagem HeLa e AMN3. Os resultados mostraram que as células cancerígenas foram mais afetadas que células normais, bem como a AMN3 mais afetada que a HeLa mostrando assim que o efeito das nanopartículas está relacionado ao tipo de células, concentração, período de incubação e também o tamanho das partículas, necessitando assim de mais estudos para elucidar seu mecanismo (Hussein, et al., 2016).

Segundo El-Sayed et al., (2005) as NPAu se ligam a células cancerígenas mais do que a células normais porque as células cancerígenas expressam diferentes

grupos proteicos em sua superfície, que possuem anticorpos correspondentes que podem ser ligados a NPAu, especialmente NPAu conjugadas.

Quando avaliada a produção de ERO em células GL261 expostas as NPAu, nossos resultados mostram uma diminuição significativa na produção de ERO em células expostas as concentrações de 65 e 2,6 ug/ml quando comparadas ao controle. As concentrações de 23,3 e 7,8 ug/ml não mostraram resultados significativos. Esse resultado pode também corroborar com o estudo de Yang et al., (2018) citado anteriormente, devido a diminuição na produção de ERO nas células expostas a concentração de 2,6ug/ml, mostrando que a baixa produção de ERO pode estar ligada ao fato de as células expostas a essa concentração de NPAu não ter mostrado redução na sua viabilidade, já que o aumento das ERO pode ser de grande importância na diminuição da viabilidade celular e conseqüentemente na eliminação do tumor.

Com esses achados, foi testado o TMZ associado as NPAu, utilizando quatro concentrações diferentes (Tabela 1) para também avaliar a viabilidade celular e a produção de espécies reativas de oxigênio em células GL261 expostas a essa associação. Em relação a viabilidade celular, todas as concentrações utilizadas, fizeram com que houvesse uma diminuição significativa na viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (Figura 3). Quando analisado as ERO (Figura 6), o grupo em que as células GL261 foram expostas a concentração de 250 uM/ml de TMZ + 7,8 ug/ml teve um aumento significativo na produção de ERO quando comparado ao grupo controle e uma diminuição quando a concentração utilizada foi de 50 uM/ml de TMZ + 65 ug/ml de NPAu.

A produção de ERO é um mecanismo compartilhado por todas as abordagens terapêuticas não-cirúrgicas para câncer, incluindo quimioterapia, radioterapia e terapia fotodinâmica, devido à sua implicação no desencadeamento da morte celular (Wang e Yi, 2008). Juntamente a isso temos as propriedades já vistas das NPAu, em estudos com células de câncer, onde além disso, estas possuem ainda propriedades na resposta inflamatória e no estresse oxidativo (Paula et al., 2015; Hauptenthal et al., 2019). Quando comparamos as três diferentes exposições da linhagem celular GL261 (TMZ, NPAu e TMZ + NPAu), no que diz a viabilidade celular (Tabela 2), a concentração de 100 uM/ml de TMZ + 23,3 ug/ml de NPAu, mostrou uma diminuição significativa na viabilidade celular, quando comparada a exposição a apenas algum dos dois tratamentos (somente TMZ ou somente NPAu).

Quando comparamos a produção de ERO, nas três diferentes exposições, foi visto que quando a linhagem celular GL261 foi exposta a concentração de 250 uM/ml de TMZ + 7,8 ug/ml, esta teve um significativo aumento quando comparado, não somente ao controle da mesma, mas também aos outros tratamentos isolados, mostrando com isso que quando o TMZ é associado as NPAu, a produção de ERO aumenta e, sugere-se que assim, conseqüentemente a viabilidade das células cancerígenas diminua, como observamos nos nossos resultados.

Em estudo realizado por Lee et al., (2019), foi utilizado NPAu conjugadas com resveratrol, buscando induzir a parada do ciclo celular em linhagens de células MCF-7. Quando analisado a viabilidade celular, foi visto que essa conjugação foi efetiva na sua diminuição, em todas as concentrações utilizadas, quando comparado a apenas o resveratrol, o qual sabe-se também que tem eficácia relativamente baixa devido à sua rápida degradação durante o metabolismo no corpo humano (Davidov-Pardo e McClements, 2015). Resultados semelhantes puderam ser vistos também no trabalho de Banerjee et al., (2019), onde foi utilizado peptídeos sozinhos e associados a NPAu ou nanopartículas de prata (NPAg) em linhagem celular HT-29 (câncer de cólon) e MB-231 (câncer de mama). Os resultados mostraram a melhoria da atividade das nanopartículas quando conjugadas aos peptídeos, onde a microscopia de corante fluorescente e o ensaio de fragmentação de DNA confirmaram o fato de que as nanopartículas conjugadas causam um nível mais alto de desintegração do DNA nas células que danificam consecutivamente e causam apoptose devido à letalidade.

O medicamento anticancerígeno adequado deve ser capaz de manter sua eficácia e, ao mesmo tempo, reduzir seus efeitos colaterais, causados na quimioterapia com os atuais medicamentos. Para desenvolver tais drogas, diversas substâncias químicas candidatas estão sendo investigadas, tais como as NPAu, além das drogas quimioterápicas tradicionais e a conjugação destas. Nossos resultados mostraram que quando o TMZ foi associado as NPAu, teve seu efeito potencializado no que diz respeito ao aumento da produção de ERO, ligado a diminuição da viabilidade celular. Foi visto ainda que uma concentração mais baixa (250 uM/ml) quando associada a NPAu teve efeito significativo, sendo este um resultado importante, pois elevadas concentrações de TMZ estão ligadas aos altos efeitos colaterais da quimioterapia.

Embora o papel do TMZ tenha sido bem estabelecido para o GBM, ainda são necessários mais estudos testando outros parâmetros juntamente com outras

concentrações de NPAu, no entanto já sugere-se que possa vir a ser um tratamento em potencial.

6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos dados mostraram que o uso de TMZ associado a NPAu foi capaz de diminuir a viabilidade celular da linhagem GL261 em todas as concentrações utilizadas e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio na concentração de 250uM/ml de TMZ + 7,8 ug/ml de NPAu, quando comparado ao uso de apenas um dos dois compostos. No entanto mais estudos ainda são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual isso ocorre, como testar novas concentrações e avaliar mais parâmetros.

REFERENCIAS

Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist*. 2000;5(2):144-51.

American Brain Tumor Association. *Glioblastoma and Malignant Astrocytoma*. Chicago: 2014.

Ampie L, Woolf EC1, Dardis C. Immunotherapeutic advancements for glioblastoma. *Front Oncol*. 2015 Jan 29;5:12.

Aryal M, Park J, Vykhodtseva N, Zhang YZ, McDannold N. Enhancement in blood-tumor barrier permeability and delivery of liposomal doxorubicin using focused ultrasound and microbubbles: evaluation during tumor progression in rat glioma model. *Phys Med Biol*. 2015 Mar 21;60(6):2511-27.

Bailey CP, Figueroa M, Mohiuddin S, Zaky W, Chandra J. Cutting Edge Therapeutic Insights Derived from Molecular Biology of Pediatric High-Grade Glioma and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma (DIPG). *Bioengineering (Basel)*. 2018 Dec; 5(4): 88.

Balasubramanian SK, Yang L, Yung LY, Ong CN, Ong WY, Yu LE. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2010; (34):9023-30.

Banerjee K, Ravishankar Rai V, Umashankar M. Effect of peptide-conjugated nanoparticles on cell lines. *Prog Biomater*. 2019 Mar;8(1):11-21.

Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. *Curr Med Chem*. 2017;24(27):3002-3009.

Braun K, Ahluwalia MS. Treatment of Glioblastoma in Older Adults. *Curr Oncol Rep*. 2017 Oct 26;19(12):81.

Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, Patel AS, Rizk EB, Suki D, Sawaya 7, Glantz M. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2016 Nov 1;2(11):1460-1469.

Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med.* 2014 Nov;6(11):1359-70.

Chua J, Nafziger E, Leung D. Evidence-Based Practice: Temozolomide Beyond Glioblastoma.

Conti A, Gulì C, La Torre D, Tomasello C, Angileri FF, Aguenouz M. Role of inflammation and oxidative stress mediators in gliomas. *Cancers (Basel).* 2010 Apr 26;2(2):693-712.

Danyu M, Huile G, Wei G, Zhiqing P, Xinguo J, Jun C. Anti glioma effect of doxorubicin loaded liposomes modified with angiopep-2. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2011; 5(3), 409–414.

Davidov-Pardo G, McClements DJ. Nutraceutical delivery systems: resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chem.* 2015 Jan 15;167:205-12.

Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs.* 2016 Oct 1; 20(5): S2–S8.

Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol.* 2016 Nov;18(11):1062-1071.

Dohnert MB, Venâncio M, Possato JC, Zeferino RC, Dohnert LH, Zugno AI, De Souza CT, Paula, MM, Luciano, TF. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 1651-1657.

El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer. *Nano Lett.* 2005 May;5(5):829-34.

Fanciullino R, Ciccolini J, Milano G. Challenges, expectations and limits for nanoparticles-based therapeutics in cancer: a focus on nano-albumin-bound drugs. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013 Dec;88(3):504-13.

Glaser T, Han I, Wu L, Zeng X. Targeted nanotechnology in glioblastoma multiforme. *Front Pharmacol.* 2017 Mar 31;8:166.

Guo XL, Li D, Hu F, Song JR, Zhang SS, Deng WJ, Sun K, Zhao QD, Xie XQ, Song YJ, Wu MC, Wei LX. Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Lett.* 2012 Jul 28;320(2):171-9.

Hamzawy MA, Abo-Youssef AM, Salem HF, Mohammed SA. Antitumor activity of intratracheal inhalation of temozolomide (TMZ) loaded into gold nanoparticles and/or liposomes against urethane-induced lung cancer in BALB/c mice. *Drug Deliv.* 2017 Nov;24(1):599-607.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Haupenthal DPDS, Possato JC, Zaccaron RP, Mendes C, Rodrigues MS, Nesi RT, Pinho RA, Feuser PE, Machado-de-Ávila RA, Comim CM, Silveira PCL. Effects of chronic treatment with gold nanoparticles on inflammatory responses and oxidative stress in Mdx mice. *J Drug Target.* 2019 Jun 27:1-9.

Hussein SI, Sultan AS, Yaseen NY. Study the effect of gold nanoparticles on cancer and normal cells (in vitro study). *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics.* 2016; 9(2):144-49.

Hwang SJ, Jun SH, Park Y, Cha SH, Yoon M, Cho S, Lee HJ, Park Y. Green synthesis of gold nanoparticles using chlorogenic acid and their enhanced performance for inflammation. *Nanomedicine*. 2015; 11:1677-1688.

Instituto Nacional de Câncer - INCA (Brasil). Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2018.

Joh DY, Sun L, Stangl M, Al Zaki A, Murty S, Santoiemma PP, et al. Selective targeting of brain tumors with gold nanoparticle-induced radiosensitization. *Plos One*. 2013; 8(4): 1-10.

Johannessen TC, Bjerkvig R, Tysnes BB. DNA repair and cancer stem-like cells--potential partners in glioma drug resistance? *Cancer Treat Rev*. 2008 Oct;34(6):558-67.

Johannessen TC, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012 May;12(5):635-42.

Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010.

Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*. 2004 Apr;11(4):448-57.

Kaufmann JK, Chiocca EA. Glioma virus therapies between bench and bedside. *Neuro Oncol*. 2014 Mar;16(3):334-51.

Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, Guillemin JS, Jadaud E, Colin P, Bondiau PY, Meneï P, Loiseau H, Bernier V, Honnorat J, Barrié M, Mokhtari K, Mazon JJ, Bissery A, Delattre JY; Association of French-Speaking Neuro-Oncologists. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med*. 2007 Apr 12;356(15):1527-35.

Kumari S, Bhattacharya D, Rangaraj N, Chakarvarty S, Kondapi AK, Rao NM. Aurora kinase B siRNA-loaded lactoferrin nanoparticles potentiate the efficacy of temozolomide in treating glioblastoma. *Nanomedicine (Lond)*. 2018 Oct;13(20):2579-2596.

LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990 Jun 1;104(1):17-24.

Lee DG, Go EB, Lee M, Pak PJ, Kim JS, Chung N. Gold nanoparticles conjugated with resveratrol induce cell cycle arrest in MCF-7 cell lines. *Appl Biol Chem*. 2019;62(33):1-6.

Lenting K, Verhaak R, Laan M, Wesseling P, Leenders W. Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017; 133: 263-282.

Lim M, Xia Y, Bettegowda C, Weller M. Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Jul;15(7):422-442.

Ma XH, Piao S, Wang D, McAfee QW, Nathanson KL, Lum JJ, Li LZ, Amaravadi RK. Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011 May 15;17(10):3478-89.

Marko NF, Weil RJ, Schroeder JL, Lang FF, Suki D, Sawaya RE. Extent of resection of glioblastoma revisited: personalized survival modeling facilitates more accurate survival prediction and supports a maximum-safe-resection approach to surgery. *J Clin Oncol*. 2014 Mar 10;32(8):774-82.

Mathios D, Kim JE, Mangraviti A, Phallen J, Park CK, Jackson CM, Garzon-Muvdi T, Kim E, Theodoros D, Polanczyk M, Martin AM, Suk I, Ye X, Tyler B, Bettegowda C, Brem H, Pardoll DM, Lim M. Anti-PD-1 antitumor immunity is enhanced by local and abrogated by systemic chemotherapy in GBM. *Sci Transl Med*. 2016 Dec 21;8(370):370ra180.

Mayo Clinic. Patient Care & Health Information: Diseases & Conditions: Glioma. EUA, 2019.

Ministério da Saúde (Brasil). Câncer: o que é, causas, tipos, sintomas, tratamentos, diagnóstico e prevenção. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev*. 1997 Jan;23(1):35-61.

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb 15;19(4):764-72.

Pardridge WM. Targeted delivery of protein and gene medicines through the blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther*. 2015 Apr;97(4):347-61.

Paula MM, Petronilho F, Vuolo F, Ferreira GK, De Costa, L, Santos GP, Efftig PS, Dal-Pizzol, F, Dal-Bó AG, Frizon TE, Silveira PC, Pinho RA. Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. *J Biomed Mater Res*. 2015; 103: 3323-3330.

Peidang L, Haizhen J, Zhirui G, Jun M, Jing Z, Dongdong L, HaoW, Ning G. Silver nanoparticles outperform gold nanoparticles in radiosensitizing U251 cells in vitro and in an intracranial mouse model of glioma. *Int J Nanomedicine*. 2016; 5003-5014.

Resende FFB, Titze-de-Almeida SS, Titze-de-Almeida R. Function of neuronal nitric oxide synthase enzyme in temozolomide-induced damage of astrocytic tumor cells. *Oncol Lett*. 2018 Apr;15(4):4891-4899.

Rinaldi M, Caffo M, Minutoli L, Marini H, Abbritti RV, Squadrito F, et al. ROS and Brain Gliomas: An Overview of Potential and Innovative Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 22;17(6).

Rocha CR, Kajitani GS, Quinet A, Fortunato RS, Menck CF. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. *Oncotarget.* 2016 Jul 26;7(30):48081-48092.

Ryabaya OO, Inshakov AN, Egorova AV, Emelyanova MA, Nasedkina TV, Zasedatelev AS, Khochenkov DA, Stepanova EV. Autophagy inhibitors chloroquine and LY294002 enhance temozolomide cytotoxicity on cutaneous melanoma cell lines in vitro. *Anticancer Drugs.* 2017 Mar;28(3):307-315.

Sanchez-Perez LA, Choi BD, Archer GE, Cui X, Flores C, Johnson LA, Schmittling RJ, Snyder D, Herndon JE 2nd, Bigner DD, Mitchell DA, Sampson JH. Myeloablative temozolomide enhances CD8⁺ T-cell responses to vaccine and is required for efficacy against brain tumors in mice. *PLoS One.* 2013;8(3):e59082.

Sang DP, Li RJ, Lan Q. Quercetin sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide in vitro via inhibition of Hsp27. *Acta Pharmacol Sin.* 2014 Jun;35(6):832-8.

Sintov AC, Velasco-Aguirre C, Gallardo-Toledo E, Araya E, Kogan MJ. Metal Nanoparticles as Targeted Carriers Circumventing the Blood-Brain Barrier. *Int Rev Neurobiol.* 2016;130:199-227.

Steiner BT. Avaliação da citotoxicidade dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* associados à nanopartículas de ouro em células de melanoma B16F10 [Trabalho de Conclusão de Curso]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense, Curso de Biomedicina; 2016.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European

Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):459-66.

Sun L, Joh DY, Al-Zaki A, Stangl M, Murty S, Davis JJ, et al. Theranostic Application of Mixed Gold and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Micelles in Glioblastoma Multiforme. *J Biomed Nanotechnol*. 2016;12, (2): 347-356.

Takeuchi T, Nakajima M, Morimoto K. Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells. *Carcinogenesis*. 1996 Aug;17(8):1543-8.

Thambi T, Park JH. Recent advances in shell-sheddable nanoparticles for cancer therapy. *J Biomed Nanotechnol*. 2014 Sep;10(9):1841-62.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.

Tudek B, Winczura A, Janik J, Siomek A, Foksinski M, Oliński R. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *Am J Transl Res*. 2010 May 15;2(3):254-84.

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 1951; 11, 55–75.

Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999 Sep;27(5-6):612-6.

Wang Y, Gao S, Wang W, Liang J. Temozolomide inhibits cellular growth and motility via targeting ERK signaling in glioma C6 cells. *Mol Med Rep.* 2016 Dec;14(6):5732-5738.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* 1996 Jul;6(3):217-23; discussion 23-4.

Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, Liang X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018 Nov 1;37(1):266.

Yang Y, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. *Curr Med Chem.* 2013;20(30):3677-92.

Zhang WB, Wang Z, Shu F, Jin YH, Liu HY, Wang QJ, Yang Y. Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *J Biol Chem.* 2010 Dec 24;285(52):40461-71.

Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 2012 Jan;5(1):102-14.

Zottel A, Videtič Paska A, Jovčevska I. Nanotechnology Meets Oncology: Nanomaterials in Brain Cancer Research, Diagnosis and Therapy. *Materials (Basel).* 2019 May 15;12(10). pii: E1588.