

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GIULIA DOS SANTOS PEDROSO FIDELIS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA ASSOCIADA À
NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE O DESENVOLVIMENTO
TUMORAL E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
ANIMAIS EXPOSTOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE
GLIOBLASTOMA.**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2017

GIULIA DOS SANTOS PEDROSO FIDELIS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE MELATONINA ASSOCIADA À
NANOPARTÍCULAS DE OURO SOBRE O DESENVOLVIMENTO
TUMORAL E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
ANIMAIS EXPOSTOS A UM MODELO EXPERIMENTAL DE
GLIOBLASTOMA.**

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. Ricardo Aurino Pinho

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2017

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

Meu primeiro agradecimento com certeza é para Deus, por ter me dado um ano tão maravilhoso. Cheio de correrias, ansiedades, mas mesmo assim um dos melhores anos que já vivi.

Agradeço também imensamente a meus pais, avós e irmã por todo apoio, incentivo e compreensão durante esses longos anos de estudos. Amo vocês!

Ao meu marido, que a cada ano que passa eu amo e admiro mais. Realmente não sei como tu me atura e ainda me ama e consegue me fazer sorrir quando estou irritada (o que é bem normal) depois desses quase 10 anos juntos. Te amo <3

As minhas amigas Bruna, Hemelin e Lara, não só por me acompanharem durante todo esse trabalho, mas por serem minhas amigas e não desistirem de mim quando eu fico insuportável (o que também é bem normal). Vocês são as melhores!

Aos amigos que o mestrado me deu, Gustavo Mastella e Luiza Martins, e também a Maiara Pereira que já era minha amiga muito antes da faculdade, por também terem me ajudado em todo o meu trabalho mesmo nós não fazendo parte dos mesmos laboratórios, por ficarem exaustos comigo organizando eventos, e por focarem comigo durante a semana toda. Saibam que vocês foram muito especiais.

Aos meus companheiros de laboratório Renata, Priscila, Pauline, Emerson, Thais, Helen, Bárbara, Júlia, Paulo Roberto e Carol, que me ajudaram de alguma forma durante esses quase dois anos e também as meninas do Labim por diversos procedimentos em que vocês foram essenciais. Muito obrigada!

E por fim meu agradecimento especial, ao meu Orientador Ricardo Aurino Pinho, que nesses cinco anos e meio tem sido um exemplo de professor, pesquisador e de pessoa. Você me ensinou muito mais que Bioquímica e Fisiologia, você me mostrou como ser uma pessoa mais humana e mais humilde. Minha admiração eterna para você!

***“...Dream on, dream on, dream on
And dream until your dream comes true...”***

Aerosmith

RESUMO

Gliomas são os tumores mais frequentes do sistema nervoso central, que se aloca em células da glia. Dentre suas subclassificações, o de grau IV (glioblastoma - GBM) é o que apresenta prognóstico de maior gravidade, pois é considerado altamente complexo, devido a elevada capacidade de infiltração, o que dificulta sua ressecção por completo. Estudos prévios têm demonstrado que o estresse oxidativo é um fenômeno presente na doença e pode ser um agente importante sobre a queda da imunidade e sua progressão. Desta forma, estudar terapias que possam contribuir para reduzir o agravamento da doença torna-se extremamente relevante para a saúde pública. A melatonina (MEL) é um hormônio sintetizado a partir do triptofano e produzido pela glândula pineal, responsável pela organização temporal dos ritmos biológicos. Além de ter papel importante na regulação endócrina e no sistema imunológico, exerce também função antioxidante. Adicionado a isso, o ouro, em porções nanométricas (GNP) tem apresentado propriedades antiinflamatórias e antioxidante. Com isso, o objetivo desse estudo foi verificar se a suplementação de melatonina associada ou não a nanopartículas de ouro pode contribuir para aumentar a imunidade e reduzir os danos oxidativos cerebrais e sistêmicos em animais expostos a um modelo experimental de GBM. 105 camundongos c57-black/6 foram divididos em duas etapas do experimento: a primeira para a caracterização do modelo experimental, os animais foram divididos em 2 grupos (Controle e GBM); na segunda etapa os animais foram divididos em 8 grupos (Controle, GBM, Melatonina, GNP, GNP + Melatonina, GBM + Melatonina, GBM + GNP e GBM + Melatonina + GNP). Animais de grupos com GBM (2, 6, 7, 8) receberam células tumorais GL261, já animais dos grupos sem doença (1, 3, 4, 5) receberam PBS, ambos por cirurgia estereotáxica. 7 dias após a cirurgia, os animais começaram a receber a suplementação, durante 21 dias. Neste período foi avaliado peso, ingestão de líquidos e comida, limiar de dor e parâmetros de equilíbrio e locomoção. 28 dias após a indução os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo coletados o sangue e cérebro para análises histológicas, bioquímicas e moleculares de parâmetros de estresse oxidativo. Na etapa 01 o modelo de GBM induzido através da inoculação intracerebroventricular de células GL261 se mostrou viável, com animais GBM apresentando dano em DNA, déficits locomotores, aumento de dor e alterações histopatológicas particulares do glioblastoma. Já na etapa 02 a suplementação de melatonina, GNP ou a associação de ambas mostrou um maior número de resultados significativos quanto a parâmetros clínicos, comportamentais, produção de oxidantes em relação a níveis de oxidação de DCFG, sistema redox (Sistema glutaciona) e dano oxidativo em proteínas. Tomados em conjunto, nossos dados mostram que o modelo animal utilizando células GL261 é capaz de mimetizar a doença e também sugere que a associação de Melatonina à nanopartículas de ouro pode vir a ser uma nova terapia em potencial para pacientes com GBM. No entanto mais estudos ainda são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual isso ocorre.

Palavras chave: GL261, Glioblastoma, Melatonina, Nanopartículas de ouro, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Gliomas are the most frequent tumors of the central nervous system, which are allocated in glial cells. Among its subclassifications, grade IV (glioblastoma - GBM) is the one with the most severe prognosis, because it is considered highly complex, due to the capacity of infiltration, and makes it difficult to completely resect it. Previous studies have shown that oxidative stress is a phenomenon present in the disease and can be an important agent on the decline of immunity and its progression. In this way, studying therapies that are responsible for reducing the worsening of the disease becomes extremely relevant for public health. Melatonin (MEL) is a hormone synthesized from tryptophan and produced by the pineal gland responsible for the temporal organization of biological rhythms. In addition to important role in the endocrine regulation and in the immune system, it also has an antioxidant function. Recommended with the definition of anti-inflammatory and antioxidant properties. The objective of this study was to verify whether the supplementation of melatonin associated or not to gold nanoparticles may contribute to increase immunity and reduce cerebral and systemic oxidative damages in animals exposed to an experimental model of GBM. 105 c57-black / 6 mice were divided in two stages of the experiment: a first for a characterization of the experimental model, the animals were divided into 2 groups (Control and GBM); (Control, GBM, Melatonin, GNP, GNP + Melatonin, GBM + Melatonin, GBM + GNP and GBM + Melatonin + GNP). Animals from GBM groups (2, 6, 7, 8) received GL261 tumor cells, and animals from the disease-free groups (1, 3, 4, 5) received PBS, both by stereotactic surgery. 7 days after surgery, the animals began receiving supplementation for 21 days. In this period we evaluated weight, fluid and food intake, pain threshold, balance and locomotion. 28 days after the induction the animals are euthanazieds by cervical dislocation, being collected on blood and brain for histological, biochemical and oxidative stress control molecules. In step 01 the GBM model induced by the intracetal-ventricular inoculation of GL261 cells was shown to be viable, with GBM animals exhibiting DNA damage, locomotor deficits, increased pain, and particular histopathological etiologies of glioblastoma. In step 02 the supplementation of melatonin associated to GNP showed a greater number of significant results regarding a clinical parameter, behavioral, production of oxidants, redox system and oxidative damage in proteins. Taken together, our data show that animal model GL261 cell development is able to mimic a disease and also suggests that an association of melatonin to gold nanoparticles may prove to be a potential new therapy for GBM patients. However further studies are still needed to elucidate the mechanism by which this occurs.

Key words: GL261, Glioblastoma, Melatonin, Gold nanoparticles, Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Resposta imune dividida em Tipo 1 e Tipo 2.....	19
Figura 2: Modelo proposto de NRF2 na resistência TMZ.....	21
Figura 3: Desenho experimental para indução, suplementação e eutanásia dos animais.....	30
Figura 4: Parâmetros comportamentais de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.....	36
Figura 5: Cortes histológicos de tecido cerebral (região parietal) corados em H&E de animais submetidos ao modelo experimental de glioblastoma por administração estereotáxica de células GL261.....	37
Figura 6: Parâmetros de danos em DNA no parietal de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.....	38
Figura 7: Produção de oxidantes no hemisfério esquerdo do cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.....	41
Figura 8: Sistema redox hemisfério esquerdo do cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.....	42
Figura 9: Carbonilação de proteínas do hemisfério esquerdo do cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento do GBM.....	31
Tabela 2: Dados clínicos de animais submetidos a um modelo experimental de glioblastoma.....	35
Tabela 3: Dados clínicos de animais submetidos a um modelo experimental de glioblastoma (GBM) e tratados com melatonina (MEL) e/ou nanopartículas de ouro (GNP).....	39
Tabela 4: Dados comportamentais de animais submetidos a um modelo experimental de glioblastoma (GBM) e tratados com melatonina (MEL) e/ou nanopartículas de ouro (GNP).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AKT – Proteína quinase B

BHE – Barreira hematoencefálica

BSO - Buthionina sulfoximina

CDK – Inibidor da cinase dependente de ciclina homozigótica

CEUA – Comissão de ética do uso de animais

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

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético di-hidratado do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate*

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GBM – Glioblastoma

GIMs - Glioma infiltrando macrófagos e micróglia

GNP – Nanopartículas de ouro, do inglês *Gold nanoparticles*

GPX – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione total

GSSG – Glutathione reduzida

GST – Glutathione S-transferase

HIF-1 - Fator indutível de hipóxia 1

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística

IDH – Isocitrato desidrogenase

INCA – Instituto nacional do câncer

INK4- α - inibidores de quinases dependentes de ciclina 4 alpha

M1 – Macrófagos do tipo 1

M2 – Macrófagos do tipo 2

MEL - Melatonina

MGMT – O6-metilguanina metiltransferase

MMP-2 – Metaloproteinase de matriz 2

mTOR – Mammalian target of rapamycin

NF κ B - Fator nuclear kappa B

NRF2 - Fator nuclear eritróide 2

OMS – Organização mundial da saúde

ONUBR – Organização das nações unidas – Brasil

PD-L1 – Ligante de morte programada – 1

PI3K – Proteína fosfoquinase 3

RPM – Rotações por minuto

SNC – Sistema nervoso central

STAT3 - Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TMZ – Temozolamida

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 GLIOMA.....	15
1.2 GLIOBLASTOMA.....	16
1.3 O PAPEL DA INFLAMAÇÃO E DO SISTEMA REDOX EM GLIOMAS.....	17
1.4 O PAPEL DO SISTEMA GLUTATIONA EM GLIOMAS.....	20
1.5 MODELOS ANIMAIS.....	21
1.6 MELATONINA.....	23
1.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	27
3.2 ANIMAIS.....	27
3.3 ETAPAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	27
3.4 CULTURA DE CÉLULAS GL261.....	27
3.5 MODELO EXPERIMENTAL DE GBM.....	28
3.6 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MELATONINA.....	28
3.7 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	28
3.8 TESTE DE CAMPO ABERTO.....	29
3.9 TESTE DE ROTA ROD.....	29
3.10 DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
3.11 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	30
3.12 DESTINO DOS ANIMAIS APÓS EXPERIMENTO.....	30
3.13 INDICADORES GERAIS.....	31
3.14 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	31
3.15 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	32
3.16 DANOS EM DNA.....	33
3.17 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	33
3.18 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 ESTUDO 01.....	35

4.1.1 Parâmetros clínicos.....	35
4.1.2 Parâmetros comportamentais.....	35
4.1.3 Parâmetros histológicos.....	37
4.1.4 Danos em DNA.....	37
4.2 ESTUDO 02.....	38
4.2.1 Parâmetros clínicos.....	38
4.2.2 Parâmetros comportamentais.....	39
4.2.3 Produção de oxidantes.....	41
4.2.4 Sistema Redox.....	41
4.2.5 Dano oxidativo em proteína.....	42
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Fatores de risco modificáveis, como o estilo de vida e não modificáveis, como fatores genéticos, constituem a base do surgimento de diversos tipos de tumores, os quais podem atingir estruturas corporais extremamente sensíveis e de difícil diagnóstico (INCA, 2006). O câncer em si é considerado um crescimento celular anormal, capaz de invadir tecidos adjacentes ou à distância, através de metástase (Uehara et al., 1998). No Brasil, segundo Ministério da Saúde (2012) esta patologia corresponde a cerca de 16% dos óbitos, número superado apenas por óbitos relacionados a doenças do sistema circulatório (29%). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2016) apontam que de todos os tumores malignos no mundo, cerca de 2% correspondem ao câncer do sistema nervoso central (SNC) (Porter et al., 2010).

Em termos de incidência, o câncer do SNC é o 14º tipo mais frequente em homens com o risco estimado de 3,9/100 mil e o 15º entre as mulheres, com o risco estimado de 3,0/100 mil. As maiores taxas de incidência encontram-se nos países europeus. Apesar de esse tipo de tumor ser relativamente raro, contribui, de forma significativa, para a mortalidade no mundo inteiro. Para o Brasil, no ano de 2016, estimam-se 5.440 casos novos de câncer do SNC em homens e 4.830 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

Dentre os tumores no SNC, os gliomas encontram-se entre os tipos histológicos mais frequentes e representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC, sendo mais comum na faixa etária adulta. A maioria dos tumores do SNC corresponde aos originados no neuroepitélio primitivo. A principal célula envolvida neste tipo de tumor é a neuroglial, motivo pelo qual são caracterizados como gliomas. Este tecido chamado de glia é responsável pela nutrição e suporte neuronal, auxiliando-os a cumprir suas funções com êxito (American Brain Tumor Association, 2016).

Mesmo sendo um tipo de câncer muito agressivo, com uma baixa estimativa de sobrevida para o paciente (American Brain Tumor Association, 2016), ainda há poucos estudos relacionados a tratamentos para este tipo de neoplasia, tornando-se, portanto, um grande desafio para a saúde pública atualmente.

1.1 GLIOMA

Dentre os tumores que ocorrem no SNC, há aqueles que surgem nas células que dão suporte ao funcionamento do sistema, chamadas células da glia. Todos tumores que ocorrem nessa região são chamados de gliomas. Os gliomas, por sua vez, são classificados pelo seu tipo celular predominante como astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma e tumores mistos oligodendrogliais e astrocíticos. A grande maioria é caracterizada pelo crescimento infiltrativo difuso no parênquima circundante do SNC (Schneider et al., 2010; Lenting et al., 2017).

O astrocitoma é o tipo de tumor mais frequente, o qual ocorre nos astrócitos onde a função principal é a sustentação e a nutrição dos neurônios. Dores de cabeça, convulsões, perda de memória e alterações no comportamento são os sintomas iniciais mais comuns do astrocitoma. Podem ocorrer outros sintomas dependendo do tamanho e localização do tumor e como muitos tipos de tumores, a causa exata não é conhecida (American Brain Tumor Association, 2016). A OMS classifica os astrocitomas em quatro graus, com base nas suas características histológicas: grau I (astrocitoma pilocítico, astrocitoma subependimário de células gigantes), ocorre predominantemente em crianças e adultos jovens e podem ser tratados cirurgicamente ou com inibidores de mTOR; grau II (astrocitoma difuso), os quais manifestam-se habitualmente por crises convulsivas em adultos jovens. Podem ser tratados cirurgicamente e com certos agentes quimioterápicos, como a temozolamida (TMZ); grau III (astrocitoma anaplásico) que em geral surge na quarta e na quinta décadas de vida tendo o tratamento igual ao de grau IV que consiste em ressecção cirúrgica máxima, seguida de radioterapia, com administração concomitante e adjuvante de TMZ ou com radioterapia e TMZ adjuvante isoladamente; grau IV (glioblastoma) onde os tumores aparecem como massas constrictadas em anel, com necrose central e edema circundante. Apesar dos diversos tratamentos, os glioblastomas sempre sofrem recidiva (DeAngelis & Wen, 2012). Aproximadamente 50% dos gliomas são representados por glioblastomas multiformes (GBM) (Schneider et al., 2010).

1.2 GLIOBLASTOMA

O glioblastoma ou glioblastoma multiforme ("multiforme" já não faz parte da designação da OMS, embora o glioblastoma ainda seja frequentemente abreviado como "GBM") está entre os tipos de tumores do SNC que motiva apreensão pelo grau de incidência e recidiva. Este tipo de tumor geralmente é maligno, pois suas células se reproduzem rapidamente e estes são sustentados por uma grande rede de vasos sanguíneos. É o tumor com maior grau (grau IV), e suas características histológicas, que o distinguem de todas as outras classes, são a presença de necrose e o aumento de vasos sanguíneos ao redor do tumor (Tran e Rosenthal, 2010; Field et al., 2013; Sia et al., 2013; American Brain Tumor Association, 2016).

Pacientes com glioblastoma têm uma sobrevida mediana de 9 meses e apenas de 5 a 10% desses pacientes sobrevivem até 2 anos. As terapias convencionais para o glioblastoma são a remoção cirúrgica da massa tumoral, seguido de radioterapia, porém esses tumores são muitas vezes radiorresistentes (Legler et al., 1999; DeAngelis, 2001).

Quanto aos sintomas, com o crescimento progressivo do tumor, uma vez que o crânio não pode expandir em resposta, os primeiros sintomas são geralmente devido ao aumento da pressão no cérebro levando a dores de cabeça, convulsões, perda de memória e alterações no comportamento. Perda de movimento ou sensação de um lado do corpo, disfunção da linguagem e deficiências cognitivas também são comuns. (American Brain Tumor Association, 2016).

Uma grande parte do GBM (90%) são tumores primários com uma tumorigênese de vários estágios que se desenvolve a partir de células gliais normais. Os outros 10% dos casos são neoplasias secundárias, originadas através da progressão de tumores de baixo grau (astrocitomas difusos ou anaplásicos) (Kabat et al., 2010). Os GBMs secundários têm uma taxa de necrose diminuída, são diagnosticados em pacientes com idade média de 39 anos e apresentam um crescimento lento e um melhor prognóstico. Os GBMs primários e secundários são estritamente similares em termos de morfologia, embora os padrões genéticos e os caminhos que conduzem ao seu desenvolvimento e progressão sejam diferentes (Rinaldi et al., 2016). As principais características moleculares e genéticas do GBM primário são representadas por: amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), deleção ou mutação do inibidor da cinase dependente de ciclina

homocigótica (CDK) p16IN K4A/(CDKN2A), alterações na fosfatase e no homólogo de tensina (PTEN) no cromossomo 10 e deleção no INK4- α (Caruso & Caffo, 2014). Curiosamente, as mutações de isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) são muito freqüentes em GBMs secundários (> 80%) e raras em primárias (<5%), entretanto em GBMs primários, a mutação ocorre no isocitrato desidrogenase 2 (IDH2), sendo um marcador genético e um marcador molecular para diagnóstico definitivo de glioblastoma (Rinaldi et al., 2016).

Nos últimos anos, marcadores moleculares têm sido intensamente explorados para superar a limitação no diagnóstico histopatológico de glioblastomas. A classificação por perfis de expressão genética revelou classes moleculares não detectadas pelos métodos tradicionais ao olhar para amostras de tumor em microscópio. A metilação do promotor do gene da O6-metilguanina metiltransferase (MGMT) por exemplo, revelou um aumento na sobrevivência, e a resposta de uma pessoa a certos agentes quimioterapêuticos no tratamento do glioblastoma. Estes marcadores estão começando a ser usados como um teste de diagnóstico para prever uma sobrevivência mais longa e para avaliar a eficácia de novas drogas moleculares direcionadas (Trindade et. al., 2012; Cohen et, 2013; American Brain Tumor Association, 2016).

1.30 PAPEL DA INFLAMAÇÃO E DO SISTEMA REDOX EM GLIOMAS

Em 1863, Rudolf Virchow pressupôs que o câncer se origina em locais de inflamação crônica após sua observação da infiltração de leucócitos dentro dos tumores (Balkwill e Mantovani, 2001). No entanto a literatura recente aponta para uma relação mais complexa entre a inflamação eo crescimento tumoral. Os dados agora demonstram mecanismos através dos quais um microambiente inflamatório pode conduzir à tumorigênese (Karin, 2006 e Mantovani et al., 2008).

Modelos de câncer inflamatórios induzidos pelo corpo começam com uma célula normal adquirindo uma mutação que confere vantagens de sobrevivência em relação as células vizinhas. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e intermediários nitrogenados reativos, secretados por células inflamatórias ativadas ou citocinas no microambiente, podem atuar como fonte de instabilidade genômica e danos ao DNA (Michelson et al., 2016).

Mecanismos similares foram relatados no contexto de gliomas, cuja associação com um ambiente imunossupressor está bem documentada. Em pacientes com glioblastoma, por exemplo, a presença de FoxP3 + células T reguladoras - que inibem uma resposta imunitária antitumoral - tem sido associada a um curso clínico mais agressivo (Sayour et al., 2015). A morte programada do ligante 1 (PD-L1) ou CD274, é uma proteína cuja função é a supressão do sistema imunitário, domina no meio do tumor e é conhecida por promover a infiltração de glioma (Vlahovic et al., 2015).

Particularmente no caso de glioblastomas, o parênquima cerebral é hospedeiro de uma grande variedade de infiltrados imunitários tais como macrófagos, microglia, neutrófilos e eosinófilos. Após a estimulação por vários fatores de sinalização secretados pelo glioblastoma, os infiltrados imunitários iniciam cascatas de inflamação que provocam danos adicionais no DNA, angiogênese, metástase e crescimento/proliferação de tumores (Karin, 2006; Sowers et al., 2014; Michelson et al., 2016). No entanto, em tumores cerebrais, a inflamação leva à gliomagênese devido, em parte, à polarização de infiltrados imunes ao fenótipo M2 por vários fatores secretados pelo glioma (Czlonkowska e Kurkowska-Jastrzebska, 2011; Lisi et al., 2014). Até o momento, poucas evidências têm diferenciado o papel dos macrófagos infiltrantes do glioma e da microglia, e assim o termo "macrófago/microglia" é empregado pelos pesquisadores (Hussain et al., 2006; Wei et al., 2013).

A resposta imune pode ser dividida em Tipo 1 e Tipo 2 (Figura 1), sendo que a resposta imune de Tipo 1 é pró-inflamatória e é caracterizada por macrófagos e microglia que têm a capacidade de processar e apresentar antígenos, fagocitar, secretar altos níveis de intermediários tóxicos e intermediários de oxigênio reativos, bem como promover a morte e inflamação de células citotóxicas (M1). A resposta de Tipo 2, por outro lado, é anti-inflamatória e pró-tumorigênica. Suas características incluem glioma infiltrando macrófagos e microglia (GIMs) que prejudicam a citotoxicidade, inibem a inflamação, induzem células T reguladoras, bem como anergia de células T efetoras, e promovem sobrevivência, angiogênese, proliferação e metastasis (M2) (Mantovani et al., 1992; Lin et al., 2001; Pollard, 2004).

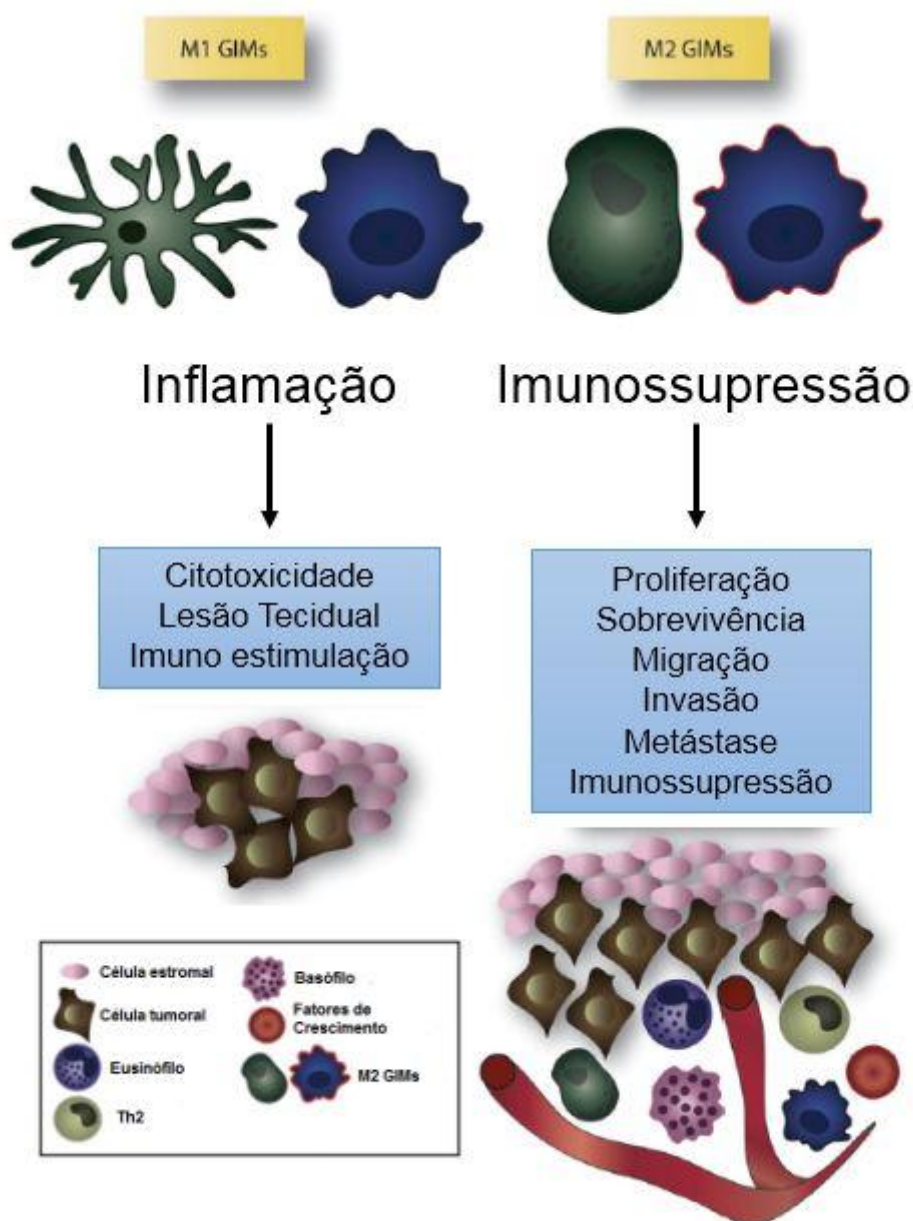


Figura 1: Resposta imune dividida em Tipo 1 e Tipo 2. Os macrófagos M1 e a microglia têm a capacidade de processar e apresentar antígenos, fagocitar, secretar níveis elevados de intermediários tóxicos e intermediários reativos de oxigênio, e promover a morte celular citotóxica assim como a inflamação. Os GIM M1 são distintos dos GIM M2 que prejudicam a citotoxicidade, inibem a inflamação e promovem o crescimento do tumor. As quimiocinas no microambiente do glioma polarizam essas células imunes em direção ao último extremo do espectro (Adaptada de Michelson et al., 2016).

Em relação as ERO em gliomas, estas podem exercer diferentes efeitos de acordo com a taxa metabólica basal das células. O SNC tem alta atividade metabólica e teor de ácidos graxos, por que é particularmente sensível ao dano oxidante por ERO. Dentro do SNC, astrócitos e neurônios possuem sistemas antioxidantes, como o sistema GSSG-GSH que protege essas células de danos oxidantes; no entanto, a expressão de mRNA para SOD e enzima catalase é alta em astrócitos. Essas

diferenças na expressão de enzimas antioxidantes fazem os astrócitos particularmente sensíveis aos danos induzidos por ERO, levando a instabilidade genética quando o equilíbrio redox é perdido (Salazar-Ramiro et al, 2016).

As células cancerosas apresentam altos níveis basais de ERO, necessários para o aumento da taxa de proliferação (Szatrowski e Nathan, 1991). Estudos recentes mostraram que níveis elevados de ERO em células cancerosas são o resultado do aumento da atividade metabólica basal, disfunção mitocondrial, devido a hipoxia ou mitofagia, atividade de peroxissomas, fatores de crescimento descontrolados de sinalização de citocinas, atividade de oncogene, bem como atividade aprimorada de conhecidas fontes de ERO, como NADPH oxidase, ciclooxigenases ou lipoxigenases (Babior, 1999; Storz, 2005) em células cancerígenas. Sendo assim, a alteração na homeostase redox está envolvida no início, progressão e regressão da neoplasia.

1.4 O PAPEL DO SISTEMA GLUTATIONA EM GLIOMAS

Uma alta taxa de metabolismo do oxigênio é encontrada nos neurônios e astrócitos do cérebro humano, onde ocorre uma grande quantidade de reações de redox. Em circunstâncias normais, os sistemas de oxidação e antioxidantes estão em um estado favorável de equilíbrio dinâmico. A glutathiona (GSH) e enzimas relacionadas com GSH (GR, GPX, GSSG, GST) nos tecidos cerebrais constituem o sistema de defesa antioxidante mais importante, o qual protege as células dos ataques de radicais livres, radioterapia e quimioterapia (Zhu et al., 2017).

Estudos anteriores relataram que os níveis intracelulares de GSH estão altamente correlacionados com a resistência aos medicamentos. O aumento dos níveis de GSH nas células de câncer de ovário humano induzem a resistência das células tumorais à platina (Belotte et al., 2014), enquanto a diminuição dos níveis de GSH nas células de mieloma múltiplo aumenta a sensibilidade das células tumorais ao trióxido de arsênio (Srivastava et al., 2013). Portanto, o conteúdo de GSH das células de glioma está intimamente relacionado com a regulação geral do estado redox e resposta ao fármaco das células (Backos et al., 2014).

Assim, estratégias terapêuticas que possam vir a modular os níveis de GSH são alternativas tentadoras. Em estudo realizado por Rocha et al., (2016), foi visto que embora a resistência ao tratamento com TMZ seja geralmente associada aos

mecanismos de reparo do DNA, foi demonstrado que o estresse oxidativo também desempenha um papel importante. Após o tratamento com TMZ, há uma indução do fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (NRF2), que é o principal regulador do fator de transcrição antioxidante nas células humanas, vindo acompanhado por um aumento da concentração de glutathiona (GSH) nas células tumorais. A eficácia desta via foi comprovada pelo silenciamento de NRF2, que aumentou significativamente a morte celular após o tratamento com TMZ tanto *in vitro* como *in vivo*. Além disso, observou-se maior dano no DNA e morte celular induzida ao combinar BSO - um inibidor de GSH - com TMZ (Figura 2).

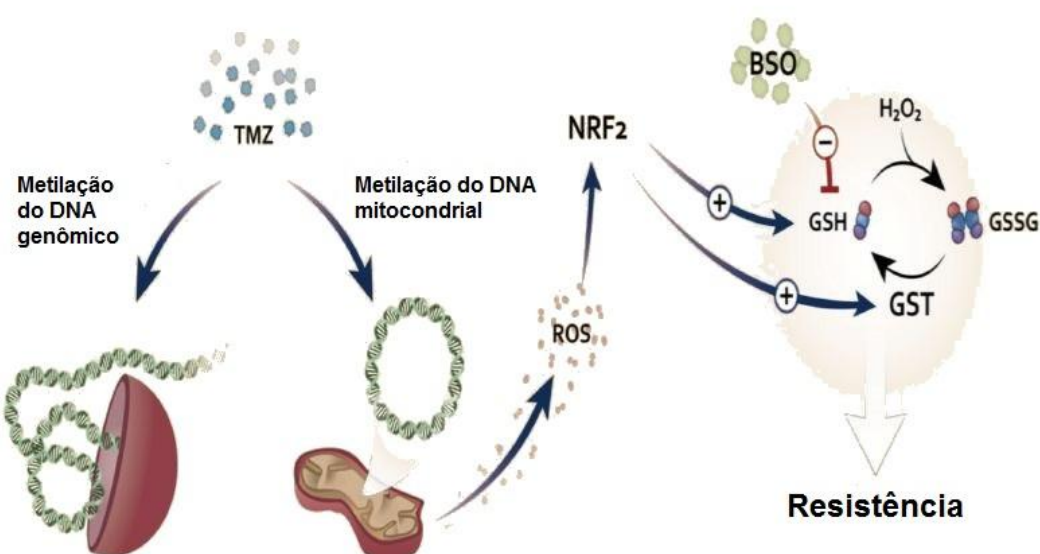


Figura 2: Modelo proposto de NRF2 na resistência TMZ. TMZ induz o dano de metilação do DNA genômico e mitocondrial. O dano do DNA mitocondrial pode levar ao mau funcionamento desta organela, aumentando a produção de ERO, o que, por sua vez, ativa o NRF2. Este fator de transcrição induz a expressão de genes relacionados à síntese e utilização de GSH. A GSH poderia atuar como um antioxidante (ERO neutralizado induzido pelo tratamento com TMZ) ou agente de desintoxicação (por ligação de GSH a TMZ através da atividade de GST, eliminando TMZ dentro das células). Aumento da atividade de NRF2, levando a níveis mais elevados de GSH, seria um mecanismo de resistência chave para TMZ (Adaptada de Rocha et al., 2016).

1.5 MODELOS ANIMAIS

Modelos animais são comumente usados no estudo do desenvolvimento de tumores e no teste de novas alternativas terapêuticas (Schold e Bigner, 1983; Peterson et al., 1994). O modelo animal ideal deve compartilhar as propriedades evasivas que o GBM humano exibe, uma vez que esta é uma das principais razões para o fracasso das estratégias atuais de tratamento (Newcomb e Zagzag, 2009).

Os modelos murinos de tumores cerebrais malignos são usados com menos frequência, principalmente porque o número de modelos disponíveis é limitado. Atualmente são utilizados três modelos para o estudo de GBM: o transplante de células de glioma murino em camundongos singênicos; o transplante de células de glioma humano em camundongos imunocomprometidos e modelos transgênicos (Peterson et al., 1994). Dentre esses três modelos, o modelo de transplante de células de glioma murino, no caso o com células GL 261, vem sendo muito utilizado (Miyatake et al., 1997; Glick et al., 1999; Kjaergaard et al., 2000; Lumniczky et al., 2002; Newcomb et al., 2004).

O modelo experimental de glioma GL261 foi induzido pela primeira vez por Seligman e Sher em 1939, onde foram implantados 20 pelets de meticolantreno em cérebros de ratos, dos quais 11 gliomas se desenvolveram. Um destes gliomas foi nomeado glioma GL261 e relatado por Ausman et al., somente em 1970. Seguido a isso foi realizado transplantes intracranianos e subcutâneos em série, de fragmentos tumorais em camundongos C57BL/6, permitindo assim com que se pudesse cultivar essas células para experimentos posteriores.

Como demonstrado em diversos estudos, os tumores formados por GL261, tem forma irregular com fronteiras invasoras nitidamente visíveis com células tumorais que avançam no cérebro adjacente ao tumor, mostrando assim maior semelhança com o glioma humano (Wiranowska et al., 1998;. Zagzag et al, 2003;. Cha et al., 2003).

Ainda como observado no GBM humano, este modelo exhibe mutações pontuais no gene supressor de tumor p53 e no oncogene Kras, enquanto também mostra aumento da ativação da via de fosfoquinase 3 (PI3K) e fosforilação de Akt (Stylli et al., 2015). A formação de tumores prossegue através de quatro estágios, ao longo de um período de quatro semanas, após a implantação: organização perivascular, proliferação perto da vasculatura, hipoxia por degeneração de vasos sanguíneos e neovascularização para regiões necróticas. A análise histológica revela pleomorfismo, necrose pseudopalisante e angiogênese. Embora invasivos, os tumores GL261 não são conhecidos como metastáticos e, mais importante, esses tumores não regredem espontaneamente, como outros tumores murinos são conhecidos por ocasião (Zagzag et al., 2000; Oh et al., 2014).

Apesar do seu uso freqüente, não há uma descrição detalhada disponível das características de crescimento da linha celular GL261, nem a imunogenicidade do modelo de tumor in vivo.

1.6 MELATONINA

Estudos prévios têm demonstrado que o estresse oxidativo é um fenômeno presente na doença, e pode ser um agente importante sobre a baixa resposta imune, observado em pacientes com GBM (Benchekroun et al., 1990; Tews, 1999; Dokic et al., 2012; Yuan et al., 2015). Desta forma, estudar terapias antioxidantes que possam contribuir para reduzir o agravo da doença torna-se extremamente necessário e relevante para a saúde pública.

Nesse sentido, a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), um composto orgânico produzido pela glândula pineal, sintetizado a partir do triptofano e que participa da organização temporal dos ritmos biológicos tem apresentado papel importante na regulação endócrina e no sistema imunológico, e exerce função antioxidante nos sistemas biológicos (Maganhin et al, 2008). Uma característica de grande importância da melatonina é a capacidade de poder atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (BHE). Além de uma variedade de funções fisiológicas importantes, ainda exerce um efeito neuroprotetivo em muitas condições patológicas do sistema nervoso central, incluindo a doença de Parkinson, doença de Alzheimer e isquêmica lesão cerebral.

Além disso a melatonina tende a ser promissora na terapia antioxidante, uma vez que ela não se torna um agente oxidante, pela perda de um elétron durante a interação com radicais livres; isto é, não possui potencial pró-oxidante (Kose, 2016). Zhang et al., (2013), mostraram em seu estudo que a melatonina reduziu fortemente a invasão mediada pela hipoxia e a migração das células de glioblastoma U251 e U87. Adicionalmente, verificou-se que a melatonina bloqueou significativamente a expressão da proteína HIF-1 e suprimiu a expressão de genes alvo a jusante, metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A melatonina também desestabilizou a hipoxia induzida por HIF-1 através da sua atividade antioxidante contra as ERO produzidas por células de glioblastoma em resposta à hipoxia. Considerando o fato de a sobre-expressão da proteína HIF-1 ser frequentemente detectada no glioblastoma multiforme, a melatonina pode revelar-se um potente agente terapêutico para este tumor.

Em outro estudo realizado por Chen et al. (2016) mostrou que a melatonina ajudou a direcionar as células de tumor de glioma alterando a biologia das células do GBM e inibindo a sua proliferação. Adicionalmente, a melatonina alterou o perfil dos

fatores de transcrição para inibir a iniciação e a propagação do tumor. Além disso, a fosforilação de EZH2 S21 e a interação EZH2-STAT3 foram prejudicadas após tratamento com melatonina. Estes resultados sugerem que a melatonina atenua múltiplos sinais-chave envolvidos na auto-renovação e sobrevivência das células tumorais.

Em estudos recentes autores relataram que a melatonina pode inibir a invasão do tumor através do aumento da adesão ao elevar a expressão de E-caderina e b1-integrina e diminuir a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs). Nas células de glioma, a concentração milimolar de melatonina pode reduzir o crescimento e inibir a progressão celular de G1 para a fase S do ciclo celular. No entanto, o efeito da melatonina na migração e invasão das células de glioma permanece ainda para ser explorado e elucidado (Wang et al., 2012).

1.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Na busca por novas terapias, 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 (Thambi e Park, 2014). 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 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 GNP (Nanopartículas de ouro) podem estar envolvidos na detenção do ciclo celular e apoptose mediada pelo estresse oxidativo, necrose ou danos ao DNA. A eficácia de GNP como potencial sensibilizador de radiação também foi determinada em múltiplas linhagens de células cancerígenas, no entanto, se GNP também pode sensibilizar as células de glioma para a radiação ainda não está claro

(Peidang et al., 2016). As GNP 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 GNP 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 suplementação de melatonina associada ou não a nanopartículas de ouro sobre parâmetros de estresse oxidativo cerebral em animais expostos a um modelo experimental de GBM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o modelo experimental de glioblastoma *in vivo* com células GL261 em camundongos C57BL/6.
- Avaliar os efeitos da suplementação de melatonina e/ou GNP sobre indicadores de escore clínico, locomoção, força e equilíbrio no cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.
- Avaliar os efeitos da suplementação de melatonina e/ou GNP sobre indicadores de desenvolvimento tumoral no cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.
- Avaliar os efeitos da suplementação de melatonina e/ou GNP sobre parâmetros de estresse oxidativo no cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.

3 METODOLOGIA

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC sob protocolo nº 024/2016-2, tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7).

3.2 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados um total de 105 camundongos C57/BL/6, machos, com idades entre 2 e 3 meses, fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de 12/12 horas a uma temperatura de 22 ± 1 °C, tendo livre acesso à água e alimentação padrão para roedores.

3.3 ETAPAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo foi dividido em duas etapas, denominadas de estudo 1 e estudo 2. No estudo 1, os animais foram divididos randomicamente em dois grupos, Sham e GBM e objetivou caracterizar e padronizar o modelo experimental sob as condições experimentais em nosso laboratório. No estudo 02, os animais foram divididos randomicamente também em dois grupos, sham e GBM, e posteriormente subdivididos nos subgrupos com os tratamentos com melatonina e GNP. Devido a elevada mortalidade durante os procedimentos, cada grupo amostral foi composto por aproximadamente 10 animais por grupo.

3.4 CULTURA DE CÉLULAS GL261

As células GL261 foram gentilmente fornecidas pela Dra. Elizandra Braganhol da Universidade Federal em Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS. As mesmas foram cultivadas em meio DMEM de alta glicose (Gibco by Life technologies),

enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco by Life technologies). O meio de cultura era trocado a cada dois dias e a repicagem realizada duas vezes por semana devido à alta proliferação desta linhagem celular.

3.5 MODELO EXPERIMENTAL DE GBM

Animais de grupos com GBM receberam células tumorais GL261 (3ul, 2×10^5 células/mL) intracerebroventricular por cirurgia estereotáxica. Os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de Cetamina (110mg/kg) e Xilazina (10mg/kg). As células tumorais foram injetadas 2 mm a direita da linha mediana, 1 mm para a frente do bregma, à uma profundidade de 2,5 mm (Lorico et al., 2008). Animais sham receberam 3uL de PBS intracerebroventricular por cirurgia estereotáxica, nas mesmas coordenadas acima. Após a cirurgia os animais receberam analgésico (Tramadol, 20mg/kg), durante 4 dias, 2x por dia.

3.6 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MELATONINA

A melatonina (Sigma Aldrich, Brazil) foi dissolvida em etanol absoluto e adicionada à água potável a uma concentração final de etanol de 0,06% (Corrales et al., 2014). A solução de melatonina foi preparada no escuro e correspondente a 3mg/Kg por dia (Anisimov, et al., 2003), a qual foi colocada em garrafas de água pintadas de preto para maior proteção da luz e maior estabilidade e trocada por uma solução fresca duas vezes por semana pois a mesma perde suas propriedades ao passar dos dias (Corrales et al., 2014). O volume de água ou melatonina consumido foi quantificado e dividido pelo número de animais por gaiola.

3.7 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

GNPs de tamanhos médios de 10 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich et al. (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (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, 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 GNP 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 GNP foram administradas via injeção intraperitoneal, pois para o grupo GBM+Melatonina+GNP era preciso um meio de inoculação em que a Melatonina e as GNP estivessem juntas para poder analisar o efeito conjunto da duas frente aos sintomas do GBM. Portanto, a dose de GNP injetada nos animais foi de 1mg/kg (150ul/animal), nos grupos 4 (GNP) e 7 (GBM + GNP) e de 1mg/kg de GNP + 3mg/kg de melatonina nos grupos 5 (Melatonina + GNP) e grupo 8 (GBM + Melatonina + GNP), sendo administrado duas vezes por semana.

3.8 TESTE DE CAMPO ABERTO

Para avaliar os possíveis danos locomotores, os camundongos foram avaliados no Teste de Campo Aberto (*Open-field test*), como descrito por Archer (1973). O teste consiste em colocar o animal em uma caixa quadrada com um quadrado menor desenhado no meio durante o tempo de 5 minutos. Durante esse período é contabilizado quantas vezes cada camundongo se apoia apenas nas patas traseiras e quantas vezes atravessa o quadrado desenhado no meio da caixa utilizada. No estudo 01 os animais foram submetidos ao teste antes da cirurgia de indução, e a cada 7 dias até o 28° dia. Conforme os resultados do estudo 01, no estudo 02 o teste foi realizado antes da cirurgia de indução, 8 dias após e 28 dias após.

3.9 TESTE DE ROTA ROD

Para avaliar os possíveis danos sobre a coordenação motora, será realizado o teste Rota-rod (Godoy et al., 2004). O aparelho consisti em uma barra rotativa (3,7 cm de diâmetro) dividida em 4 compartimentos separados, colocado a uma altura de 25 cm e rodando a uma velocidade fixa de 8 rpm. Na etapa 01 do

experimento os animais foram submetidos ao teste antes da cirurgia de indução, e a cada 7 dias até o 28º dia, onde o parâmetro analisado foi quantos minutos o animal levaria até a exaustão. Conforme os resultados da etapa 01, na etapa 02 o teste foi realizado antes da cirurgia de indução, 8 dias após e 28 dias após, onde o parâmetro avaliado desta vez foi quantas quedas o animal tinha durante o tempo de 4 minutos.

3.10 DESENHO EXPERIMENTAL

Os estudos 1 e 2 tiveram a duração de 28 dias, contados a partir do dia da indução ao GBM e finalizado com a eutanásia dos animais. Durante esse período, os animais foram acompanhados semanalmente para controle de indicadores clínicos e alimentares. Para o estudo 2, suplementação com melatonina e/ou GNP foi realizada a partir do 8º dia após a indução (Figura 3).

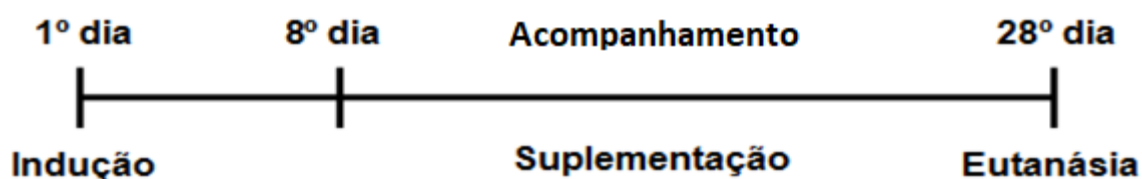


Figura 3: Desenho experimental para indução, suplementação e eutanásia dos animais.

3.11 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após os 28 dias, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Para o estudo 1 o cérebro foi retirado e dividido por lateralidade (esquerdo e direito) e utilizado o lobo parietal de ambos dos lados. Já no estudo 2 o cérebro foi retirado e dividido apenas por lateralidade. As amostras foram processadas, aliqüotadas e armazenadas para posteriores análises.

3.12 DESTINO DOS ANIMAIS APÓS EXPERIMENTO

Após os experimentos, o restante de tecidos dos animais foi acondicionado em saco branco leitoso e encaminhados para freezer (conservação) na própria universidade e coletados e transportados por uma empresa terceirizada. Os mesmos

foram autoclavados e posteriormente encaminhados para deposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos foram realizados conforme a RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

3.13 INDICADORES GERAIS

Nesse estudo os indicadores gerais utilizados foram o controle semanal do peso corporal médio utilizando uma balança de precisão 0,001g de marca Filizola, o controle do consumo alimentar através do peso da ração depositada nas caixas, consumo líquido por meio do volume médio diário ingerido pelos animais. Adicionalmente, no estudo 1, foi avaliado o escore clínico conforme Stromnes e Goverman (2006) (Tabela 01).

Tabela 1: Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento do GBM.

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

3.14 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Após a eutanásia dos animais do estudo 1, os tecidos cerebrais foram extraídos e fixados em formalina com tampão neutro a 4%, embebidos em parafina e seccionados a 5 µm para coloração de rotina. As seções foram desparafinadas e

reidratadas através de três mudanças de xilenol e álcool graduado e coradas com hematoxilina e eosina (H & E). As lâminas foram cobertas e as imagens foram adquiridas em um microscópio de transmissão de luz (Nesi et al., 2016).

3.15 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Produção de Oxidantes: A produção intracelular de oxidantes foi avaliada utilizando o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Lebel, 1990), com algumas modificações. Após a preparação de homogenatos, as amostras foram incubadas com 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (10 μ M) a 37°C durante 30 minutos, e a formação foi cessada a 4°C. DCFH-DA foi desesterificado no interior das células por esterases endógenas para o ácido livre ionizado. DCFH-DA foi então oxidado por hidroperóxidos e a formação do derivado fluorescente oxidada (DCF) foi monitorado com excitação e emissão de comprimentos de onda de 488 e 525 nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência SpectraMax (Califórnia, EUA).

Glutationa: Os níveis de glutathiona total (GSH) e dissulfeto de glutathiona (GSSG) foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH e GSSG foram mensuradas em homogenato de cérebro total após precipitação de proteína com 1 mL de ácido tricloroacético 10%. Para a GSH, foi adicionado tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μ M DTNB enquanto que para GSSG foi adicionado à solução 2-vinilpiridina. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis contra a curva padrão de GSH e GSSG foi determinada cineticamente a 412nm. Os dados foram expressos em nmol de GSH total ou GSSG por minuto por miligrama de proteína (nmol/min/mg proteína).

Danos oxidativos: Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupos carbonilas baseado na reação com dinitrofenilhidrazina, conforme previamente descrito por Levine et al. (1990). O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente a 370 nm utilizando o coeficiente 22.000 M.

3.16 DANOS EM DNA

A determinação dos danos em DNA foi realizada nos cérebros dos animais através do ensaio cometa como descrito por Singh et al. (1988). As amostras de cérebro foram dissecadas e imersas em tampão fosfato (PBS) refrigerado. Em seguida as amostras foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular. As células sanguíneas (alíquotas de 10 μ L) e as suspensões celulares (alíquotas de 70 μ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão ("low melting") e a seguir distribuídas em dois poços (alíquotas de 70 μ L) em lâminas pré-revestidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%, w/v) e cobertas com duas lamínulas. Depois de solidificadas, as lamínulas foram removidas e as lâminas colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0- 10,5, com adição na hora de Triton X – 100 e 10% de DMSO) por no mínimo 1 hora, protegidas da luz e incubadas em tampão alcalino novo (pH 12,6) durante 30 minutos para o desnovelamento do DNA. As células foram submetidas a uma corrida de eletroforese, com o mesmo tampão, durante 20 minutos a 30 volts e uma corrente de 300 miliamperes e posteriormente foram neutralizadas com solução neutralizadora. Para avaliação dos danos, as lâminas foram coradas com SyberGold por 30 minutos e visualizadas em microscópio de fluorescência com ampliação de 200x utilizando o programa Comet Assay IV. Foram avaliadas 100 células/indivíduo. As células foram classificadas de forma automática quanto às proporções do tail length (consiste na distância do meio do núcleo até o final da cauda em μ m). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

3.17 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Níveis de proteínas totais foram mensurados em todas as amostras usando o método de Bradford (Bradford, 1976). A albumina foi usada como proteína padrão e os resultados da regressão linear da curva foram usados para determinar a concentração total em mg de proteína.

3.18 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram expressos em média, desvio padrão ou erro padrão médio e analisados estatisticamente pelo teste de student ou análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO 1

4.1.1 Parâmetros clínicos

Conforme observado na Tabela 2, os animais do grupo sham apresentaram um aumento no peso corporal após o período experimental, enquanto que o grupo GBM manteve o peso corporal inalterado. Também se observa um aumento no score clínico dos animais com GBM após 28 dias de indução.

Tabela 2: Dados clínicos de animais submetidos a um modelo experimental de glioblastoma.

Grupos	Peso (kg) (Média±DP/dia em kg)			Escore clínico (Média/dia)		
	Basal	14º dia	28º dia	Basal	14º dia	28º dia
Sham (n=9)	24,7 (±1,1)	24,6 (±1,0)	26,9* (±1,2)	0	0	0
GBM (n=8)	23,8 (±1,7)	25,4 (±2,2)	25,7 (±1,6)	0	0,22 (±0,07)	1,19* (±0,6)

Os dados referentes ao peso e ao escore clínico estão expressos em média e desvio padrão (DP) e os dados foram analisados pelo teste *t de student* considerando o valor de $p < 0,05^*$ como estatisticamente diferente na comparação dos tempos de coleta (14 e 28 dias em relação aos valores basais).

4.1.2 Parâmetros comportamentais

No teste comportamental de campo aberto, os animais do grupo GBM tiveram menores locomoção (Figura 4A) e menor número de elevações (Figura 4B) no 28º dia, quando comparado ao grupo aos respectivos grupos sham. Nossos resultados ainda mostraram que o grupo GBM apresentou menor tempo sobre a barra rotatória até atingir a exaustão, permanecendo menos tempo no 21º e 28º dias, comparados ao grupo sham (Figura 4C).

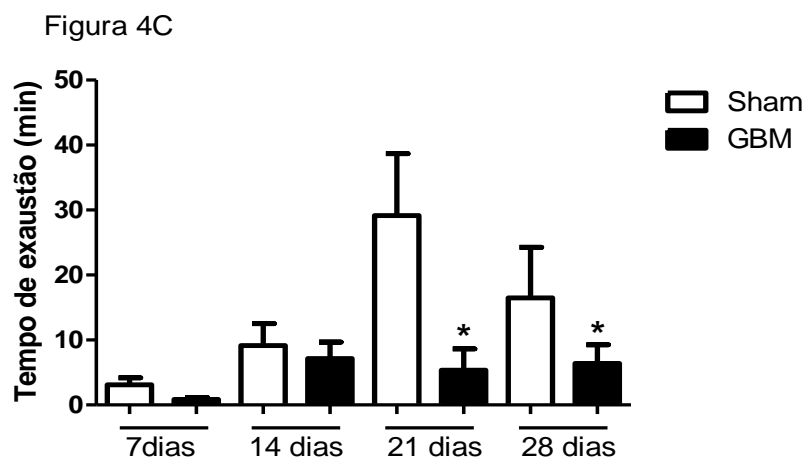
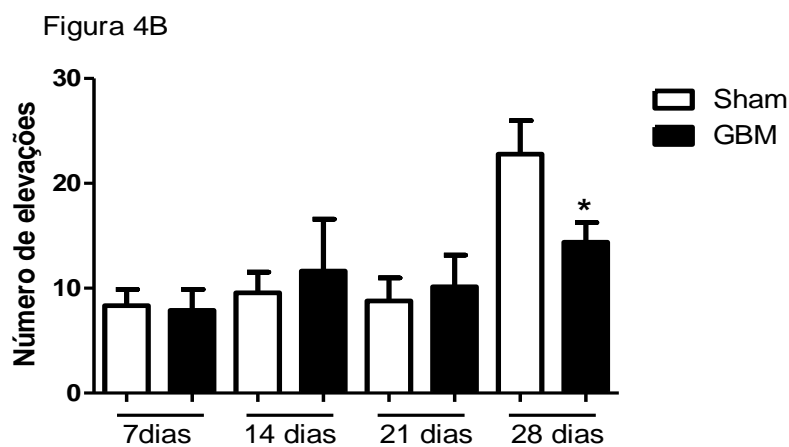
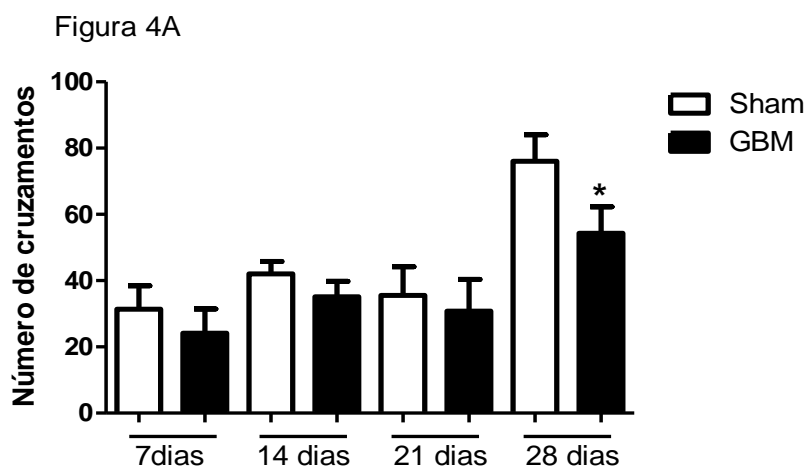


Figura 4: Parâmetros comportamentais de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma. (A) – Teste de campo aberto, com análise de cruzamentos durante 5 minutos, (B) – Teste de campo aberto, com análise de elevações nas patas traseiras durante 5 minutos, (C) – Teste de rota rod, tempo que o animal levou até a primeira queda. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística entre os grupos sham e GBM foram obtidas através do teste t de student considerando um $p < 0,05$.

4.1.3 Parâmetros histológicos

As figuras 5A e 5C, correspondem a imagens representativas do lobo parietal dos animais do grupo SHAM (hemisfério direito e esquerdo, respectivamente). Ambos os grupos apresentaram integridade do tecido com histoarquitetura e perfil celular compatíveis com o tecido cerebral, regiões com neurônios e células da glia com morfologia normal evidenciada pelo asterisco preto. Na imagem do grupo GBM, na figura 5B, representativa do hemisfério direito, foi possível observar áreas de necrose pseudopaliçada, evidenciado pela seta preta. Na imagem do grupo GBM referente ao hemisfério esquerdo, figura 5D, foram observados alguns astrócitos gemistocísticos, com núcleo fortemente corado e citoplasma róseo e tamanho atípico (seta pontilhada).

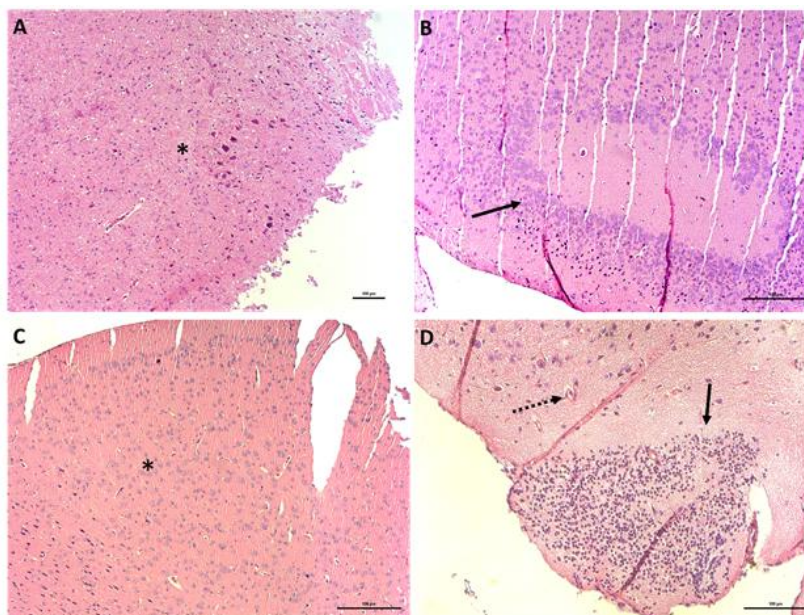


Figura 5: Cortes histológicos de tecido cerebral (região parietal) corados em H&E de animais submetidos ao modelo experimental de glioblastoma por administração estereotáxica de células GL261. Fotomicrografias histológicas representativas dos grupos experimentais respeitam a seguinte ordem: (A) grupo controle (hemisfério cerebral direito), (B) grupo GBM (hemisfério cerebral direito). (C) grupo controle (hemisfério cerebral esquerdo), (D) grupo GBM (hemisfério cerebral esquerdo). A aquisição de imagens foi realizada em objetiva de 10x. * morfologia celular normal. Seta preta - área necrótica envolta por pseudopaliçada. Seta pontilhada - astrócitos gemistocísticos.

4.1.4 Danos em DNA

Os resultados mostraram que grupo GBM apresentou valores significativamente maiores de dano em DNA que o grupo controle (Figura 6), verificados através do *tail intensity* (6A) e *moment intensity* (6B).

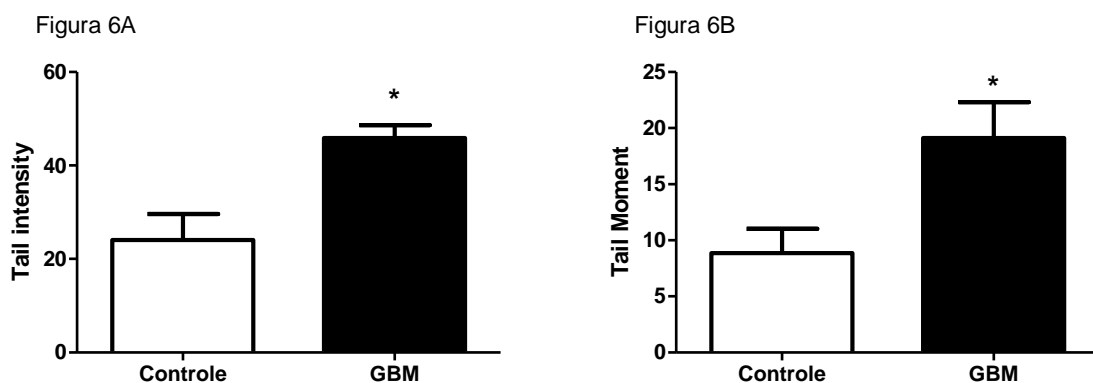


Figura 6: Parâmetros de danos em DNA no parietal de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística entre os grupos sham e GBM foram obtidas através do teste t de student considerando um $p < 0,05$.

4.2 ESTUDO 2

4.2.1 Parâmetros clínicos

Conforme observado na Tabela 3, os animais do grupo sham apresentaram um aumento no peso corporal após o período experimental, enquanto que o grupo GBM manteve o peso corporal inalterado. Os animais tratados com melatonina e GNP também tiveram aumento significativo no peso corporal. A ingestão de líquido e ração não foram alteradas.

Tabela 3: Dados clínicos de animais submetidos a um modelo experimental de glioblastoma (GBM) e tratados com melatonina (MEL) e/ou nanopartículas de ouro (GNP).

Grupos		Peso (kg) (Média±DP/dia)			Consumo Líquido (mL) (Média±DP/dia)	Consumo alimentar (g) (Média±DP/di a)
		Basal	14º dia	28º dia	Basal – 28º dia	Basal – 28º dia
Sham	Controle	24,0 (±1,9)	24,9 (±1,8)	26,1 (±1,9)*	6,0 (±1,9)	3,6 (±0,5)
	MEL	21,7 (±1,9)	21,6 (±2,2)	23,3 (±2,1)*	6,6 (±1,2)	3,4 (±0,2)
	GNP	23,4 (±2,6)	24,8 (±2,3)	25,3 (±2,6)*	5,6 (±0,1)	3,8 (±0,1)
	MEL+GNP	25,1 (±1,8)	26,6 (±1,3)	26,9 (±1,9)*	5,7 (±0,7)	4,6 (±0,2)
GBM	Controle	21,7 (±2,2)	23,2 (±2,3)	25,4 (±2,5)	6,2 (±0,3)	3,9 (±0,2)
	MEL	23,2 (±2,9)	24,6 (±2,1)	26,3 (±1,6)*	6,6 (±0,4)	3,9 (±0,4)
	GNP	24,9 (±3,3)	25,0 (±2,7)	26,4 (±3,3)*	5,6 (±0,8)	4,0 (±0,3)
	MEL+GNP	23,6 (±1,0)	23,4 (±2,3)	24,7 (±3,5)	5,7 (±0,2)	4,0 (±0,3)

Os dados referentes ao peso corporal e o consumo de líquidos e comida estão expressos em média e desvio padrão (DP) e os dados foram analisados pelo teste *t de student* considerando o valor de $p < 0,05^*$ como estatisticamente diferente na comparação dos tempos de coleta (14 e 28 dias) em relação aos valores basais). Todos os animais receberam água *ad libitum* com etanol 0,06% e dieta padrão. Sham Controle n=15; Sham MEL n= 11; Sham GNP n= 7; Sham MEL+GNP n=8; GBM Controle n=14; GBM MEL n= 13; GBM GNP n= 8; GBM MEL+GNP n=8.

4.2.2 Parâmetros comportamentais

Como observado na Tabela 4, os animais controle e tratados com MEL do grupo Sham e os animais tratados com MEL e MEL+GNP do grupo GBM reduziram significativamente sua locomoção no teste de campo aberto em relação aos valores basais e somente os animais tratados com MEL no grupo GBM apresentaram locomoção reduzida em relação ao controle. No que se refere ao número de elevações somente o grupo MEL+GNP do grupo GBM apresentam valores reduzidos em relação

aos níveis basais. Entretanto, os animais tratados com GNP do grupo GBM apresentaram uma significativa redução em relação ao controle e ao grupo sham. No teste de Rota-rod os animais tratados com GNP do grupo sham apresentaram um menor número de quedas em relação aos valores basais, ao contrário, os animais tratados com GNP do grupo GBM apresentaram um número de quedas maior em relação aos valores basais. Os animais tratados com GNP do grupo GBM apresentaram número aumentados de queda em relação ao controle. Por fim, os animais do grupo GBM apresentaram maiores números de queda em relação aos animais do grupo sham, exceto os animais que receberam a associação de GNP e MEL.

Tabela 4: Dados comportamentais de animais submetidos a um modelo experimental de glioblastoma (GBM) e tratados com melatonina (MEL) e/ou nanopartículas de ouro (GNP).

Grupos		Campo aberto (Média cruzamentos \pm DP)			Campo aberto (Média elevações \pm DP)			Rota rod (Média quedas \pm DP)		
		Basal	8º dia	28º dia	Basal	8º dia	28º dia	Basal	8º dia	28º dia
Sham	Controle	83,6 $\pm 26,5$	45,8 $\pm 21,4$	49,5 $\pm 19,5^*$	24,4 $\pm 14,3$	16,6 $\pm 10,1$	13,4 $\pm 13,6$	1,3 $\pm 0,7$	0,6 $\pm 0,6$	0,4 $\pm 0,6$
	MEL	43,1 $\pm 17,8$	35,0 $\pm 23,5$	44,9 $\pm 20,4$	14,0 $\pm 10,5$	11,1 $\pm 7,6$	11,6 $\pm 6,1$	0,6 $\pm 0,6$	0,4 $\pm 0,6$	0,1 $\pm 0,3$
	GNP	81,3 $\pm 14,9$	64,8 $\pm 17,8$	52,6 $\pm 20,7$	9,4 $\pm 5,3$	19,7 $\pm 8,3$	19,5 $\pm 9,2$	0,7 $\pm 0,4$	0,4 $\pm 0,5$	0,2 $\pm 0,3^a$
	MEL+GNP	104,5 $\pm 38,7$	60,3 $\pm 21,4$	52,1 $\pm 28,5^*$	17,8 $\pm 9,8$	23,7 $\pm 6,6$	18,9 $\pm 10,1$	0,4 $\pm 0,4$	0,1 $\pm 0,2$	0,3 $\pm 0,3$
GBM	Controle	74,9 $\pm 29,5$	80,2 $\pm 20,8$	61,6 $\pm 16,4$	12,8 $\pm 8,8$	17,8 $\pm 7,7$	17,7 $\pm 10,2$	0,9 $\pm 0,6$	0,7 $\pm 0,4$	0,7 $\pm 0,5^{\#}$
	MEL	93,3 $\pm 35,4$	73,9 $\pm 28,1$	38,6 $\pm 26,2^*$	20,8 $\pm 13,1$	12,5 $\pm 8,1$	15,3 $\pm 9,2$	0,6 $\pm 0,7$	0,8 $\pm 0,8$	0,6 $\pm 0,5^{\#}$
	GNP	56,0 $\pm 27,4$	36,3 $\pm 21,7$	43,1 $\pm 29,8$	14,3 $\pm 4,3$	8,8 $\pm 3,9$	10,1 $\pm 5,3^{**}$	0,7 $\pm 0,6$	1,1 $\pm 0,9$	3,2 $\pm 2,1^{\#}$
	MEL+GNP	113,2 $\pm 29,7$	61,1 $\pm 37,8$	74,8 $\pm 41,8^*$	24,3 $\pm 8,9$	19,2 $\pm 7,2$	14,6 $\pm 3,8^*$	0,8 $\pm 0,6$	0,8 $\pm 0,7$	0,1 $\pm 0,3$

Os dados referentes a número de cruzamentos e número de elevações nas patas traseiras (teste de campo aberto) e ao número de quedas do animal em 4 minutos, estão expressos em média e desvio padrão (DP) e os dados foram analisados pelo teste *t de student* considerando o valor de $p < 0,05$ como

estatisticamente diferente (^abasal versus 28^o dia; * tratamento 28^o dia versus controle 28^o dia; # GBM 28^o dia versus sham 28^o dia). Todos os animais receberam água *ad libitum* com etanol 0,06% e dieta padrão. Sham Controle n=15; Sham MEL n= 11; Sham GNP n= 7; Sham MEL+GNP n=8; GBM Controle n=14; GBM MEL n= 13; GBM GNP n= 8; GBM MEL+GNP n=8.

4.2.3 Produção de oxidantes

A produção de oxidantes celulares foi determinada pelos níveis de oxidação do DCFH. Os resultados apresentados na figura 7 revelam um aumento significativo no grupo GBM em relação ao grupo sham, porém, somente a associação entre GNP e melatonina manteve os valores em níveis de controle.

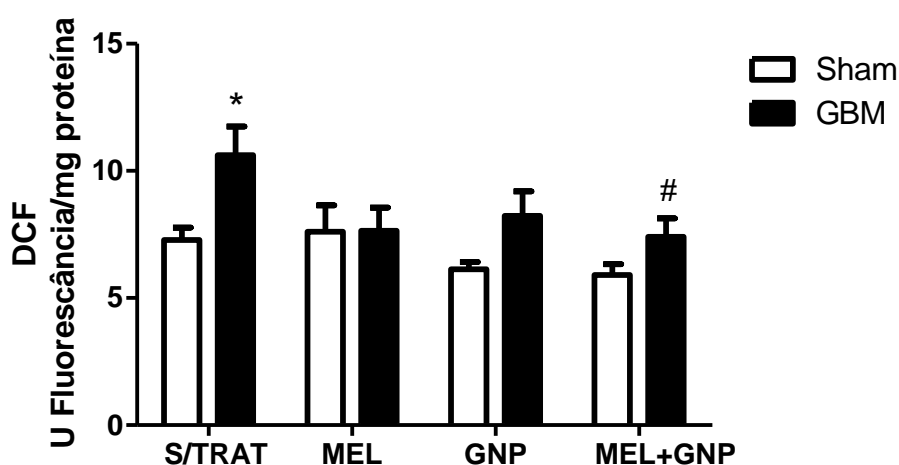


Figura 7: Produção de oxidantes no hemisfério esquerdo do cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística (*) grupo controle/grupo GBM e entre grupos GBM e GBM+MEL+GNP (#) foram obtidas através da análise de variância ANOVA Two way seguido pelo teste de Bonferroni considerando um $p < 0,05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 como pacote estatístico.

4.2.4 Sistema redox

A razão entre os níveis de GSH total e GSSG foi utilizada para estimar o estado redox do tecido cerebral. Como observado na Figura 8, animais com GBM e expostos ao tratamento com GNP apresentaram uma maior razão em relação aos animais não tratados e ao respectivo sham. A associação de GNP com melatonina também aumentou a razão GSH/GSSG em relação ao sham.

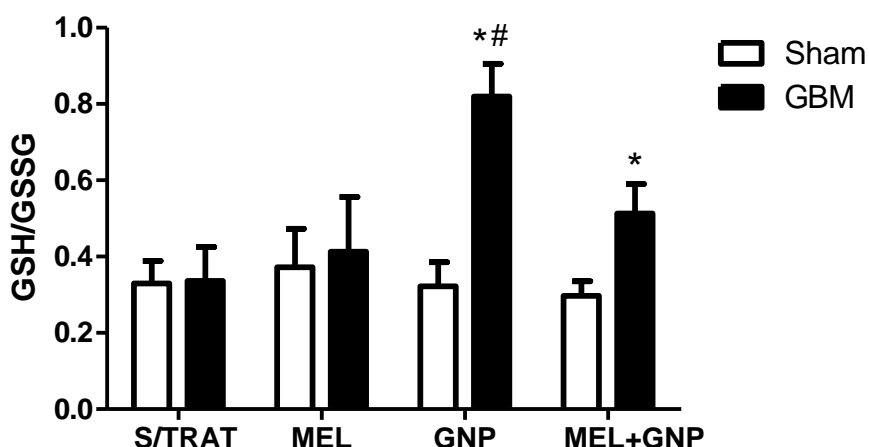


Figura 8: Sistema redox hemisfério esquerdo do cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística intra (*) e entre grupos (#) foram obtidas através da análise de variância ANOVA Two way seguido pelo teste de Bonferroni considerando um $p < 0,05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 como pacote estatístico.

4.2.5 Dano oxidativo em proteína

A modificação de proteína pela adição de grupos carbonilas foi utilizada como marcador de danos oxidativo. Os resultados apresentados na Figura 9 revelam um aumento significativo na carbonilação de proteínas nos animais com GBM e esse aumento foi significativamente reduzido em todas as formas de tratamento.

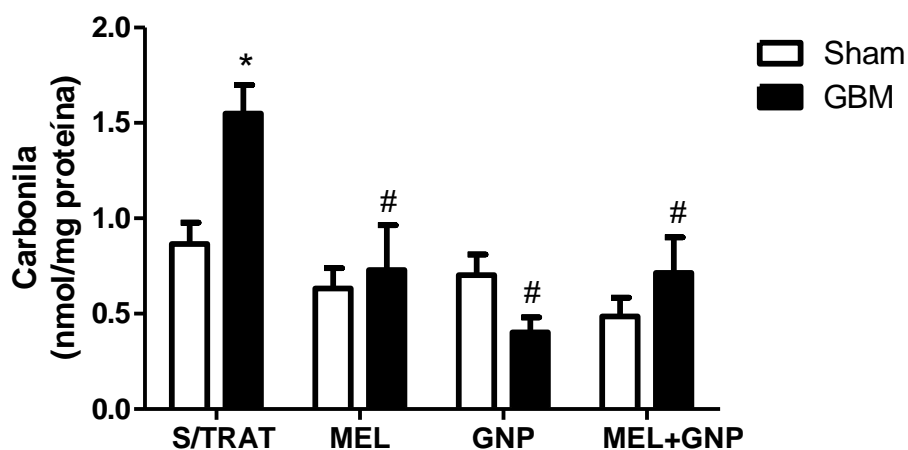


Figura 9: Carbonilação de proteínas do hemisfério esquerdo do cérebro de animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma. Os dados estão expressos em média e erro padrão médio. A diferença estatística intra (*) e entre grupos (#) foram obtidas através da análise de variância ANOVA Two way seguido pelo teste de Bonferroni considerando um $p < 0,05$. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 como pacote estatístico.

5 DISCUSSÃO

O GBM é um tumor cerebral altamente agressivo, onde sua hipótese de aparecimento está baseada na transformação maligna de células precursoras gliais e/ou glia madura. Apesar da ressecção cirúrgica máxima, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida global permanece em torno de 14,6 meses após o diagnóstico, com 26% dos pacientes que sobrevivem dois anos (Ladomersky et al., 2016). Apesar dos avanços na compreensão da doença, as opções terapêuticas disponíveis para o GBM permaneceram praticamente inalteradas nas últimas décadas. Portanto a busca por novas abordagens terapêuticas para melhorar o tratamento de paciente com glioblastoma são justificadas.

Na busca por novos tratamentos que busquem reduzir a progressão acelerada típica do GBM, estudar modelos animais que possam se assimilar em questões fisiológicas, comportamentais e moleculares tem ganhado cada vez mais relevância no meio científico. O modelo animal ideal deve assemelhar-se ao tumor humano em tantos aspectos quanto possível, como histopatologia, biologia tumoral e genética. Deve compartilhar as propriedades invasivas que o GBM humano exibe, uma vez que esta é uma das principais razões para o fracasso das atuais estratégias de tratamento (Newcomb e Zagzag, 2009). No presente estudo, um dos nossos objetivos iniciais era o de caracterizar um modelo experimental de glioblastoma *in vivo*, induzido por inoculação de células GL261, buscando analisar a compatibilidade com o GBM humano através de alguns parâmetros.

Embora a sobrevida de pacientes com tumores primários do SNC, submetidos a tratamento, esteja aumentando, percebe-se que estes apresentam quadros de deficiência intelectual, endócrino e neurológico, acarretando em diminuição da qualidade de vida e do papel do indivíduo dentro da sociedade. A extensão destas sequelas parece ser mais prevalente em jovens, em virtude à maior distorção e destruição do tecido cerebral pelo efeito do próprio tumor, aumento da pressão intra-craniana ou pelo trauma terapêutico (Torres et al., 1997). Além disso, Omuro e DeAngelis (2013) trazem que os principais sintomas encontrados em pacientes com GBM são dificuldades cognitivas e mudanças comportamentais.

Segundo Mukand et al. (2001) e Preusser et al. (2011), sintomas como afasia e hemiparesia, são comumente encontrados em pacientes com glioblastoma.

Estes mesmos achados foram representados em nosso estudo pela avaliação do escore neurológico (Tabela 2), onde o grupo que recebeu a administração de células GL261 apresentou maiores sinais clínicos em comparação ao SHAM, 14 dias após a inoculação, vindo a aumentar progressivamente até o 28º dia do estudo. O aumento no escore está relacionado com a paralisia da cauda (perda do tônus) e posteriormente a perda da coordenação dos movimentos e paresia das patas posteriores.

Em geral, na experiência clínica, os déficits funcionais em pacientes com tumores cerebrais dependem de dois fatores principais: tamanho do tumor e localização do tumor. Em um estudo realizado por Yang et al, (2006), foi utilizado um método de compressão mecânica com diferentes tamanhos de pérolas em forma de hemisfério implantadas no espaço peridural em vários locais do córtex sensorio-motor para investigar lesões de compressão cerebral focal, que é um aspecto importante do dano cerebral induzido pelo tumor. Como resultado foi visto que os déficits comportamentais dependem da localização e da magnitude da compressão focal.

Considerando que teste neurológico motor, é toda avaliação neurológica independente de fatores sensitivos e comportamentais e que possa demonstrar o desempenho de um ou mais componentes do sistema motor como equilíbrio, coordenação motora fina, vias extrapiramidais, piramidais e aprendizagem motora (Pinto e Ko, 2012), utilizamos dois dos principais testes para avaliar a função motora, o teste de campo aberto (Open field) e o rota-rod. Nossos resultados obtidos no teste de campo aberto (Figura 4A), mostraram que o grupo GBM em comparação com o grupo sham, apresentou um número reduzido de travessias e um menor número de elevações (Figura 4B), no 28º dia de experimento, sugerindo assim a presença de déficit motor nestes animais. Como descrito anteriormente este resultado pode estar relacionado ao fato de déficits motores começarem a surgir quando o tumor passa a ter um crescimento mais acelerado, aumentando a pressão intracraniana. Em pacientes com GBM, estes resultados são muitas vezes confundidos com transtornos psiquiátricos ou demência, particularmente em indivíduos idosos (Omuro e DeAngelis, 2013), levando assim ao descobrimento tardio da doença.

Em adição a isso, verificamos o tempo de latência ou exaustão, principal medida obtida no rota-rod que representa a característica de quatro grandes fatores envolvidos na função motora do roedor, tais como planejamento motor, coordenação motora, equilíbrio dinâmico, aprendizagem e condições físicas gerais e

neuromusculares (Shiotsuki et al., 2010). Mas, menor tempo de latência (quedas em menor tempo), representam em geral a alteração da coordenação motora de forma mais significativa do que a fadiga muscular (tempo de permanência no aparelho) (Brooks e Dunnett, 2009). Entretanto, ressalta-se que mudanças em ambas as valências representam uma alteração comportamental importante que compromete o padrão neuromotor possivelmente em função da doença manifestada.

Vannini et al. (2017) mostraram em seu estudo que animais após a administração de células GL261 intracerebroventricular, apresentaram melhoras em suas habilidades motoras, assim como o grupo controle. Porém, os portadores de GBM interromperam abruptamente seu aprendizado a partir do décimo sexto dia, enquanto o grupo controle continuou a melhorar suas habilidades motoras. O tempo de latência 19 e 22 dias após a administração das células foi significativamente menor comparado com o grupo controle. Esse trabalho sugere que tal alteração ocorre devido a extensão da massa tumoral, o que corrobora com nossos resultados (Figura 4C), onde a partir do 21º dia os animais do grupo GBM apresentaram um tempo até a exaustão significativamente menor em relação ao grupo sham.

Além das características comportamentais encontradas em pacientes com GBM, há também características histopatológicas específicas, as quais servem como parâmetro para a diferenciação entre os graus de gliomas (Maher et al., 2001). Dentre elas estão atipias nucleares, alta taxa mitótica, polimorfismo celular, trombose vascular, proliferação microvascular e necrose (Kleihues e Cavenee, 2000).

Nossos resultados, apresentados na Figura 5, demonstraram características histopatológicas como necrose envolta por área pseudopaliçada, não sendo detectada em áreas adjacentes. Isto é causado devido a proliferação endotelial dos vasos próximos, com obstrução da luz e isquemia (Plate et al., 1992). O termo "pseudopaliçada" refere-se à disposição mais concentrada e perpendicular dos núcleos neoplásicos em volta destas áreas de necrose. Como a proliferação vascular causa a necrose, ambas são consideradas como um único critério na graduação da malignidade dos astrocitomas difusos segundo a classificação da OMS (Plate et al., 1992). Na imagem do grupo GBM, referente ao hemisfério esquerdo (Figura 5D), foi observado alguns astrócitos gemistocíticos, com núcleo fortemente corado e citoplasma róseo e tamanho atípico. Alterações parecidas já foram descritas anteriormente por Dohrmann et al. (1976), Phuphanich et al. (1984) e Geyer et al.

(1995) que indicaram presença de células epitelióides, com núcleos hipercromáticos, alongados e anisomórficos e células gemistocíticas em animais com glioblastoma.

Ademais, outros estudos prévios como o de Clark et al., (2016) demonstraram que o modelo de inoculação de células GL261 é mais fidedigno que o modelo de xenoenxerto, por exemplo, pois muitos dos tumores xenoinxertados crescem como lesões encapsuladas na qual não recapitulam com precisão o GBM humano. Em contraste, o tumor gerado por células GL261 não só demonstra invasão em tecido cerebral adjacente, mas também neovascularização, figuras mitóticas e necrose (Cha, et al., 2003).

Além de alterações histopatológicas e danos neurológicos e motores, o câncer é uma doença que possui como característica a instabilidade genômica. Alterações como aberrações do número de cópias, modificações na sequência e metilação do DNA, e rearranjos cromossômicos, são consideradas marca registrada de células cancerosas e impulsionam o desenvolvimento e a progressão de neoplasias malignas humanas (Hasty et al., 2003; McLendon et al., 2008). De acordo com Gontijo e Tice (2003), as observações feitas pelo teste cometa revelam lesões genômicas que podem resultar em mutação. A partir disso, nossos achados (Figura 6), demonstraram que o grupo que recebeu as células GL261 teve um aumento no *tail intensity* e no *tail moment*, em comparação com o grupo controle, o que sugere um maior dano ao DNA. O mesmo pode ser explicado pelos achados de Sakaguchi et al. (1998) que demonstraram que o dano do DNA aumenta a atividade de p53, uma fosfoproteína que se destaca como supressora de tumor (Levine e Oren, 2009), e como Szatmári et al. (2006) já demonstraram que tanto nas células GL261 *in vitro* como em tecido cerebral que recebeu a administração de células GL261 o gene de p53 foi aumentado em comparação com o tecido cerebral normal.

Com estes resultados tomados em conjunto e sabendo da fisiopatologia do glioblastoma, o modelo escolhido é possivelmente um modelo capaz de mimetizar os sintomas relacionados ao GBM, sendo possível então a sua reprodução em nosso laboratório, A partir disto foi seguido para o estudo 2 onde o principal objetivo era o de verificar o efeito da suplementação de melatonina associada ou não a GNP sobre parâmetros de estresse oxidativo cerebral em animais expostos a um modelo experimental de GBM.

O microambiente do GBM compreende principalmente células reativas relacionadas ao sistema imune, juntamente com microglia, astrocitos, células

endoteliais, pericitos, células-tronco neurais e macrófagos de monócitos; estes últimos são abundantes em conjunto com a microglia, constituindo cerca de 30% da massa tumoral (Becher et al., 2008). Essas infiltrações de monócitos em GBM resultam em um microambiente pró-inflamatório que leva a alterações na homeostase redox, promovendo finalmente a gliomagênese. Por esta razão, algumas das novas alternativas terapêuticas estão focadas no desenvolvimento de novos agentes capazes de modular o estado redox no microambiente GBM, sozinhos ou combinados com agentes que estimulam a produção de EROs (Feng et al., 2015; Manda et al., 2015; Salazar-Ramiro et al, 2016).

Com isso vem a melatonina que, além de uma variedade de funções fisiológicas importantes, também exerce um efeito neuroprotetivo em muitas condições patológicas do sistema nervoso central (Brzezinski, 1997; Kaur e Ling, 2008), incluindo a doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Mayo et al., 2005; Rosales-Corral et al., 2011). Além disso, a melatonina exibe efeitos antioxidantes e atua como um eliminador de radicais livres (Wang et al., 2012). O interesse recente pela melatonina tem sido focado em seus possíveis efeitos antitumorais. De fato, os efeitos antitumorais da melatonina foram testados em muitos tipos de tumores, incluindo câncer de próstata, câncer colorretal, melanoma, câncer de ovário, câncer de mama, bem como tumores cerebrais (Mediavilla et al., 2010). A melatonina inibe a proliferação celular e induz a apoptose na maioria das linhas celulares dos tumores acima mencionados e diminui o crescimento tumoral em modelos tumorais murinos. No entanto, o efeito da melatonina na migração e invasão de glioma permanece para ser explorado e elucidado.

Um grande obstáculo no manejo clínico do GBM é a BHE, composta pelas junções estreitas especializadas que alinham a vasculatura do sistema nervoso central. A BHE restringe a entrada de muitos constituintes de plasma sanguíneo, incluindo uma série de terapias circulantes. Os próprios tumores cerebrais podem prejudicar a integridade do BBB, através de mecanismos como a secreção de fatores solúveis que degradam ativamente estas junções (Schneider et al., 2004), bem como a formação de vasos sanguíneos anormais com expressão defeituosa de proteínas de junção. No entanto, estudos anteriores mostraram que as áreas periféricas de tumores cerebrais menos avançados muitas vezes contêm sub-regiões com BBB (ou barreira de tumor de sangue, BTB) intacta e especialmente robusta, levando a

resistência ao tratamento de células cancerígenas (Black e Ningaraj, 2004; Cao et al., 2005).

As partículas de escala nanométrica representam uma classe de agentes que podem vir a extravasar melhor para o tecido tumoral cerebral com uma BHE mais permeável. Em particular, as GNP receberam recentemente muita atenção como uma ferramenta potencial no tratamento e diagnóstico do câncer devido à sua baixa toxicidade e propriedade anti-inflamatória (Joh et al., 2013; Paula et al., 2015). Tendo em vista todas essas características tanto da melatonina quanto da GNP, nós buscamos com este estudo avaliar a interação destas substâncias unindo suas particularidades frente aos sintomas do GBM.

Como no estudo 01, novamente avaliamos os parâmetros comportamentais dos animais induzidos ao GBM, no entanto dessa vez comparando os com os animais suplementados com MEL e/ou GNP. No que se referente ao teste de campo aberto (Tabela 4), o qual foi utilizado para analisar parâmetros locomotores, nossos resultados foram inconclusivos, não havendo resultado semelhante na literatura, para possível discussão a respeito.

Ainda analisando parâmetros comportamentais foi realizado o teste de Rota Rod, o qual foi utilizado para avaliar a força e equilíbrio dos animais, visto que isso pode ser afetado pelo sintoma de hemiparesia, característico de GBM (Mukand et al., 2001 e Preusser et al., 2011). Como resultado mais significativo foi visto que os animais do grupo GBM apresentaram maiores números de queda em relação aos animais do grupo sham, sugerindo assim que os animais induzidos ao GBM estariam com maior fraqueza provocando o desequilíbrio dos mesmos na barra rotatória do aparelho. Em contrapartida os animais GBM que receberam a associação de GNP e MEL tiveram um menor número de quedas quando comparados aos animais GBM sem suplementação. Isso pode estar ligado a uma redução na velocidade da progressão do tumor, pois danos locomotores são ligados ao aumento rápido do tumor o que leva ao aumento de pressão intracraniana e a um déficit motor no paciente (Torres et al., 1997). Porém o mecanismo com que fez que esse resultado fosse obtivo ainda precisa ser melhor elucidado.

Adicionalmente buscamos analisar parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, o qual tem papel importante em tumores em geral devido ao estabelecimento de inflamação crônica no tecido cerebral o qual induz o estresse oxidativo em astrocitos e micróglia (Salazar-Ramiro et al., 2016).

Em nosso estudo foi possível observar um aumento significativo na produção de oxidantes em animais induzidos ao GBM em comparação ao grupo sham, mensurada através dos níveis de oxidação do DCFH. Entretanto no grupo GBM com suplementação de MEL e GNP, foi visto uma diminuição nos níveis de oxidação quando comparado ao grupo GBM sem suplementação. Este resultado pode estar ligado as propriedades antioxidantes da MEL (Wang et al., 2012), a qual ligada com a GNP foi capaz de chegar ao tecido cerebral através da característica importante da GNP de atravessar a BHE (Sintov et al., 2016), visto que o grupo GBM suplementado apenas com MEL não obteve resultado significativo.

No que diz respeito ao sistema de defesa antioxidante, o seu objetivo primordial é o de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação. Neste contexto, a glutathiona reduzida (GSH) é considerada um dos eliminadores mais importantes de espécies reativas de oxigênio (ROS), e sua relação com glutathiona oxidada (GSSG) pode ser usada como marcador de estresse oxidativo (Zitka et al., 2012). Nossos resultados revelam que a razão GSH/GSSG é significativamente aumentada após as suplementações de GNP e da sua combinação com MEL em relação ao grupo GBM. O SNC tem alta atividade metabólica e teor de ácidos graxos, por que é particularmente sensível ao dano oxidante por ERO. Dentro do SNC, astrócitos e neurônios possuem sistemas antioxidantes, como o sistema GSSG-GSH que protege essas células de danos oxidantes (Salazar-Ramiro et al., 2018), com isso essa resposta sugere um efeito importante da suplementação sobre equilíbrio redox em tecido cerebral, tanto da GNP suplementada sozinha, quanto da sua associação com Melatonina.

Em conjunto a esse resultado, analisamos o dano oxidativo através da carbonilação de proteínas. No grupo induzido ao GBM houve um aumento significativo de dano quando comparado ao grupo sham. Hardiany et al. (2012), mostraram em seu estudo resultado semelhante, com aumento da carbonilação em células de pacientes com gliomas, mostrando que as proteínas são os principais alvos para oxidantes reativos nas células. Entretanto, foi observado uma redução significativa em grupos GBM suplementados em relação ao grupo GBM, o que reforça o possível papel antioxidante da melatonina, da GNP e da associação de ambas.

6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos dados mostram que o modelo animal utilizando células GL261 é capaz de mimetizar a doença, pois o mesmo apresentou características importantes, como dano em DNA, déficits neurológicos, locomotores e alterações histopatológicas particulares do glioblastoma. Junto a isso, nosso estudo também sugere que não somente a associação de Melatonina à GNP, mas também a suplementação destes isoladamente, podem vir a ser uma nova terapia em potencial para pacientes com GBM. No entanto mais estudos ainda são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual isso ocorre.

REFERÊNCIAS

American Brain Tumor Association. BRAIN TUMOR INFORMATION: Types of tumor – Glioma. Disponível em <<http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/glioma.html>> Acesso em 07 nov. 2016.

Anisimov VN, Alimova IN, Baturin DA, Popovich IG, Zabezhinski MA, Rosenfeld SV, et al. Dose-dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. *Exp Gerontol.* 2003; 38(4):449-61.

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav.* 1973; 21: 205-235.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999 Mar 1;93(5):1464-76.

Backos DS, Poerschke RL, Franklin CC, Reigan P. (2014) The Role of Glutathione and the Glutathione-Linked Enzyme Systems in Brain Tumor Drug Resistance. In: *Tumors of the Central Nervous System*, v: 12, pp. 277-290. Springer.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001; 357 (9255), 539–545.

Becher OJ, Hambardzumyan D, Fomchenko EI, Momota H, Mainwaring L, Bleau AM, et al. Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas. *Cancer Res.* 2008 Apr 1;68(7):2241-9.

Belotte J, Fletcher NM, Awonuga AO, Alexis M, Abu-Soud HM, Saed MG, et al. The role of oxidative stress in the development of cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Reprod Sci.* 2014 Apr;21(4):503-8.

Benchekroun MN, Catroux P, Montaudon D, Robert J. Development of mechanisms of protection against oxidative stress in doxorubicin-resistant rat tumoral cells in culture. *Free Radic Res.* 1990; 11, 137-144.

Black KL, Ningaraj NS. Modulation of brain tumor capillaries for enhanced drug delivery selectively to brain tumor. *Cancer Control*. 2004 May-Jun;11(3):165-73.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.

Brasil, Ministério da Saúde 2012. “Sistema de informações sobre mortalidade - SIM/MS”. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obtbr>.

Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jul;10(7):519-29.

Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med*. 1997 Jan 16;336(3):186-95.

Cao Y, Tsien CI, Shen Z, Tatro DS, Ten Haken R, Kessler ML, et al. Use of magnetic resonance imaging to assess blood-brain/blood-glioma barrier opening during conformal radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2005 Jun 20;23(18):4127-36.

Caruso G, Caffo M. Antisense oligonucleotides in the treatment of cerebral gliomas. Review of concerning patents. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2014 Apr;9(1):2-12.

Cha S, Johnson G, Wadghiri, YZ, Jin O, Babb J, Zagzag D, Turnbull DH. Dynamic, contrast-enhanced perfusion MRI in mouse gliomas: correlation with histopathology. *Magn Reson Med Sci*. 2003; 49: 848-855.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel, JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994; 53: 55-63.

Chen X, Hao A, Li X, Du Z, Li H, Wang H, Yang H, Fang Z. Melatonin inhibits tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells via the AKT–EZH2–STAT3 signaling axis. *J Pineal Res*. 2016; 61: 208-217.

Clark AJ, Fakurneiad S, Ma Q, Hashizume R. Bioluminescence imaging of an immunocompetent animal model for glioblastoma. *J Vis Exp.* 2016 Jan 15;(107): e53287.

Cohen, AL, Holmen, SL, Colman, H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013; 13(5): 1-13.

Corrales A, Vidal R, García S, Vidal V, Martínez P, García E, et al. Chronic melatonina treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *J Pineal Res.* 2014 Jan;56(1):51-61.

Czlonkowska A, Kurkowska-Jastrzebska I. Inflammation and gliosis in neurological diseases—clinical implications. *J. Neuroimmunol.* 2011. 231 (1–2), 78–85.

DeAngelis, L.M. Brain tumors. *N Engl J Med.* 2001; 344(2): 114-123.

DeAngelis LM, Wen PY. Tumores Primários e Metastáticos do Sistema Nervoso. “In”: Jameson JL, Kasper DL, Loscalzo J, Fauci AS, Longo DL. *Medicina Interna de Harrison.* McGraw Hill: 2012, 3383-3387.

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.

Dokic I, Hartmann C, Herold-Mende C, Régnier-Vigouroux A. Glutathione peroxidase 1 activity dictates the sensitivity of glioblastoma cells to oxidative stress. *Glia.* 2012; 60: 1785-1800.

Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT. Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg.* 1976 Apr;44(4):442-8.

Feng X, Szulzewsky F, Yerevanian A, Chen Z, Heinzmann D, Rasmussen RD, et al. Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget*. 2015 Jun 20;6(17):15077-94.

Field KM, Drummond KJ, Yilmaz M, Tacey M, Compston D, Gibbs P, Rosenthal MA. Clinical trial participation and outcome for patients with glioblastoma: multivariate analysis from a comprehensive dataset. *J. Clin. Neurosci*. 2013; 20:783-789.

Geyer JR, Finlay JL, Boyett JM, Wisoff J, Yates A, Mao L, Packer RJ. Survival of infants with malignant astrocytomas. A report from the childrens cancer group. *Cancer*. 1995 Feb 15;75(4):1045-50.

Glick RP, Lichtor T, DeZoeten E, Deshmukh P, Cohen EP. Prolongation of survival of mice with glioma treated with semiallogeneic fibroblasts secreting interleukin-2. *J Neurosurg*. 1999; 45(4): 867-874.

Godoy MC, Figuera MR, Souza FR, Flores AE, Rubin MA, Oliveira MR, et al. Alpha2-adrenoceptors and 5-H T receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. *Eur. J. Pharmacol*. 2004; 496: 93-97.

Gontijo A, Tice R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da Ulbra, p. 247-271, 2003.

Hardiany NS, Mulyawan W, Wanandi SI. Correlation between oxidative stress and tumor grade in glioma cells from patients in Jakarta. *Med J Indones*. 2012 Aug; 21(3): 122-27.

Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, Van Steeg H, Vijg J. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science*. 2003 Feb 28;299(5611):1355-9.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976 Jul;74(1):214-26.

Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-Oncol.* 2006; 8 (3): 261–279.

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 (Brasil). *A Situação do Câncer no Brasil.* Rio de Janeiro, 2006. 119 p.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). *Incidência de Câncer no Brasil.* Rio de Janeiro, 2016.

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.

Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Oct;19(10):2421-7.

Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006; 441(7092): 431-436.

Kaur C, Ling EA. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem.* 2008;15(29):3068-80.

Kjaergaard J, Tanaka J, Kim JA, Rothchild K, Weinberg A, Shu S. Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. *Cancer Res.* 2000; 60: 5514-5521.

Kleihues P, Cavenee WK. *Pathology and Genetics – Tumours of the Nervous System.* IARC Press, Lyon, 2000.

Kose O, Arabaci T, Kara A, Yemenoglu H, Kermen E, Kizildag A, Gedikli S, Ozkanlar S. Effects of melatonin on oxidative stress index and alveolar bone loss in diabetic rats with periodontitis. *JPeriodontol*. 2016; 87(5): 82-90.

Ladomersky E, Zhai L, Gritsina G, Genet M, Lauing KL, Wu M, et al. Advanced age negatively impacts survival in an experimental brain tumor model. *Neurosci Lett*. 2016 Sep 6;630:203-8.

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.

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

Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10):749-58.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW, 2001. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp.Med*. 193 (6), 727–740.

Lisi L, Stigliano E, Lauriola L, Navarra P, Dello Russo C. Pro inflammatory-activated glioma cells induce a switch in microglial polarization and activation status, from a predominant M2b phenotype to a mixture of M1 and M2a/B polarized cells. *ASN Neuro*. 2014; 6 (3): 171–183.

Lorico A, Mercepide J, Soloduschko V, Alexeyev M, Fodstad O, Rappa G. Primary neural stem/progenitor cells expressing endostatin or cytochrome P450 for gene therapy of glioblastoma. *Cancer Gene Ther*. 2008 Sep;15(9):605-15.

Lumniczky K, Desaknai S, Mangel L, Szende B, Hamada H, Hidvegi EJ, Safrany G. Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing

autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther.* 2002; 9: 44-52.

Maganhin CC, Carbonel AAF, Hatty JH, Fuchs LFP, Oliveira Jr IS, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC, Soares Jr JM. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. *Rev Assoc Med Bras.* 2008; 54: 267-271.

Maher EA, Fumari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 2001 Jun 1;15(11):1311-33.

Manda G, Isvoranu G, Comanescu MV, Manea A, Debeleac Butuner B, Korkmaz KS. The redox biology network in cancer pathophysiology and therapeutics. *Redox Biol.* 2015 Aug;5:347-57.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol.* 1992; 13 (7): 265–270.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; 454: 436-444.

Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Antolín I, Rodríguez C, Reiter RJ. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine.* 2005 Jul;27(2):169-78.

McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, Mastrogiannis GM, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.

Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr Med Chem.* 2010;17(36):4462-81.

Michelson N, Rincon-Torroella J, Quiñones-Hinojosa A, Greenfield JP. Exploring the role of inflammation in the malignant transformation of low-grade gliomas. *J Neuroimmunol.* 2016; 297: 132-140.

Miyatake S, Martuza RL, Rabkin SD. Defective herpes simplex virus vectors expressing thymidine kinase for the treatment of malignant glioma. *Cancer Gene Ther.* 1997; 4: 222-228.

Mukand JA, Blackinton DD, Crincoli MG, Lee JJ, Santos BB. Incidence of neurologic deficits and rehabilitation of patients with brain tumors. *Am J Phys Med Rehabil.* 2001 May;80(5):346-50.

Nesi RT, de Souza PS, Dos Santos GP, Thirupathi A, Menegali BT, Silveira PC, et al. Physical exercise is effective in preventing cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response in mice. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016 Mar 22;11:603-10.

Newcomb EW, Tamasdan C, Entzminger Y, Arena E, Schnee T, Kim M, et al. Flavopiridol inhibits the growth of GL261 gliomas in vivo: implications for malignant glioma therapy. *Cell Cycle.* 2004; 3: 230-234.

Newcomb EW, Zagzag D. The Murine GL261 Glioma Experimental Model. In: Van M, Erwin G. *CNS Cancer: Models, markers, prognostic, factors, targets, and therapeutic approaches.* Atlanta: Humana Press, 2009; 12: 227-241.

Oh T, Fakurnejad S, Sayegh ET, Clark AJ, Ivan ME, Sun MZ, et al. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J Transl Med.* 2014 Apr 29;12:107.

Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA.* 2013 Nov 6;310(17):1842-50.

ONU BR - Nações Unidas do Brasil (Org.). Mundo terá 2 bilhões de idosos em 2050: OMS diz que 'envelhecer bem deve ser prioridade global. 2016. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/mundo-tera-2-bilhoes-de-idosos-em-2050-oms-diz-que-envelhecer-bem-deve-ser-prioridade-global/>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

Paula MM, Petronilho F, Vuolo F, Ferreira GK, De Costa, L, Santos GP, Effting 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.

Peterson DL, Sheridan PJ, Brown, We JR. Animal models for brain tumors: historical perspectives and future directions. *Journal of Neurosurgery.* 1994; 80(5): 865-876.

Phuphanich S, Edwards MS, Levin VA, Vestnys PS, Wara WM, Davis RL, et al. Supratentorial malignant gliomas of childhood. Results of treatment with radiation therapy and chemotherapy. *J Neurosurg.* 1984 Mar;60(3):495-9.

Pinto W, Ko GM. Teste de rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidas e das ataxias cerebelares. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, São Paulo, v. 1, n. 2, p.201-212, 2012.*

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* 1992 Oct 29;359(6398):845-8.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4 (1): 71–78.

Porter KR, McCarthy BJ, Freels S, Kim Y, Davis FG. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. *Neuro Oncol.* 2010 Jun;12(6):520-7.

Preusser M, de Ribaupierre S, Wöhrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, et al. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol*. 2011 Jul;70(1):9-21.

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.

Rosales-Corral SA, Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Boga JA, Manchester LC, Fuentes-Broto L, et al. Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J Pineal Res*. 2012 Mar;52(2):167-202.

Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*. 1998 Sep 15;12(18):2831-41.

Salazar-Ramiro A, Ramírez-Ortega D, Pérez de la Cruz V, Hernández-Pedro NY, González-Esquivel DF, Sotelo J, et al. Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. *Front Immunol*. 2016 Apr 26;7:156.

Sayour EJ, Mclendon P, Mclendon R, De Leon G, Reynolds R, Kresak J, et al. Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2015; 64(4): 419–427.

Schneider SW, Ludwig T, Tatenhorst L, Braune S, Oberleithner H, Senner V, et al. Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol*. 2004 Mar;107(3):272-6.

Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, Skalej M, Firsching R. Gliomas in adults. *DtschArztebl Int*.2010; 107(45): 799-808.

Schould Jr SC, Bigner DD. A review of animal brain tumor models that have been used for therapeutic studies. In: Walker, MD. *Oncology of the nervous system*. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1983; 2: 31-63.

Seligman AM, Shear MJ. Studies in carcinogenesis. VIII. Experimental production of brain tumors in mice with methylcholanthrene. *American Journal of Cancer Research*. 1939; 37: 364-395.

Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods*. 2010 Jun 15;189(2):180-5.

Sia Y, Field K, Rosenthal M, Drummond K. Socio-demographic factors and their impact on the number of resections for patients with recurrent glioblastoma. *J ClinNeurosci*. 2013; 20(10): 1362-1365.

Silva MA, Klafke JZ, Rossato MF, GewehrC, Guerra GP, Rubin MA, Ferreira J. Role of peripheralpolyamines in the development of inflammatorypain. *Biochem Pharmacol*. 2011; 82: 269-277.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175(1): 184-91.

Somasuntharam I, Yehl K., Carroll SL, Maxwell JT, Martinez MD, Che PL, et al. Knockdown of TNF- α by DNAzyme gold nanoparticles as an anti-inflammatory therapy for myocardial infarction. *Biomaterials*. 2016; 83: 12-22.

Srivastava R, Sengupta A, Mukherjee S, Chatterjee S, Sudarshan M, Chakraborty A, et al. In vivo effect of Arsenic Trioxide on Keap1-p62-Nrf2 signaling pathway in mouse liver: Expression of antioxidant responsive element-driven genes related to glutathione metabolism. *ISRN Hepatol*. 2013 Jul 10;2013:817693.

Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 2005 May 1;10:1881-96.

Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc.* 2006;1(4):1810-9.

Stylli SS, Luwor RB, Ware TM, Tan F, Kaye AH. Mouse models of glioma. *J Clin Neurosci.* 2015 Apr;22(4):619-26.

Sowers JL, Johnson KM, Conrad C, Patterson JT, Sowers LC. The role of inflammation in brain cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 816, 75–105.

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.

Szatmári T, Lumniczky K, Désaknai S, Traicevski S, Hídvégi EJ, Hamada H, et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci.* 2006 Jun;97(6):546-53.

Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1991 Feb 1;51(3):794-8.

Tews DS. Cell death and oxidative stress in gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* v. 25, p. 272-284, 1999.

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

Torres LFB, Jacob GVV, Reis Filho JS, Noronha L. Tumores pediátricos primários do sistema nervoso central: estudo anatomopatológico de 623 casos. *Arquivos de Neuro-psiquiatria.* 1997; 55, (4): 795-800.

Trindade V, Picarelli H, Gliomas: Marcadores tumorais e prognóstico. *Arq Bras Neurocirur.* 2012; 2, (31): 91-94.

Tran B, Rosenthal MA. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *J Clin Neurosci.* 2010 Apr;17(4):417-21.

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.

Uehara C, Jamnik S, Santoro I. Câncer de pulmão. *Medicina (Ribeirão Preto).* 1998;31:266-76.

Vannini E, Maltese F, Olimpico F, Fabbri A, Costa M, Caleo M, et al. Progression of motor deficits in glioma-bearing mice: impact of CNF1 therapy at symptomatic stages. *Oncotarget.* 2017 Apr 4;8(14):23539-23550.

Vlahovic G, Fecci PE, Reardon D, Sampson JH. Programmed death ligand 1 (PDL1) as an immunotherapy target in patients with glioblastoma. *Neuro-Oncology.* 2015; 17 (8): 1043–1045.

Wang J, Hao H, Yao L, Zhang X, Zhao S, Ling EA, et al. Melatonin suppresses migration and invasion via inhibition of oxidative stress pathway in glioma cells. *J Pineal Res.* 2012 Sep;53(2):180-7.

Wei J, Gabrusiewicz K, Heimberger A. The controversial role of microglia in malignant gliomas. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 285246.

Wiranowska M, Tresser N, Saporta S. The effect of interferon and anti-CD44 antibody on mouse glioma invasiveness in vitro. *Anticancer Research.* 1998; 18; 3331-3338.

Yuan S, Lu Y, Yang J, Chen G, Kim S, Feng L, et al. Metabolic activation of mitochondria in glioma stem cells promotes cancer development through a reactive oxygen species-mediated mechanism. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6: 1-15.

Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, Yee H, Holash J, Wiegand SJ, et al. Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest* 2000, 80:837–849.

Zagzag D, Miller DC, Chiriboga L, Yee H, Newcomb EW. Green fluorescent protein immunohistochemistry as a novel experimental tool for the detection of glioma cell invasion in vivo. *Brain Pathol.* 2003; 13: 34-37.

Zhang Y, Liu Q, Wang F, Ling EA, Liu S, Wang L, et al. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 α . *J Pineal Res.* 2013; 55(2): 121-130.

Zhu Z, Du S, Du Y, Ren J, Ying G, Yan Z. Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis. *J Neurochem.* 2017 Nov 3.

Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, et al. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett.* 2012 Dec;4(6):1247-1253.

ANEXOS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeitos da suplementação de melatonina associada à nanopartículas de ouro sobre o desenvolvimento tumoral em animais expostos a um modelo experimental de glioblastoma.**", registrada com o protocolo nº **024/2016-2**, sob a responsabilidade de **Ricardo Aurino de Pinho**, junto à equipe: Vanessa Moraes de Andrade, Gabriela Trevisan, Renata Tiscoski Nesi, Giulia dos Santos Pedroso Fidelis, Hemelin Resende Farias, Fernanda Pereira Tavares - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **06/09/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/09/2016 a 09/07/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico C57/BL/6
Nº de animais	165
Idade/Peso	2 meses / 20±30mg
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Effects of melatonin supplementation-gold nanoparticles associated in the tumour development in experimental model of glioblastoma.**"

Protocol number: **024/2016-2**

Principal Investigator: **Ricardo Aurino de Pinho**

Researchers: **Vanessa Moraes de Andrade, Gabriela Trevisan, Renata Tiscoski Nesi, Giulia dos Santos Pedroso Fidelis, Hemelin Resende Farias, Fernanda Pereira Tavares.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 06 de setembro de 2016.


 Jairo José Zocche
 Coordenador da CEUA