

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA & DESENVOLVIMENTO
MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Vanessa Dias Gialluca

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EM CÉLULAS DE
GBM IRRADIADAS EM APARELHOS DE TOMOGRAFIA E RADIOTERAPIA**

São José dos Campos – SP
2020

Vanessa Dias Gialluca

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EM CÉLULAS DE
GBM IRRADIADAS EM APARELHOS DE TOMOGRAFIA E RADIOTERAPIA**

Dissertação de mestrado a ser defendida no programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maiara Lima Castilho

São José dos Campos – SP
2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Gialluca, Vanessa Dias

Avaliação in vitro de nanopartículas de ouro em células de GBM irradiadas em aparelhos de tomografia e radioterapia / Vanessa Dias Gialluca; orientador, Leandro José Raniero; co-orientadora Maiara Lima Castilho. - São José dos Campos, SP, 2020.

1 CD-ROM, 65 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências


1. Engenharia Biomédica. 2. Glioblastoma. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Temozolomida. 5. Radioterapia etomografia. I. Raniero, Leandro José, orient. II. Castilho, Maiara Lima, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Vanessa Dias Gialluca, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 4 de Setembro de 2020.

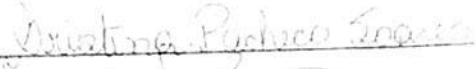
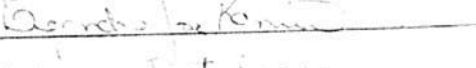
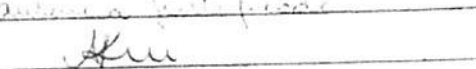



Autor(a) da Obra

VANESSA DIAS GIALLUCA

“AVALIAÇÃO *In Vitro* DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EM CÉLULAS DE GBM
IRRADIADAS EM APARELHOS DE TOMOGRAFIA E RADIOTERAPIA.”

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª CRISTINA PACHECO SOARES 
PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO 
PROF.^ª DR.^ª MAIARA LIMA CASTILHO 
PROF.^ª DR.^ª ANDREA SANTOS LIU - IFSP 

Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 23 de julho de 2020.

*Ao meu marido Bruno Gialluca e aos meus filhos que
sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando
estive ausente, me incentivando para me tornar uma
pessoa e profissional melhor para poder contribuir
cada vez mais com a sociedade.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva da vida e por todas as coisas boas e pessoas boas que colocou no meu caminho.

Aos meus pais que me orientaram e me auxiliaram com minhas escolhas pessoais e profissionais resultando a pessoa e profissional que sou hoje.

Ao meu marido Bruno Gialluca pela parceria durante todos esses anos e por assumir grande parte da responsabilidade pela educação dos nossos filhos e cuidados com nossa família, nos meus momentos de ausência.

Ao meu orientador Professor Dr. Leandro Raniero pela orientação, dedicação, interesse e principalmente pela oportunidade de aprendizagem. A minha co-orientadora Maiara Lima Castilho pelas discussões sempre produtivas e apoio nos experimentos.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Nanossensores que me auxiliaram com os novos conhecimentos e experimentos, em especial, ao aluno Vitor G. Poli de Lima, parceiro durante toda esta jornada.

As clínicas Tomovale e Radioimage onde realizei parte dos experimentos.

Enfim, a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e influenciaram minha trajetória, fazendo com que cada obstáculo ou frustração fosse superado com entusiasmo possibilitando a conclusão de mais essa etapa!

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso
sem perder entusiasmo”.

Winston Churchill

RESUMO

As neoplasias malignas representam um grupo de mais de 100 doenças diferentes que apresentam como característica, a diferenciação genética do tecido de origem, levando ao crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos normais. Embora tenham ocorrido avanços significativos dessas modalidades tradicionais terapêuticas, as neoplasias malignas representam ainda um grande desafio, considerando, especialmente os subtipos de maior agressividade e letalidade. Entre os tumores mais agressivos encontramos o Glioblastoma Multiforme, com mortalidade de cerca de 95% e sobrevida mediana de 15 meses. A Temozolomida é o quimioterápico até o momento testado e aprovado com melhor resposta neste subtipo tumoral. O objetivo desta dissertação foi avaliar a potencialização desta modalidade terapêutica associada as nanopartículas de ouro quando irradiadas com radioterapia e tomografia. Para tanto a Temozolomida foi caracterizada quimicamente, realizada a síntese de nanopartículas de ouro e, posteriormente foi testada a citotoxicidade isolada do quimioterápico e dos conjuntos da Temozolomida com as nanopartículas de ouro em diferentes concentrações e, por fim foi avaliado a potencialização dos efeitos citotóxicos em placas irradiadas em aparelho de tomografia e radioterapia. Os resultados demonstram que houve um efeito citotóxico quando as nanopartículas de ouro foram utilizadas isoladamente e em conjunto com a Temozolomida e irradiadas com aparelho de tomografia e as nanopartículas de ouro potencializaram significativamente o efeito citotóxico da radioterapia quando associado a Temozolomida. Conclui-se, portanto que as nanopartículas de ouro potencializam o efeito da Temozolomida no tratamento de células de GBM, tanto quando irradiado com tomografia, quanto com radioterapia, com grande potencial para uso terapêutico em associação com as terapias tradicionais.

Palavras-chave: Glioblastoma. Nanopartículas de ouro. Temozolomida. Radioterapia e tomografia.

IN VITRO EVALUATION OF GOLD NANOPARTICLES IN GBM CELLS IRRADIATED IN TOMOGRAPHY AND RADIOTHERAPY DEVICES

ABSTRACT

Malignant neoplasms represent a group of more than 100 different diseases that feature, as a characteristic, the genetic differentiation of the original tissue, leading to the disordered growth of cells, which invade normal tissues and organs. Although there have been significant advances in these traditional therapeutic modalities, malignant neoplasms still represent a major challenge, considering, especially the subtypes of greater aggressiveness and lethality. Among the most aggressive tumors we find Glioblastoma Multiforme, with a mortality rate of about 95% and median survival of 15 months. Temozolomide is the chemotherapeutic drug so far tested and approved with the highest response in this tumor subtype. The objective of this work was to evaluate the potentialization of this therapeutic modality with gold nanoparticles when irradiated with radiotherapy and tomography. For this purpose, Temozolomide was chemically characterized, synthesis of gold nanoparticles was performed and, later, the isolated cytotoxicity of the chemotherapeutic agent and the Temozolomide sets was tested with gold nanoparticles in different concentrations and, finally, the potentialization of cytotoxic effects in different concentrations was evaluated. plates irradiated in tomography and radiotherapy equipment. The results demonstrate that there was a cytotoxic effect when gold nanoparticles were used alone and in conjunction with Temozolomide and irradiated with a tomography device and gold nanoparticles significantly potentiated the cytotoxic effect of radiotherapy when associated with Temozolomide. It is concluded, therefore, that gold nanoparticles potentiate the effect of Temozolomide in the treatment of GBM cells, both when irradiated with tomography and with radiotherapy, with great potential for therapeutic use in association with traditional therapies.

Keywords: Glioblastoma. Gold nanoparticles. Temozolomide. Radiotherapy and tomography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do planejamento radioterápico	23
Figura 2: Estrutura molecular da Temozolomida	25
Figura 3: Conversão do TMZ em MTIC e AIC.	27
Figura 4: Representação do mecanismo de citotoxicidade da Temozolomida.....	28
Figura 5: Propriedades das nanopartículas que influenciam no seu comportamento	31
Figura 6: Esquema representativo da potencialização da Ação da radioterapia por nanopartículas metálicas.	34
Figura 7: Esquema de diluição do fármaco Temozolomida.....	36
Figura 8: Cultura de células de GBM da linhagem M-059J	39
Figura 9: Irradiação em aparelho de Radioterapia	40
Figura 10: Espectro UV-Visível da TMZ na faixa de concentração de 5mg a 2µg. ..	43
Figura 11: Absorbância na banda máxima de 330 nm em função da concentração.	44
Figura 12: Degradação do TMZ após 24 e 48h: a) Espectros UV-Visível e, b) determinação da taxa de degradação.	46
Figura 13: Análise de estabilidade da TMZ diluído em PBS.....	47
Figura 14: Análise de estabilidade da TMZ diluído em água Tipo 1 <i>versus</i> meio ácido.	48
Figura 15: Espectros de FT-IR do TMZ e do TMZ degradado em água.....	49
Figura 16: Espectro UV visível da solução de AuNPs.	51
Figura 17: Gráfico da distribuição do tamanho das partículas dispersas, como sintetizadas.	52
Figura 18: Análise da viabilidade celular com TMZ associado às Nano partículas de ouro na ausência de radiação.	53
Figura 19: Análise da viabilidade celular com TMZ associado a nano partículas de ouro na presença de radiação ionizante via radioterapia	54
Figura 20: Análise da viabilidade celular com TMZ associado a nano partículas de ouro na presença de radiação ionizante via tomografia.	54
Figura 21: Imagem da placa de células irradiadas com diferentes concentrações de TMZ e nanopartículas. Corte axial (esquerda)e sagital (direita) em tomografia.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2019.	15
Tabela 2: Propriedades físico-químicas do Temozolomida.....	26
Tabela 3: Parâmetros da Irradiação com Tomografia	39
Tabela 4: Parâmetros da Irradiação com Radioterapia.....	41
Tabela 5: Valores de absorvância por concentração.	44
Tabela 6: Bandas características do TMZ íntegro e degradado em água:	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC	5-amino-imidazol-4-carbozamida
AuNPs	Nanopartículas de ouro
ATRX	Gene da síndrome da talassemia alfa/retardo mental ligado ao X
CTV	Volume da massa tumoral acrescido de margem subclínica
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DTDTPA	Ácido dietilenotriaminapentacéticoditiolago
DTIC	Dacarbazina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EORTC	Organização europeia de pesquisa e tratamento de câncer
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Agência reguladora norte americana, "FoodandDrugAdministration"
FISPQ	Ficha de informação e segurança para produtos químicos
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GBM	Glioblastoma Multiforme
GTV	Volume da massa tumoral
H3K27M	Histona presente em tumores cerebrais difusos de pior prognóstico
HER	Família de receptores de proteínas tirosina-quinases transmembranosas que ligam o fator de crescimento epidérmico
HGFR/c-MET	Proto-oncogene que codifica o receptor de crescimento de hepatócitos
IDH	Isocitrato desidrogenase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MET	Fator de transição epitélio mesenquimal-epitelial

MGMT	Enzima O6-metilguanina DNA metiltransferase
MTIC	Monometiltriazenoimidazolcarboxamida,
m-TOR	Proteína de regulação celular – mecanismo alvo da rapamicina
NCCN	Rede norte americana de instituições que estudam e combatem ao câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSCHA	Administração de Segurança e Saúde Ocupacional
p16INK4	Proteína supressora de tumor
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDGFRA	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG	Polietilenoglicol
PS	Performance Status
PTEN	Gene supressor de tumor de Sistema Nervoso Central
PTV	Volume de planejamento radioterápico
RPSL	Ressonância Plasmômica de Superfície Localizada
SNC	Sistema Nervoso Central
TP53	Proteína humana que regula o ciclo celular, com ação de supressão tumoral.
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TMZ	Temozolomida
UV-vis	Espectroscopia no Ultravioletavisível
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Neoplasias Malignas de Sistema Nervoso Central	19
3.2 Temozolomida	24
3.3 Nanotecnologia	29
3.4 Nanopartículas metálicas	30
3.4.1 Nanopartículas de Ouro	31
3.5 Glioblastoma Multiforme e a Nanotecnologia	32
3.6 Irradiação e Nanopartículas Metálicas	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Da preparação para análise e caracterização da Temozolomida	36
4.2 Da síntese das nanopartículas de ouro	37
4.3 Da cultura das células de Glioblastoma	38
4.4 Do tratamento utilizando TMZ e nanopartículas	39
4.5 Da irradiação por Tomografia	39
4.6 Da irradiação por Radioterapia	40
4.7 Do teste de viabilidade celular	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Caracterizações da Temozolomida	42
5.2 Caracterizações da nanopartícula de ouro	50
5.3 Avaliações da Viabilidade Celular	52
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas representam um grupo de mais de 100 doenças diferentes que apresentam como característica a diferenciação genética do tecido de origem, levando ao crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos normais. O câncer ou neoplasia maligna é diferenciado pela localização da célula de origem, características genéticas e anátomo-patológicas, grau de diferenciação celular e potencial de invasão e disseminação celular. O tratamento habitual dessas doenças é classificado em localizado e sistêmico. O localizado ocorre por meio de cirurgia e radioterapia, enquanto o sistêmico inclui a quimioterapia e hormonioterapia (POUCHIE *et al.*, 2018).

Embora tenham ocorridos avanços significativos dessas modalidades tradicionais terapêuticas, as neoplasias malignas representam ainda um grande desafio, considerando, especialmente os subtipos de maior agressividade e letalidade, correspondendo em última análise na segunda maior causa de morte mundial, apenas superada pelas doenças cardiovasculares. (OSTROM *et al.*, 2018; PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015; TORRE *et al.*, 2015).

A alta mortalidade decorre, nestes subtipos tumorais, de suas características e, especialmente, das limitações dos tratamentos tradicionais que consistem em cirurgia, radioterapia e quimioterapia. As associações das terapias têm como intuito reduzir essas limitações, diminuir os efeitos colaterais e aumentar a efetividade de bons resultados, porém existe uma linha tênue entre a morte tumoral e a morte do hospedeiro ou portador do tumor, o que é dependente das escolhas de associações dos tratamentos (OMURO; DEANGELIS, 2013).

No Brasil, a incidência de casos de neoplasias malignas estimados para o ano de 2020, excetuando os tumores de pele não melanoma é de 448.440, destacam-se os subtipos relacionados a pulmão, mama, próstata e colorretal. Apesar de não estar entre os tumores mais incidentes, os tumores de Sistema Nervoso Central (SNC) destacam-se pela sua letalidade, sendo que os subtipos provenientes de células do pulmão e SNC correspondem a cerca de 80% dos casos de morte por neoplasia, isso independente de esforços relacionados a acessibilidade de tratamentos e/ou das tecnologias disponíveis na medicina tradicional (INCA, 2019; OHGAKI *et al.*, 2009). Os dados estatísticos indicam 5.870 novos casos de câncer do SNC em homens e 5.220

em mulheres, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 5,61 casos novos a cada 100 mil homens e de 4,85 casos novos a cada 100 mil mulheres (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2019.

Homens			Mulheres		
Localização primária	Casos	(%)	Localização primária	Casos	(%)
Próstata	65.840	29,2	Mama	66.280	29,7
Cólon e Reto	20.520	9,1	Cólon e Reto	20.470	9,2
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9	Colo uterino	16.590	7,4
Estômago	13.360	5,9	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6
Cavidade oral	11.180	5,0	Glândula tireoide	11.950	5,4
Esôfago	8.690	3,9	Estômago	7.870	3,5
Bexiga	7.590	3,4	Ovário	6.650	3,0
Linfoma não-hodgkin	6.580	2,9	Corpo do útero	6.540	2,9
Laringe	6.470	2,9	Linfoma não-hodgkin	5.450	2,4
Leucemia	5.920	2,6	SNC	5220	2,3

Fonte: Adaptada do INCA, 2019

O câncer do SNC em homens ocupa a sétima posição nas Regiões Norte (3,20/100 mil) e Centro-Oeste (6,05/100 mil). Na Região Sul, ocupa a oitava posição (8,63/100 mil); a nona posição na Região Nordeste (4,72/100 mil); e a décima segunda posição na Região Sudeste (5,59/100 mil). Para as mulheres, é o sétimo mais frequente na Região Sul (7,64/100 mil); oitavo na Região Norte (3,03/100 mil); corresponde à nona posição nas Regiões Centro-Oeste (4,95/100 mil) e Nordeste (4,21/100 mil), e ocupa a décima primeira posição na Região Sudeste (4,69/100 mil)(INCA, 2019). Para ambos os sexos foi desconsiderado os tumores de pele não melanoma.

Os tumores de SNC constituem um grupo bastante heterogêneo de neoplasias, com tratamentos tão diversos quanto seu grupo, como os portadores de Astrocitomas Pilocíticos que podem ser tratados apenas com cirurgia e serem curados. Enquanto os portadores de glioblastomas multiformes (GBM), na maioria dos casos, resultam em insucesso, sendo que os pacientes diagnosticados com este subtipo têm sobrevida média de 12 a 15 meses, mesmo combinando várias modalidades terapêuticas. Dentre os fatores de pior prognóstico está a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), membro família de receptores de proteínas tirosina-quinases transmembranas (HER) que ligam o fator de crescimento epidérmico (EGF), exibindo papel crucial na patogênese deste tumor. (GUO *et al*, 2017).

O tratamento tradicional para o GBM inclui cirurgia, com máxima ressecção possível, seguida de radioterapia adjuvante à quimioterapia. Dentre os medicamentos, a Temozolomida (TMZ) mostrou o melhor resultado para GBM, com perfil aceitável de segurança e moderada melhora da qualidade de vida em pacientes. Assim, diversos estudos estão em andamento na busca de novas terapias que possam melhorar os resultados dos tratamentos utilizados até o momento.

Dentre as novas técnicas empregadas no combate ao câncer, a Nanomedicina mostra-se promissora. A utilização de nanopartículas metálicas, tanto para diagnóstico, como para terapia e até na combinação simultânea de tratamento e diagnóstico (modalidade teranóstica), que é uma das possibilidades ascendente em novos estudos, que incluem desenvolvimento de marcadores tumorais para diagnóstico precoce, engenharia de sondas carreadoras de medicamentos e marcadores tumorais específicos, uso teranóstico com hipertermia e terapia fotodinâmica, e como potencializadoras do efeito da radioterapia.

Estas nanopartículas podem ser associadas a diversos quimioterápicos na busca de melhores resultados nos tratamentos oncológicos, podendo ser utilizadas na terapia alvo, diminuindo a toxicidade em tecidos normais, aumentando a meia vida do medicamento, protegendo o fármaco da degradação, depuração renal e no aumento da solubilidade, propiciando a possibilidade de redução de doses e, conseqüentemente, menores efeitos colaterais (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

Neste contexto, a ação da TMZ associada à nanopartículas de ouro (AuNPs) na presença e ausência de irradiação ionizante foi avaliada nesta dissertação, pois estas associações representam uma possibilidade promissora de potencialização do tratamento atual.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade celular *in vitro* de células de Glioblastoma Multiforme linhagem M059J na presença de Temozolomida e/ou Nanopartículas de ouro, sem e com irradiação.

2.2 Objetivos Específicos

a) Caracterizar o quimioterápico Temozolomida pelas Espectroscopias UV-visível e no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), demonstrando suas bandas de absorção para avaliar possibilidades terapêuticas posteriores.

b) Sintetizar nanopartículas de ouro e realizar a caracterização das mesmas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espectroscopia UV-visível.

c) Avaliar, *in vitro*, a eficiência do quimioterápico Temozolomida associado a AuNPs em células de GBM linhagem M059J, visando testar a hipótese do efeito sinérgico do tratamento combinado (TMZ + AuNPs) e comparar com a ação isolada do TMZ.

d) Avaliar o efeito, *in vitro*, das AuNPs associadas à Temozolomida em células cerebrais de GBM linhagem M059J, após irradiação com tomografia, visando testar a hipótese de efeito teranóstico.

e) Avaliar o efeito, *in vitro*, das AuNPs associadas à Temozolomida em células cerebrais de GBM linhagem M059J, após irradiação com radioterapia, visando testar a hipótese de potencialização do efeito da radioterapia.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A seguir será apresentado o estado da arte em formato de revisão dos principais temas abordados nesta dissertação, que geraram a estrutura conceitual, sobre a importância de desenvolver uma nova alternativa para o tratamento do GBM.

3.1 Neoplasias Malignas de Sistema Nervoso Central

Os Gliomas são graduados de I a IV pelo subtipo celular, diferenciação celular e organização tecidual. A classificação histopatológica feita pela OMS (Organização Mundial da Saúde), após 2016, passou a incluir marcadores genéticos, que tornaram a classificação mais fidedigna e auxiliar na decisão de tratamento dos neuro-oncologistas, baseado no prognóstico e resposta do subtipo de glioma. Essa classificação permite inferir alterações na resposta da Temozolomida e este conhecimento deverá ser necessário na busca de terapias alvo com este quimioterápico.

O tumor de grau I corresponde ao glioma não infiltrativo e sem mutação no gene responsável pela produção da enzima IDH (Isocitrato desidrogenase); os graus II e III incluem o Oligodendroglioma e Astrocitomas, sendo que esses tumores podem apresentar mutações que acarretem produção aberrante das enzimas IDH1 e/ou IDH2; os tumores grau IV apresentam mutação do gene relacionado a IDH, associado a metilação do promotor MGMT (O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase), respondem melhor a agentes alquilantes, como a TMZ, sendo o caso de grande parte dos GBM (YAN *et al*, 2009; AUTON *et al*, 2015).

Existe uma tendência de maior incidência em regiões mais desenvolvidas e em indivíduos caucasianos, comparando com africanos e asiáticos. As vias genéticas de desenvolvimento do GBM podem ser de origem primária, sendo esse desenvolvimento originário de um glioblastoma primário ou secundário, que ocorre a partir de um astrocitoma anaplásico, subtipos estes decorrentes de acúmulo de diferentes alterações genéticas. O GBM primário apresenta como característica a perda da heterozigidade do cromossomo 10q (70%), assim como outras alterações genéticas como amplificação do gene EGFR (36%), mutações do gene TP53 (28%),

deleção do p16INK4 (31%) e mutações do gene PTEN (25%). A perda da heterozigose 10q e mutação do gene TP53 são alterações genéticas encontradas na via de desenvolvimento do GBM secundário em 63 a 65% dos casos (OHGAKI *et al*, 2009).

Outras mutações como no gene da síndrome da talassemia alfa ligado/retardo mental ligado ao X (ATRX) podem ser encontradas em Gliomas II, III e glioblastomas. Em portadores de oligodendrogliomas encontramos mutações na Telomerase Transcriptase Reversa (TERT), estando relacionadas à mutação do IDH e amplificação do EGFR. Mutações na TERT, presentes em gliomas de alto grau, representam pior prognóstico com menor sobrevida. (ARITA *et al*, 2013). Mutações H3K27M são encontradas em gliomas difusos, tanto em adultos como em crianças e, quando na linha média, são classificados como grau IV. Mutações no IDH estão associadas à expressão da O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGTM), enzima reparadora de DNA e, quando presentes, representa maior resistência a drogas alquilantes como a TMZ. A metilação do promotor MGTM está associada ao melhor prognóstico e tumores com mutações H3K27M (histona presente em tumores difusos) apresentam menor índice de metilação do promotor MGTM e estão associados a pior prognóstico (STURM *et al.*, 2012).

Os glioblastomas de alto grau correspondem a cerca de 50% dos tumores de SNC e sua sobrevida em 5 anos varia de 1 a 19% (dependendo da idade do paciente). Frequentemente, esses tumores são infiltrativos e difusos, ultrapassando a linha média. Entre os sinais e sintomas deste grupo encontram-se o edema cerebral pelo efeito de massa, tonturas, dores de cabeça, endocrinopatias, fadiga, transtornos psiquiátricos e tromboembolismo venoso. A Ressonância Magnética na janela T2 é o melhor método diagnóstico atualmente, mas os limites tumorais podem ser de difícil distinção pelo edema peritumoral decorrente do efeito de massa e da alteração da função e permeabilidade da barreira hematoencefálica (NCCN, 2019; OSTROM *et al.*, 2017).

O tratamento tradicional do GBM é baseado em cirurgia e radioterapia. O objetivo cirúrgico se baseia na máxima ressecção possível, sendo que a decisão da extensão da ressecção se baseia em critérios como a idade e o estado geral do paciente ("Performance Status" – PS), além da proximidade com áreas nobres cerebrais, viabilidade de redução do efeito de massa com ressecção radical, ressecabilidade tumoral dependente do número de lesões e localização tumoral,

assim como o tempo desde a última cirurgia, em pacientes com recidiva tumoral. As possibilidades cirúrgicas são biópsia fechada, biópsia aberta, ressecção parcial e ressecção total. Para avaliação da ressecabilidade e das margens cirúrgicas recomenda-se a avaliação pós-operatória da peça por um experiente neuropatologista e ressonância magnética após 48 a 72 horas da ressecção. (SAWAYA *et al*, 1998).

As limitações, no caso da cirurgia, decorrem da dificuldade de ressecção tumoral com margens seguras pelas características tumorais infiltrativas, o que aumenta muito as chances de recidiva local e, devido sua localização em um órgão vital, o cérebro, nem sempre é possível realizar a ressecção tumoral sem acarretar a morte ou sequelas graves e irreversíveis no portador. No caso da radioterapia, as limitações decorrem da dificuldade de identificação tumoral, o que dificulta a definição de margem de tratamento e também aumenta muito as chances de recidiva local, já que não foi feita a esterilização do leito tumoral de maneira adequada, além da limitação de dose ideal para o próprio cérebro que, caso seja ultrapassada, pode acarretar morte ou sequelas graves e irreversíveis no portador. Com relação a quimioterapia, a natureza citogenética heterogenia do GBM dificulta a produção de uma terapia alvo e a presença da barreira hematoencefálica limita os possíveis agentes para o combate deste subtipo tumoral (OSTROM *et al*, 2017).

Para alcançar melhores resultados têm-se buscado a associação de terapias tradicionais com novas tecnologias, que permitam aumento de seletividade e especificidade celular, resultando em melhor controle tumoral, sendo denominada esta modalidade de tratamento como terapia alvo. No GBM receptores de crescimento como o EGFR, o PDGFRA (Fator de crescimento derivado de plaquetas) estão aumentados e diversos inibidores destes fatores estão em estudo (GUO *et al*, 2015). Ainda nessa linha encontramos estudos com novos produtos que buscam a inibição das vias de angiogênese, necessária para o crescimento tumoral, como o inibidor do VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular). Contudo até o momento, o único aprovado pela agência norte americana “Food and Drug Administration” (FDA) é o Bevacizumab que apesar da aprovação apresenta taxa de resposta de até 15%, com nenhum aumento de sobrevida (FORMICOLA *et al*, 2019; MENGANAN *et al*, 2020).

A quimioterapia baseada em agentes alquilantes têm se mostrado, até o momento, a melhor opção no tratamento de portadores de GBM, quando adjuvante a cirurgia e a radioterapia. O fármaco TMZ é um quimioterápico de uso oral, alquilante

que, após absorvido, é metabolizado espontaneamente por hidrólise em MTIC (Monometiltriazenoimidazolcarboxamida), AIC (5-amino-imidazol-4-carboxamida) e metil-hidrazina. Esses metabólitos atuam na alquilação ou metilação do DNA (ácido desoxirribonucleico) nas posições N-7 e O-6 da guanina, danificando o DNA, o que acarreta morte das células tumorais (TEMODAR LABEL, 2011).

Contudo, o TMZ também apresenta suas limitações. Em primeiro lugar, apresenta uma ação não direcionada, assim a alquilação do DNA ocorre não só nas células do GBM, como também nas células tronco do sistema hematopoiético, resultando em toxicidade hematológica, sendo a principal limitação de dose deste quimioterápico. Além disso, o TMZ apresenta rápida hidrólise em condições fisiológicas, o que limita sua ação no tumor, pois hidrolisa antes de ultrapassar a barreira hematoencefálica (ORTIZ *et al*, 2019).

Além das limitações citadas, alguns subtipos de GBM apresentam resistência à TMZ relacionada a capacidade de reparação celular, decorrente da reparação do DNA. Esta capacidade é mediada pela proteína alquiltransferase (AGT) codificada pelo MGMT. Em alguns tumores existem a inibição do MGMT e, conseqüentemente, maior resposta à TMZ. (HEGI *et al*, 2005). Apesar de considerado tratamento de primeira linha para GBMs, com incremento de sobrevida significativamente maior quando utilizada, em comparação ao tratamento isolado com cirurgia e radioterapia, ainda encontramos uma mortalidade de cerca 80% dos casos em 5 anos. (INCA, 2019).

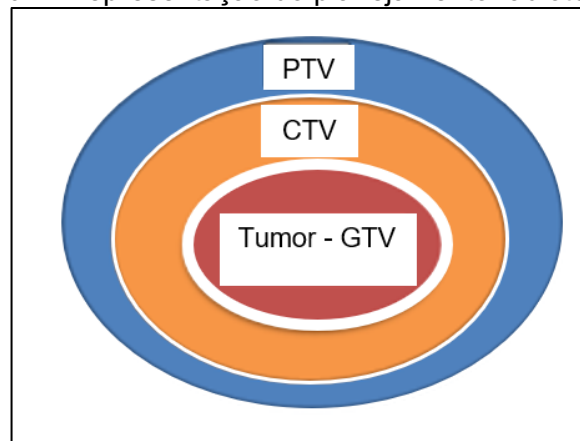
A radioterapia com técnica 3D e conformacional parcial do cérebro é recomendada, desde a década de 70 por demonstrar melhor controle local e ganho de sobrevida em portadores de gliomas de alto grau (KRISTIANSEN *et al*, 1981). A dose recomendada para gliomas de alto grau é de 60Gy, fracionados em 200cGy por sessão diária, dividindo o tratamento em duas fases de 46Gy com maior margem e reforço de dose com 14Gy sempre com fracionamento de 2Gy diário (CABRERA *et al*, 2016).

A terapia de prótons tem sido utilizada para reduzir toxicidade em longo prazo, com intuito de preservação da função cognitiva (ADEBERG *et al*, 2017).

O planejamento radioterápico se baseia no volume tumoral residual após máxima cirurgia possível, com ou sem o edema (GTV – volume da massa tumoral),

com margem de doença subclínica (CTV – volume da massa tumoral acrescido de margem subclínica) e a margem de erro (PTV – Volume de planejamento radioterápico), sendo está a área irradiada (Figura 1). Quando incluso o edema no GTV inicial, este geralmente é excluído na segunda fase. O volume do boost, ou reforço, no geral, inclui o tumor residual e as margens da ressecção cirúrgica (NCCN, 2019).

Figura 1: Representação do planejamento radioterápico



Fonte: A autora, 2020.

Em pacientes idosos com pior prognóstico e limitações funcionais, pode-se utilizar protocolos de hipofracionamento. Roa e colaboradores, em 2015, realizaram um estudo randomizado com pacientes com mais de 60 anos e KPS (Performance status) menor que 70, e avaliaram o fracionamento tradicional de 60G em 6 semanas *versus* o fracionamento de 40Gy em 3 semanas (ROA *et al.*, 2015), não havendo diferença de sobrevida nos dois grupos com esses dois regimes de fracionamento. Posteriormente, outros regimes de fracionamento com 40Gy em 15 frações, 34Gy em 10 frações e 25Gy em 5 frações foram estudados com resultados semelhantes. E a comparação de 40Gy em 15 frações e de 25Gy em 5 frações não mostrou diferença significativa na sobrevida nos estudos subsequentes do mesmo grupo utilizado no estudo (ROA *et al.*, 2015).

O estudo randomizado da Organização europeia de pesquisa e tratamento de câncer (EORTC 26062-22061/NCICCTG) comparou o TMZ concomitante à radioterapia com fracionamento tradicional e radioterapia com hipofracionamento

isolada para pacientes idosos, com baixo KPS, onde o grupo com uso concomitante de TMZ mostrou melhor sobrevida. Com maior benefício notado em pacientes com tumores que apresentem metilação do promotor MGMT (STUPP *et al.*, 2009).

Neste contexto, a citotoxicidade da quimioterapia e da radioterapia está diretamente relacionada a capacidade destas modalidades terapêuticas de causar danos no DNA das células tumorais. Como resposta aos danos ao DNA, essas células podem responder com indução a apoptose, modulação da progressão do ciclo celular, tolerância ao dano e indução do reparo do DNA. Dependendo dessas respostas, as células irão sobreviver, seguir para morte programada ou outras vias de morte celular. As respostas celulares aos danos que promovem reparo e sobrevivência têm um impacto negativo na eficácia do tratamento e conduzem a resistência às terapias (MADHUSUDAN; HICKSON, 2005).

Desta forma, apesar de todos os avanços, a mortalidade dos portadores de GBM ainda é muito alta. A alta letalidade decorre, especialmente, das limitações dos tratamentos tradicionais. A limitação do procedimento cirúrgico encontra-se no limite de ressecção de órgãos e tecidos vitais, além da dificuldade na determinação segura de margens cirúrgicas. A radioterapia, por sua vez, apresenta como limitação a dose de tolerância dos tecidos normais e a dificuldade na localização exata e microscópica do tumor, enquanto as terapias sistêmicas apresentam como limitação a toxicidade dos tecidos normais e de órgãos vitais. A associação das terapias tem como intuito reduzir efeitos colaterais e aumentar a efetividade de bons resultados, mas a linha tênue entre a morte tumoral e a morte do hospedeiro ou portador do tumor é dependente das escolhas de associações dos tratamentos, visto que o resultado ideal ainda não foi encontrado (NCCN, 2019).

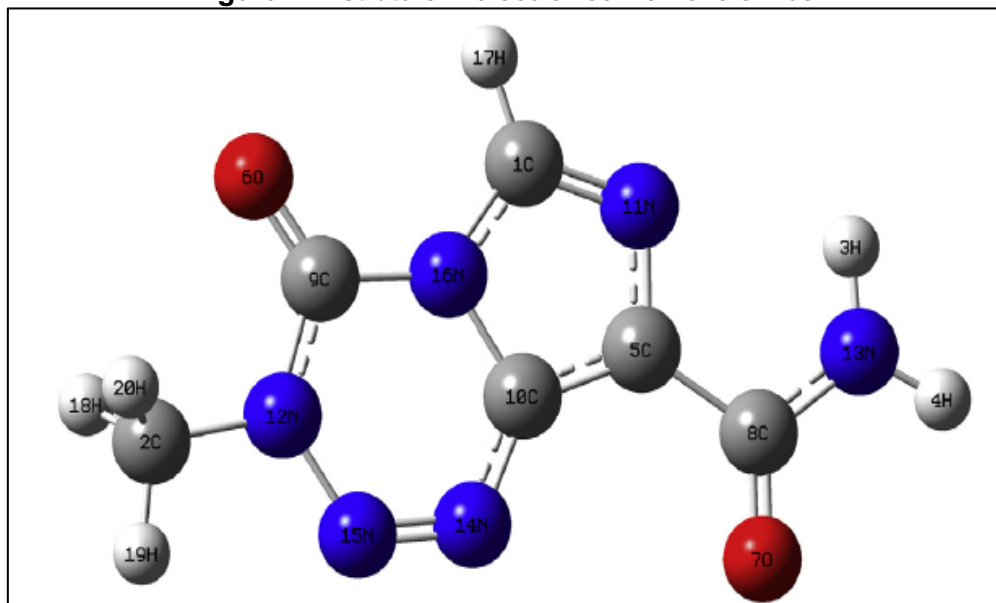
3.2 Temozolomida

Na década de 70, a mitozolomida mostrava-se um promissor quimioterápico para tumores de SNC. Este fármaco se decompõe espontaneamente em um metabólito altamente reativo no DNA e apresentava-se eficaz contra um grande painel de tumores murinos. Contudo, nos estudos *in vivo* a Mitozolomidase mostrou extremamente tóxica, especialmente pelo seu efeito trombolítico, o que levou ao abandono dos estudos com esse quimioterápico.

No início dos anos 80, o quimioterápico TMZ foi sintetizado na Universidade de Aston, sendo um derivado 3-metilico da Mitozolomida, que se mostrou menos tóxico e com atividade antitumoral semelhante. Sua estrutura molecular é mostrada na Figura 2 (FRIEDMAN; KERBY; CALVERT, 2000).

Nos primeiros estudos, o TMZ demonstrou modesta eficácia clínica, com perfil aceitável de segurança e moderada melhora da qualidade de vida em pacientes com GBM recorrente. Contudo, nestes pacientes a resistência tumoral ao fármaco, ainda apresentou importante significância (BRADA, 2001).

Figura 2: Estrutura molecular da Temozolomida



Fonte: Bhat e Ahmad, 2015.

O TMZ é análoga a Dacarbazina (DTIC), conhecido comercialmente, como Temodal ou Temodar, sua fórmula molecular é o $C_6H_6N_6O_2$ e sua nomenclatura 3-metil-4-oxoimidazo-[5,1-d]-[1,2,3,5]-tetrazina-8-carboxamida. Trata-se de um agente quimioterápico oral utilizado no tratamento de tumores agressivos cerebrais e melanoma metastático. Estudos de fase três demonstraram ação superior da TMZ em relação ao DTIC, quanto ao tempo médio de sobrevida livre de progressão e melhora da qualidade de vida relacionado à redução da fadiga e insônia (HUBBARD; FIDANZE, 2007). A Tabela 2 apresenta as principais propriedades físico-químicas da TMZ.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas do Temozolomida.

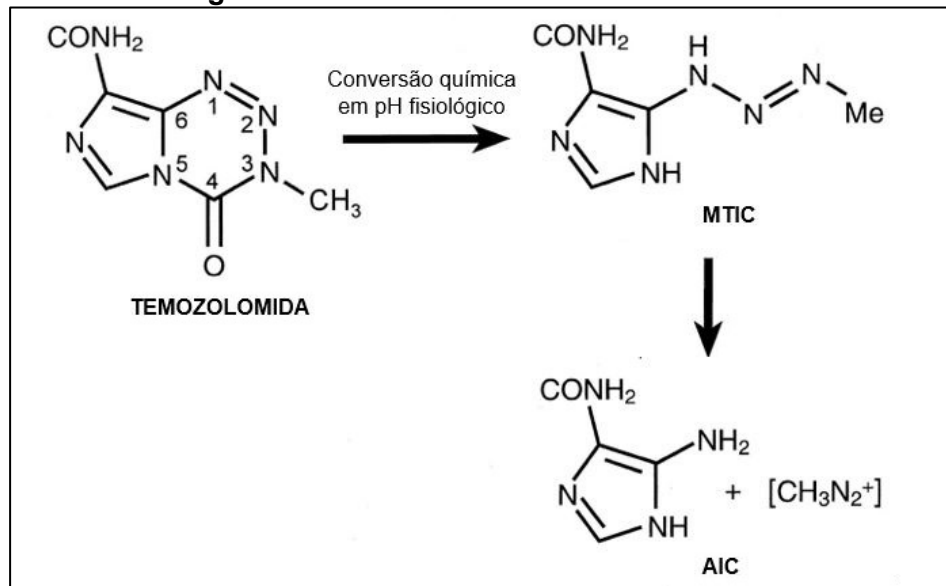
Massa molecular	194,154 g/mol
Fórmula empírica	C ₆ H ₆ N ₆ O ₂
Nota de Solubilidade	~0,33mg/mL em PBS (pH 7,2)
	~0,5mg/mL em DMSO & DMF
	Parcialmente miscível em água
pH de ativação	Fisiológico (pH 7,4)
Temperatura de armazenamento	20 - 25°C

Fonte: MSD, 2020.

Este fármaco é rapidamente absorvido e sua biodisponibilidade de 100% ocorre após 1 a 2 horas. Em pH fisiológico, o TMZ é convertido em mono-metil-triazenoimidazol-carboxamida (MTIC), conforme apresentado na Figura 3. Isso decorre da ação da água, que abre o anel que libera CO₂ e gera o MTIC. O MTIC degrada-se no cátion metildiazônio, que transfere o grupo metil ao DNA e o produto final da degradação, o 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AIC) é excretado pelos rins.

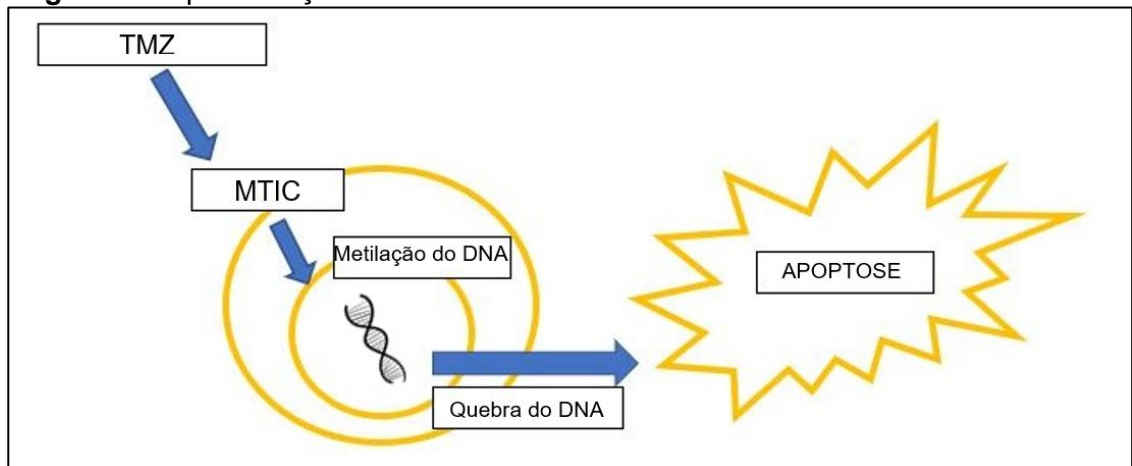
A conversão da TMZ em MTIC ocorre em meio aquoso em condições fisiológicas, não sendo necessária nenhuma reação enzimática, não necessitando da metabolização hepática, fazendo com que estudos *in vitro* e *in vivo* sejam facilmente reproduzíveis. A característica de conversão do TMZ, *in vivo*, por hidrólise em MTIC em diversos locais do corpo e não tão somente no fígado, como ocorre no Dacarbazina, reduz a toxicidade hepática (FRIEDMAN; KERBY; CALVERT, 2000).

Figura 3: Conversão do TMZ em MTIC e AIC.



Fonte: Adaptada de Friedman, Kerby e Calvert, 2000

O MTIC acarreta citotoxicidade decorrente de metilação do DNA nas posições N7 da guanina, O3 da adenina e O6 da guanina, o que resulta em inibição da replicação do dna e morte da célula neoplásica (FRIEDMAN; KERBY; CALVERT, 2000). O mecanismo citotóxico do TMZ está relacionado à falha do DNA em encontrar uma base complementar para a guanina metilada e inibindo a replicação, ocasionando a mecanismo de apoptose, conforme exemplificado na Figura 4.

Figura 4: Representação do mecanismo de citotoxicidade da Temozolomida

Fonte: A autora, 2020.

Temozolomida é recomendada em pacientes com GBM com bom estado geral (avaliados pela escala WHO-PS). Em estudo de fase três randomizado do EORTC-NCIC conduzido por STUPP e colaboradores (2009), 573 pacientes foram randomizados, um grupo recebeu TMZ e radioterapia pós-operatória concomitante por 6 semanas, seguido de TMZ adjuvante e um grupo recebeu apenas radioterapia. A quimiorradiação apresentou sobrevida média de 14,6 meses *versus* 12,1 meses e sobrevida de 2 anos de, respectivamente, 26,5% e 10,4%, além de sobrevida final de 5 anos de 10% *versus* 2% quando comparado com a radiação isolada (STUPP *et al.*, 2009).

As doses de quimioterapia são administradas em ciclos e precisam ser calculadas com muita precisão. Alguns quimioterápicos têm a dose calculada por mg/Kg. Por exemplo, um quimioterápico cujo a dose recomendada no ciclo é de 10 mg/kg, ao ser administrado em uma pessoa de 70Kg, a dose a ser administrada deverá ser de 700mg. No entanto, alguns quimioterápicos, como o TMZ, têm sua dose calculada pela área da superfície corpórea. Neste caso a dose é calculada em mg/m², podendo ser calculada por monogramas ou através de calculadoras próprias para este fim. Sendo o cálculo baseado nas fórmulas abaixo.

$$SC (m^2) = \frac{(Peso (Kg) \times 4) + 7}{Peso (Kg) + 90}$$

ou

$$SC = (\text{Peso}(Kg)^{0,5378}) \times (\text{Estatura}(cm)^{0,3964}) \times 0,024265.$$

A dose de TMZ recomendada no estudo EORTC-NCIC foi de 75 mg/m² diário concomitante a radioterapia, seguida de ciclos com 150-200 mg/m² por 5 dias a cada 28 dias. Estudos de fase dois com ciclos de 21/28 dias e com 50 mg/m² diários estão em andamento em pacientes com GBM (GILBERT *et al*, 2013).

3.3 Nanotecnologia

Nanotecnologia foi definida pelo Subcomitê Interinstitucional de Ciência, Engenharia e Tecnologia como pesquisa e desenvolvimento de tecnologia nos níveis atômico, molecular ou macromolecular, na faixa de 1-100 nm, no intuito de fornecer uma compreensão dos fenômenos e desenvolver materiais, estruturas, dispositivos e sistemas com novas propriedades e funções (TANNER; DEBORAH, 2002).

Em 1959, Richard Feynman, já teria suscitado a possibilidade de manipular e controlar átomos e moléculas. Após cerca de uma década, Norio Taniguchi teria utilizado pela primeira vez o termo Nanotecnologia. Porém somente após 1981, com o desenvolvimento da microscopia, foi possível visualizar nanomateriais. A maioria das nanopartículas, atualmente em uso, tem como origem os metais de transição, quando se pode ressaltar a utilização do ouro, prata e platina. Ainda temos nanocristais de vários compostos como silício e metais (pontos quânticos) (LUNDQVIST *et al.*, 2016).

A síntese de nanopartículas pode ocorrer por duas metodologias, sendo bottom-up e top-down. No método top-down, a nanopartícula é obtida a partir de processos de corrosão ou oxidação de materiais em dimensões microscópicas, enquanto no bottom-up a formação ocorre por meio de métodos químicos para a construção das nanoestruturas a partir de átomos e moléculas individuais. Atualmente os métodos baseados em reações químicas de oxirredução são os mais empregados levando a formação de solução de coloides, em geral por via aquosa, se tratando de um método extremamente versátil e de custo relativamente baixo, quando comparado a outros métodos de síntese de nanomateriais, o que permite facilitar uma produção

em alta escala (OLIVEIRA *et al.*, 2011; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2011; MARANGONI, 2012).

Essas nanopartículas exibem novas características físico-químicas que lhes conferem propriedades elétricas, térmicas, mecânicas e de imagem únicas, podendo ser de grande interesse para setores comerciais, médicos e ambiental (DREHER, 2004).

3.4 Nanopartículas metálicas

No século XIX, as pesquisas no tema de nanotecnologia aumentaram após a publicação do trabalho de Michael Faraday, com investigação das propriedades ópticas de filmes finos preparados com nanopartículas de ouro. Na década de 50 os estudos foram intensificados, quando Turkevich e colaboradores publicaram um método de síntese de soluções coloidais metálicas a partir de reações de oxirredução, utilizando citrato de sódio como agente redutor e estabilizante (TURKEVICH; 1951; TURKEVICH, 1985).

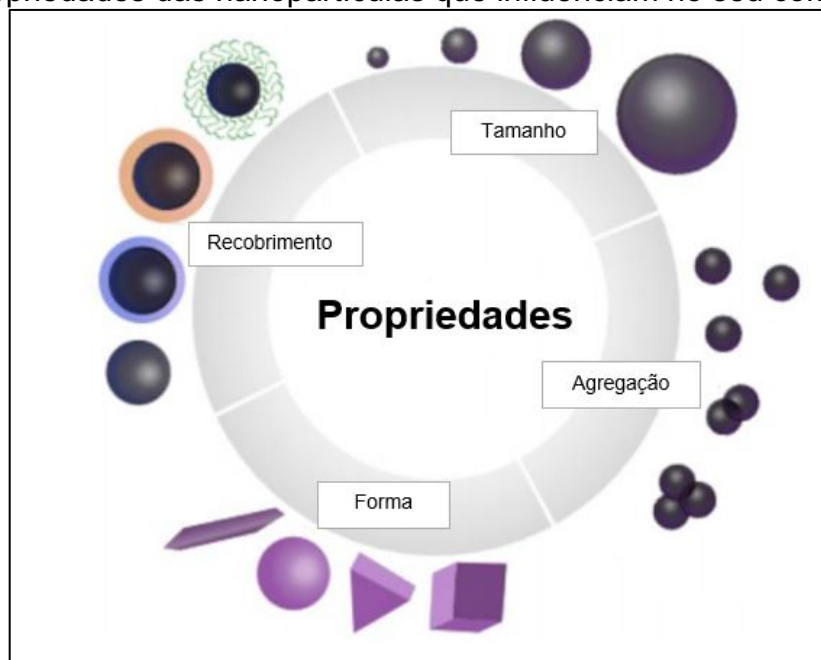
Soluções coloidais de nanopartículas metálicas são interessantes, devido sua facilidade de preparação e modificação química. As soluções coloidais de materiais nobres como ouro e prata apresentam coloração característica e muito intensa, ausente no material original em grande escala. O ouro metálico, por exemplo, apresenta coloração amarelada característica e sua solução coloidal apresenta coloração avermelhada, quando seu tamanho médio é na faixa de 20 nm e, com o aumento do tamanho, essa coloração tende a alterar para roxo até cinza escuro (BONIFÁCIO, 2006). Este fato ocorre decorrente de oscilação coletiva de elétrons livres nas nanopartículas, induzidos por um campo magnético, também denominado de Ressonância Plasmônica de superfície localizada(RPSL) (LINK; BURDA, 1999).

A RPSL é uma propriedade de metais nobres, que se manifesta na região do visível do espectro eletromagnético de 400nm a 700 nm, com singular relação de tamanho das nanoestruturas. Em escala nanométrica o caminho dos elétrons livres pode exceder o raio das nanopartículas, dando origem a uma densidade de carga na sua superfície. Uma força de compensação é gerada e dá origem a um comprimento de onda ressonante único, a banda plasmônica de superfície (PEREIRA, 2009).

As nanopartículas metálicas são muito estudadas e aplicadas em medicina, sua aplicabilidade vai desde o diagnóstico a terapêutica. Podem ser utilizadas como contraste em exames clínicos utilizando raios-X, tomografia e ressonância magnética, mas também como agente bactericida, nanocarreador ou terapia fotossensibilizadora (MELO JUNIOR *et al*, 2012).

As nanopartículas se comportam de forma singular, dependendo de diversos fatores como microambiente que se encontra, potencial de estabilidade, composição química, grau de agregação, morfologia e tamanho (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005). A Figura 5 representa os principais fatores que influenciam no comportamento das nanopartículas.

Figura 5: Propriedades das nanopartículas que influenciam no seu comportamento



Fonte: Adaptada de Moghimi, Hunter e Murray,, 2005.

3.4.1 Nanopartículas de Ouro

O uso do ouro coloidal acontece desde a Idade Média. Registros de uso remetem a fins estéticos, na decoração de cerâmicas e em curativos, quando em 1618 foi publicado o primeiro livro com foco na utilização do ouro coloidal, pelo médico e filósofo Francisci Antonii (DANIEL; ASTRUC, 2004). As soluções coloidais de ouro apresentam coloração vermelha e a ressonância plasmônica varia de 500 a 600 nm conforme seu tamanho e grau de agregação, sendo em média um valor de banda, em

formato de uma curva de Gauss, centrada 520 nm (PETRYAYEVA; KRULL, 2011; PISSUWAN *et al.*, 2010).

O ouro é um material inerte, resistente à oxidação, o que faz com que seu uso seja interessante na macroescala, mas sua citotoxicidade em nanoescala depende de suas dimensões (BINDHU; UMADEVI, 2014). As AuNPs permitem a conjugação com macromoléculas de interesse, sendo de interesse científico e esta propriedade tem sido muito utilizada. Alexei A Bogdanov Jr e colaboradores, empregaram conjugados de AuNPs com habilidade para reconhecimento de células cancerosas, com uso de raio X, o que permitiu diagnóstico e também o tratamento do tumor em ratos (BAPTISTA *et al.*, 2007; BOGDANOV JUNIOR *et al.*, 2015).

A versatilidade das AuNPs é baseada na funcionalização de superfície que permite a formação de compostos nanobiológicos com oligonucleotídeos, anticorpos e proteínas as tornam singulares. Suas propriedades físico-químicas de ressonância plasmônica de superfície, condutividade e comportamento redox, leva a sinais detectáveis em imagens, sendo um novo marcador diagnóstico. Vários estudos demonstram sua variabilidade de aplicações incluindo conjugação de anticorpos (LOO *et al.*, 2004), entrega de drogas (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005), proteção contra radiação UV (PRABU, 2015), purificação de água (BINDHU; UMADEVI, 2014), como antimicrobiano (GANESAN *et al.*, 2015), entre outras.

3.5 Glioblastoma Multiforme e a Nanotecnologia

O uso da nanotecnologia como potencial no desenvolvimento de novas drogas ou terapias tem como objetivo melhorar os resultados de tratamentos convencionais, com potencial incremento nos resultados dos tratamentos e, conseqüentemente na sobrevivência dos portadores dessas neoplasias. Assim, na última década, muitos estudos foram realizados com GBM e uso de nanopartículas. No entanto, até o momento como discutido anteriormente, nenhuma terapia surtiu efeito para a melhoria da sobrevivência dos portadores desse subtipo tumoral (PINEL *et al.* 2019).

Neste contexto, os estudos com nanocarreadores intranasais estão sendo realizados a fim de tornar mais direta a biodisponibilidade do TMZ às regiões próximas

ao cérebro, facilitando a travessia pela barreira hematoencefálica (BRUINSMANN *et al*, 2019).

Recentemente, Marino e colaboradores (2019) publicaram a produção e teste de um nanovetor magnético lipídico. Esse complexo trata-se de lipídeos com uma molécula de biotina revestida de polietilenoglicol na superfície (PEG) com nanopartículas de ferro no seu interior e funcionalizadas na superfície com o receptor de transferrina, visto que o GBM e as células endoteliais da barreira hematoencefálica apresentam esse receptor em alta quantidade. Após a formação da molécula, esta foi carregada com TMZ e foram realizados testes com campos eletromagnéticos que demonstraram *in vitro* a sinergia de ação com TMZ associado ao nanovetor. O composto pode ser um promissor biomaterial para lesões residuais após a realização do tratamento com quimioterapia e radioterapia, sendo este o maior fator de recidiva pós-tratamento (MARINO *et al*, 2019).

O uso de nanopartículas com revestimento a base de quitosana têm sido estudadas como carreadoras de agentes quimioterápicos, na intenção de resolver a limitação da barreira hematoencefálica. Na literatura, os estudos de nanopartículas de quitosana como carreadoras de Cloritoxina, EGFR e anticorpo anti-receptor de transferrina, como direcionadores ou alvos para o GBM, sendo que a Cloritoxina foi o agente mais promissor nestes estudos por reconhecer uma variedade de tumores de origem neuroectodérmica e ter pouca afinidade com o tecido cerebral normal (ORTIZ *et al*, 2019).

A inibição das vias de reparo também tem sido alvo de nanocompostos. Estudos recentes mostraram o desenvolvimento de uma nanopartícula carreadora de EGFR e do fator de transição epitélio mesenquimal-epitelial (MET), resultou num menor reparo do DNA após uso da TMZ, reduzindo a resistência a droga em camundongos, com ganho de sobrevivência (MENG *et al*, 2020).

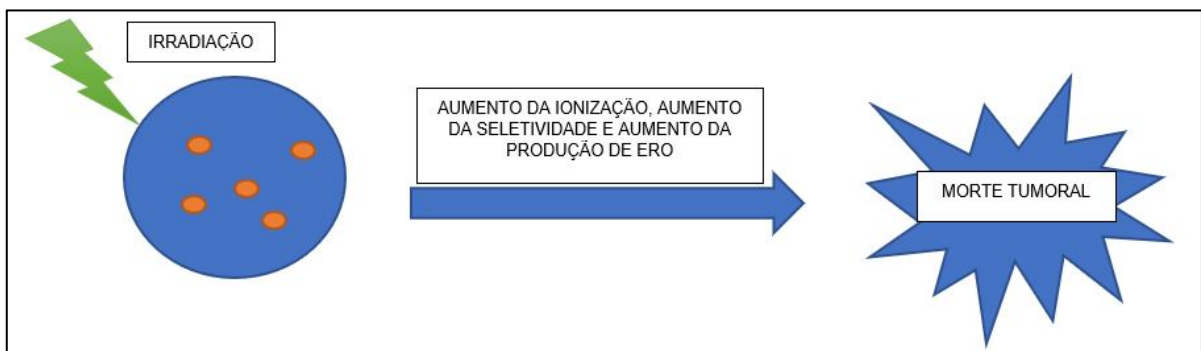
Numa recente revisão, os autores compilaram diversos trabalhos que utilizam a nanotecnologia como base para novos tratamentos, que tinham como objetivo soluções para as limitações do tratamento para combate do GBM. A maior parte deles se baseia no uso de nanocarreadores lipídicos, poliméricos, nanopartículas de sílica, nanopartículas magnéticas, contudo neste trabalho não encontramos compilados estudos com nanopartículas de ouro, que é o foco desta dissertação (FORMICOLA *et al.*, 2019).

3.6 Irradiação e Nanopartículas Metálicas

Na radioterapia, o grande desafio é otimizar a dose no tecido tumoral e, dessa forma, atingir o alvo com precisão de tal maneira que os tecidos saudáveis sejam poupados. As nanopartículas metálicas despertam o interesse dos radioterapeutas, pois apresentam alta capacidade de absorção de raios-X, logo é razoável afirmar que as nanopartículas, formadas de átomos de maior número atômico (Z), tem maior probabilidade de potencializar o efeito da radioterapia (SCHAUE; MCBRIDE, 2015).

No caso dos raios-X, a interação com a matéria biológica tem a probabilidade de ocorrer por meio dos efeitos Compton e/ou fotoelétrico. Esta probabilidade de interação depende do número atômico (Z), sendo que a presença das nanopartículas aumentaria a probabilidade de ionização no microambiente celular (Figura 6). Ademais, com o aumento da permeabilidade e retenção dos tecidos tumorais decorrente da angiogênese intensa nos tumores, não acompanhada da proliferação do sistema linfático, ocorreria a uma maior retenção das nanopartículas nos tecidos tumorais, servindo como sistema de seleção de células tumorais, acarretando em especificidade para a intensificação da irradiação e, por fim, a presença das nanopartículas metálicas aumentaria a produção de espécies reativas de oxigênio, causando maior dano celular (CLINE; DELAHUNTY; XIE, 2019).

Figura 6: Esquema representativo da potencialização da Ação da radioterapia por nanopartículas metálicas.



Fonte: A autora, 2020.

Em 2004, Hainfeld e colaboradores publicaram estudo com camundongos mostrando o incremento da ação da radioterapia pela associação com AuNPs no tratamento de tumores de mama enxertados em camundongos. Neste estudo, a

sobrevida do grupo que recebeu AuNPs por via intravenosa superou em 12 meses a sobrevida do grupo, que recebeu apenas radioterapia (HAINFELD; SLATKIN; SMILOWITZ, 2004).

Após os primeiros resultados, passaram a testar a ação em GBM e mostraram uma maior seletividade das nanopartículas para o tecido tumoral na relação de 19:1, o que permitiu uma boa resolução do tumor em tomografia computadorizada em camundongos. Para a terapia com AuNPs, apresentando um diâmetro de 15 nm, foi utilizada uma dose entre 15-35 Gy e concentração de 4 mg de AuNPs por g de camundongo. Para uma dose única de 15 Gy, o ganho na sobrevida foi de 58%. Entretanto, foi observado que nanopartículas na ordem de 1,9 nm houve um aumento de toxicidade e morte precoce dos animais. Apesar do ganho na sobrevida, os autores discutem que a seletividade tumoral não é total e que AuNPs foram encontradas em quantidade expressiva no fígado, baço e na pele, alertando ainda quanto ao elevado custo das nanopartículas de ouro como um empecilho na disseminação como adjuvante no tratamento do GBM (HAINFELD *et al*, 2013).

Miladi e colaboradores desenvolveram uma molécula que associa a AuNPs com ácido dietilenotriaminapentacético ditiolado (DTDTPA) e gadolínio. Esse novo composto demonstrou-se eficaz no diagnóstico de GBM em tomografia computadorizada pela presença do ouro e em ressonância magnética pela presença do gadolínio, além de aumentar a radiosensibilização com ganho de sobrevida, com tempo médio de 129 dias para os camundongos que receberam o composto e a radioterapia, e de 72,5 dias em detrimento do grupo que recebeu apenas radioterapia (MILADI *et al*, 2014).

Entretanto, num estudo *in vitro* para a linhagem celular U251 de GBM demonstrou resultado negativo, com redução da sobrevida clonogênica quando associado a AuNPs associadas à radioterapia (JOH *et al*, 2013).

No presente trabalho, foi investigada a ação das nanopartículas de ouro em associação ao quimioterápico Temozolomida, com e sem irradiação em aparelho de tomografia e com radioterapia em acelerador linear, visando analisar a hipótese de sinergia da associação sem irradiação, analisar o potencial do uso teranóstico em tomografia e a potencialização do tratamento com radioterapia.

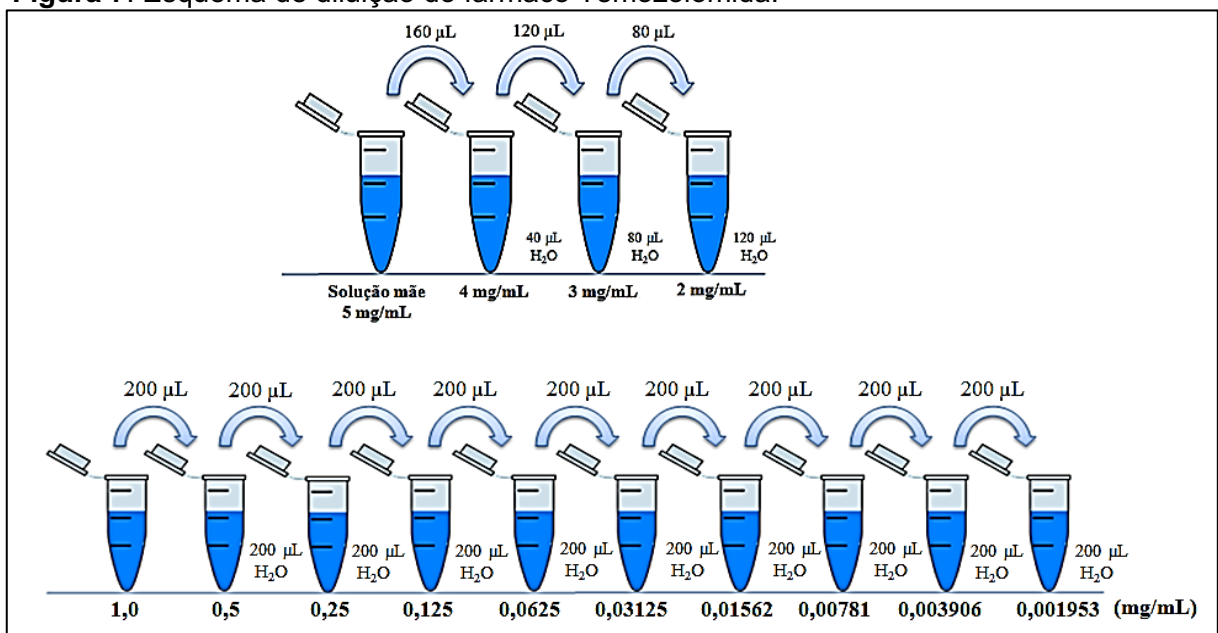
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo caracterizamos as propriedades químicas do TMZ por meio das Espectroscopias no UV-visível e FT-IR. Realizamos a síntese e caracterização das AuNPs e, por fim, comparamos o efeito do TMZ isolado e associado com AuNPs, em células GBM da linhagem M059J sem e com irradiação via tomografia e radioterapia. Os experimentos foram feitos no Laboratório de Nanossensores, do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Univap.

4.1 Da preparação para análise e caracterização da Temozolomida

O fármaco TMZ utilizado neste trabalho foi adquirido da empresa *Sigma Aldrich*, sendo as análises realizadas a partir de uma amostra e diluição seriada, como apresentado na Figura 7.

Figura 7: Esquema de diluição do fármaco Temozolomida.



Fonte: A autora, 2020.

Após diluição as amostras foram homogeneizadas com auxílio de pipetador e foram feitas as análises UV-visível para cada concentração. Posteriormente, foram realizadas as diluições de 1 mg de TMZ em água, PBS e meio ácido (adição de ácido

clorídrico) para análise de estabilidade, sendo submetidas à exposição à luz (ambiente), tendo como controle o TMZ armazenado na ausência de iluminação.

Os espectros UV-Visível foram obtidos no espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., USA), na região de 190-840 nm com resolução espectral de 1 nm e caminho óptico de 1 mm. Para as leituras, foram utilizados 2 μ L da amostra depositadas no pedestal do equipamento e os gráficos foram plotados com o auxílio do software OriginPro versão 8.5.1.

Os espectros de FT-IR foram obtidos na Central Multiusuários do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da UNIVAP. Os espectros foram obtidos em modo de transmissão na faixa de 3500 cm^{-1} a 900 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 32 varreduras, em ambiente climatizado a temperatura de 20°C. O espectrofotômetro infravermelho utilizado foi o Spectrum 400 da Perkin Elmer.

4.2 Da síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de Turkevich adaptado, com a finalidade de produzir coloides esféricos de aproximadamente 20 nm. Previamente, as vidrarias foram lavadas com água régia na proporção 3:1 de ácido nítrico e ácido clorídrico para remoção de metais contaminantes. Para síntese foi pesado 240 mg de cloreto de ouro ácido (III) triidratado (HAuCl_4 – *Sigma Aldrich*) e feita a diluição em 450 mL de água ultrapura, sendo a solução aquecida sob agitação constante. Em seguida, foi acrescentado 50 mL de citrato de sódio tribásico diidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - *Sigma Aldrich*) a 1%, preservando a temperatura de ebulição por mais uma hora. Após esse período foi cessado o aquecimento e mantida a agitação até a temperatura ambiente. Foi possível observar a mudança de coloração da amostra para vermelho escuro, específico da solução coloidal de AuNPs. Em seguida foi armazenada a 4°C em abrigo da luz e caracterizada por espectroscopia de UV-visível e DLS.

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizado para determinar o diâmetro hidrodinâmico das AuNPs produzidas em dimensões nanométricas, com o intuito de observar a distribuição do diâmetro médio. Utilizando o equipamento ZetaSizer Nano (Malvern, modelo ZS90), no modo “Size”, com uma cubeta de poliestireno (Modelo

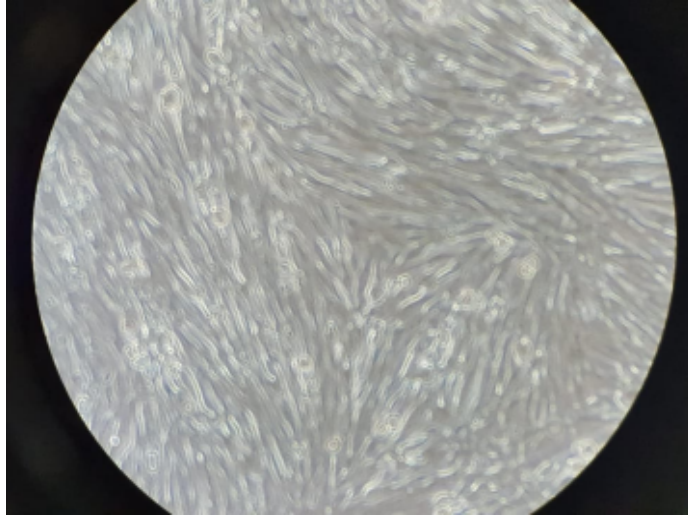
ZEN0118, Sarstedt), 400 µL da solução coloidal foram adicionados, em que uma média de três análises por amostragem foi realizada para a obtenção do resultado. A análise do potencial Zeta da AuNPs foi feita utilizando o equipamento, no modo “Zeta”, em cubetas capilares com eletrodos (Malvern, modelo DTS1070)

Os espectros UV-Visível foram obtidos no espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., USA), na região de 190-840 nm com resolução espectral de 1 nm e caminho óptico de 1 cm. Para as leituras, foram utilizados 2 µL da amostra depositadas no pedestal do equipamento e os gráficos foram plotados com o auxílio do software OriginPro versão 8.5.1.

4.3 Da cultura das células de Glioblastoma

A partir da coleta de células de Glioblastoma de um homem de 33 anos pesquisadores isolaram a linhagem M059J (ALLALUNIS-TURNER *et al.*, 1993). As células para este estudo foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro. A cultura foi feita em garrafa padrão, contendo uma mistura 1:1 do meio de Eagle modificado de Dulbecco e do meio de HAM F12 com L-glutamina 2,5 mM, HEPES 15 mM, piruvato de sódio 0,5 mM e bicarbonato de sódio 1,2 g/L suplementado com aminoácidos não essenciais 0,05 mM e 10% soro fetal bovino, com pH aproximado de 7,2. As células devem ser mantidas em incubadora de CO₂ a 5% e temperatura de 37° devendo evitar a alcalinidade excessiva do meio durante a recuperação e cultura das células.

Figura 8: Cultura de células de GBM da linhagem M-059J



Fonte: A autora, 2020.

4.4 Do tratamento utilizando TMZ e nanopartículas

As células foram semeadas em microplacas de 96 poços, após adesão celular em aproximadamente 24 h. As células foram tratadas com TMZ e com TMZ associado a AuNPs, na presença e na ausência de radiação ionizante. As concentrações de AuNPs foram 0 (grupo controle), 10^6 (N1), 10^8 (N2), 10^9 (N3), 10^{10} (N4), partículas/ml, isoladas ou combinadas com TMZ nas concentrações de 0 (grupo controle), 250 μ m, 500 μ m, 750 μ m e 1000 μ m.

4.5 Da irradiação por Tomografia

As células foram tratadas com TMZ e com TMZ associado às AuNPs na presença de radiação ionizante, em Tomografia Computadorizada Multislice Alexion Toshiba com 120 KVp e 90 mAs, localizada na Clínica Tomovale no Município de São José dos Campos-SP. Os parâmetros são apresentados na Tabela 3, os resultados de viabilidade celular foram avaliados após 48 h da irradiação.

Tabela 3: Parâmetros da Irradiação com Tomografia

Aparelho	Tomografia Computadorizada Multislice Alexion Toshiba
Dose	120KVp e 90mAs
DDS	100,0cm

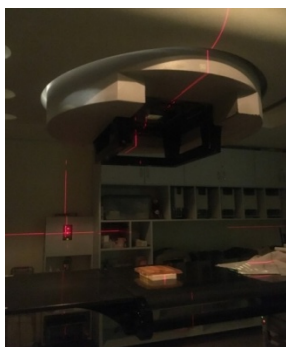
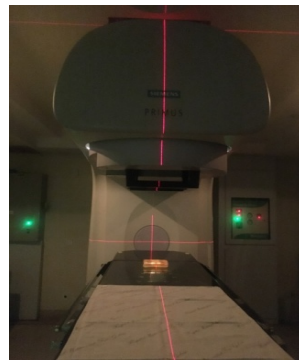
Bólus	Ausente
-------	---------

Fonte: Autora.

4.6 Da irradiação por Radioterapia

As células foram tratadas com TMZ e com TMZ associado às AuNPs na presença de radiação ionizante, em aparelho de radioterapia, Acelerador Linear - Siemens de 6MV, com taxa de dose de 200cGy/min, dose aplicada de 200cGy, com distância SSD de 100 cm e bólus de 1,0cm na Clínica Radiolmage localizada no Hospital Frei Galvão em Guaratinguetá-SP (Figura 9). Os resultados de viabilidade celular foram avaliados após 48 h da irradiação.

Figura 9: Irradiação em aparelho de Radioterapia



Fonte: A autora, 2020.

Tabela 4: Parâmetros da Irradiação com Radioterapia

Aparelho	Acelerador linear 6MV – Primus da Simens
Taxa de Dose	200cGy/min
Dose	200cGy
Distância SSD	100,0cm
Bólus	1,0cm

Fonte: Autora.

4.7 Do teste de viabilidade celular

A metodologia consiste na adição de 30 µL/poço do corante azul de tripan e incubados por 5 min, sendo posteriormente lavados com solução de PBS. Em seguida, foram coletadas imagens dos poços por meio do Programa Future WinJoe versão 1.0.7.9, utilizando o microscópio invertido NIB-100 (Bel equipamentos analíticos). A contagem de célula foi realizada com auxílio do Programa ImageJ versão 1.48.

Nestas análises somente as células com membrana danificada absorvem o corante, ficando com coloração azul e as células viáveis têm um aspecto translucido. A determinação da viabilidade da linhagem celular M059J foi determinado pela Equação 1:

$$Viabilidade\ celular(\%) = 100 \frac{n^{\circ}de\ células\ translúcidas}{n^{\circ}total\ de\ células} \quad [1]$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O GBM é um subtipo tumoral que ainda desafia os pesquisadores e profissionais de saúde, devido sua alta agressividade e as poucas possibilidades terapêuticas clínicas disponíveis. Um dos desafios se relaciona à dificuldade de acesso do fármaco ao sistema nervoso central e a resistência adaptativa aos fármacos-antitumorais, além da dificuldade de diagnóstico precoce e marcadores tumorais que auxiliem na delimitação tumoral e que potencializem efeitos das terapias tradicionais (NCCN, 2019).

O tema deste estudo foi motivado pela falta de opções de tratamento dos Glioblastomas Multiformes, que são os tumores mais comuns de Sistema Nervoso Central, correspondendo a 60 % dos casos. Estes tumores são extremamente agressivos e prognóstico ruim, seus portadores apresentam cerca de 12 a 15 meses de sobrevida mediana após o diagnóstico. O tratamento padrão inclui cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvantes, contudo mesmo dispensado todos os recursos os índices de recorrência são altos, o que justifica o baixo prognóstico (YIN *et al*, 2019).

As principais limitações no tratamento estão no caráter altamente infiltrativo do tumor, o que acarreta dificuldade em definir as margens tumorais, esta limitação acarreta em aumento dos danos cerebrais irreversíveis, tanto decorrente de cirurgia quanto de radioterapia. Quanto a limitação relacionada às drogas quimioterápicas são, principalmente, a dificuldade de acesso ao SNC, devido à presença da barreira hematoencefálica e a alta toxicidade devido a necessidade de altas doses do fármaco para que aja de maneira efetiva no tumor (FABIAN *et al*, 2019).

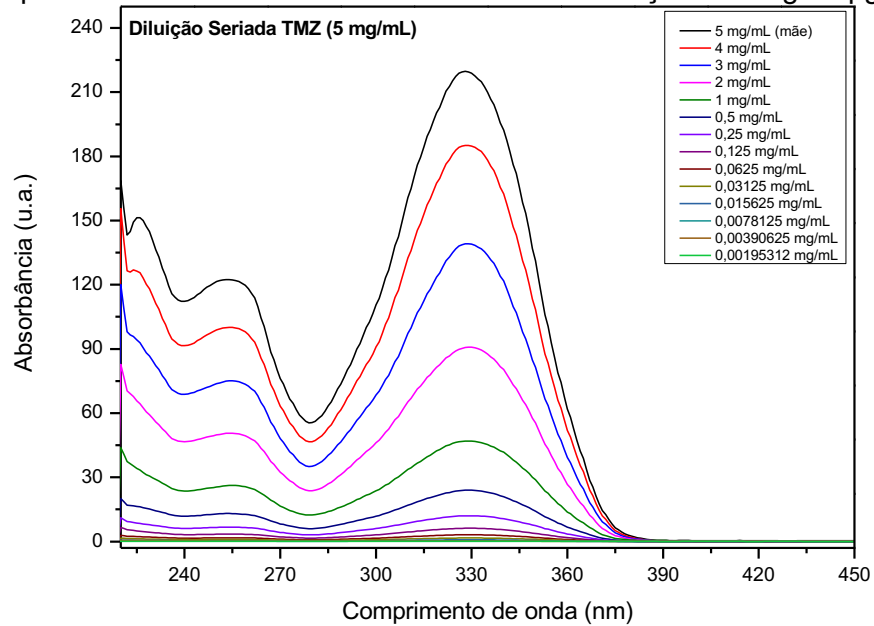
Assim, buscando novas alternativas, a seguir, apresentaremos e discutiremos nossos resultados na seguinte ordem: Caracterização da Temozolomida, caracterização da AuNPs e avaliação da viabilidade celular.

5.1 Caracterizações da Temozolomida

Para entender melhor o TMZ e suas possibilidades de associações com as AuNPs realizamos a caracterização por meio da espectroscopia de UV-visível. Os

espectros UV-visível da diluição seriada são apresentados na Figura 10. Esta avaliação permitiu observar duas bandas predominantes centradas em 254 nm e 330 nm.

Figura 10: Espectro UV-Visível da TMZ na faixa de concentração de 5mg a 2 μ g.



Fonte: A autora, 2020.

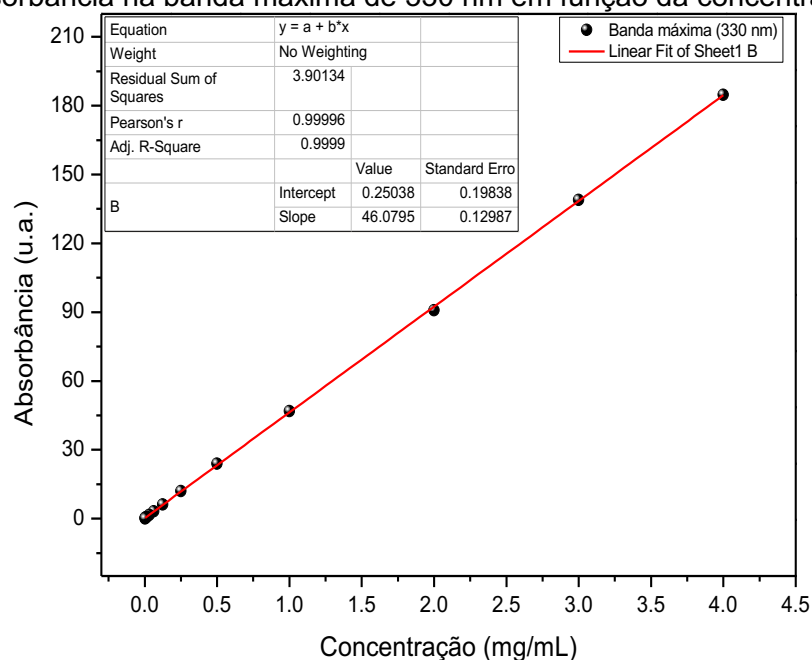
Na tabela 5 são apresentados os valores de absorbância para as principais bandas centradas em 254 nm e 330 nm, permitindo a análise da banda mais indicada para determinar a relação da lei de Lambert-Beer.

Tabela 5: Valores de absorvância por concentração.

Concentração (mg/mL)	Absorvância (u.a.)	
	254 nm	330 nm
5,0	122,395	218,862
4,0	100,061	184,771
3,0	75,089	138,958
2,0	50,612	90,798
1,0	26,222	46,919
0,5	13,081	23,953
0,25	6,688	12,037
0,125	3,469	6,205
0,0625	1,741	3,147
0,03125	0,947	1,658
0,01562	0,422	0,797
0,00781	0,247	0,428
0,003906	0,283	0,267
0,001953	0,058	0,102

Fonte: A autora, 2020.

Os resultados apresentados na Tabela 5 permitem verificar que na menor concentração, os valores de absorvância da banda centrada em 330 nm são mais adequados para medir menores concentrações de TMZ. Neste contexto, um ajuste linear foi adotado para verificar a correlação dos dados, sendo apresentado no gráfico da Figura 11.

Figura 11: Absorvância na banda máxima de 330 nm em função da concentração.

Fonte: A autora, 2020

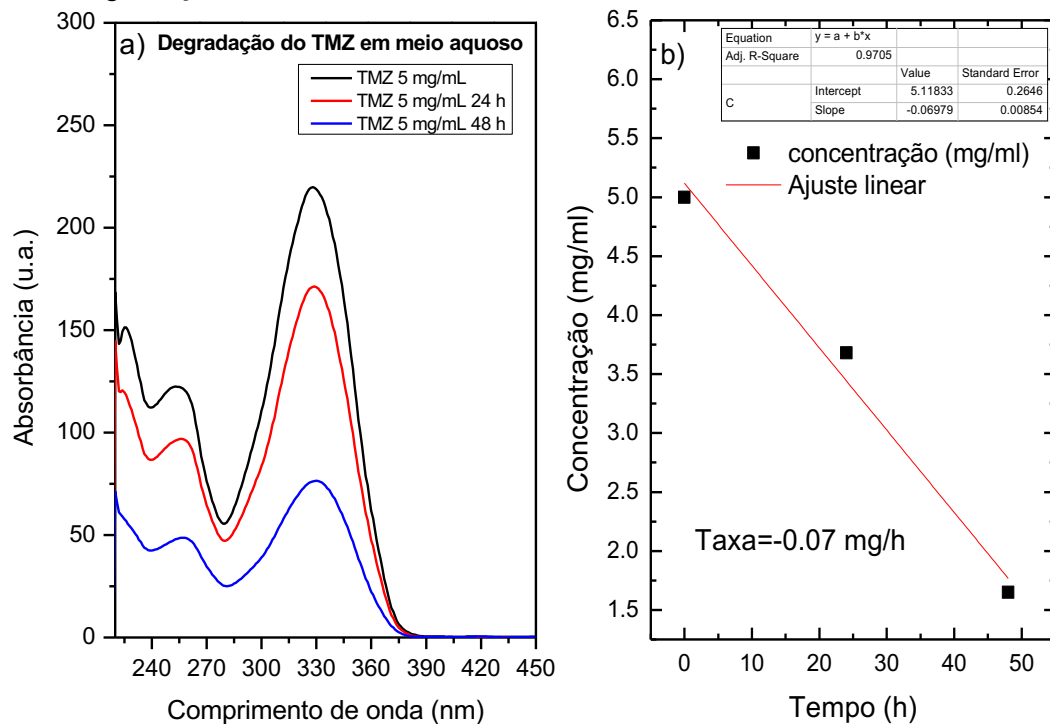
Os resultados da correlação linear entre a concentração e absorvância resultaram em uma reta, com coeficiente de Pearson de 0,99996, que permite com precisão determinar a quantidade de TMZ em uma solução aquosa, sendo importante para determinar a sua concentração em culturas de células, já que sua degradação em meio aquoso está diretamente relacionada com sua conversão em MTIC e sua ação. Este valor do coeficiente de Pearson permitiu a utilização da equação da reta, para avaliar a concentração por meio do valor da absorção, conforme descrito pela Equação 2.

$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{valor de absorvância em } 330\text{nm}}{46,08} - 0,005 \quad [2]$$

Em meio aquoso, o TMZ se converte por hidrólise em condições fisiológicas em sua forma ativa o MTIC, quando a degradação ocorre após o TMZ atravessar a barreira hematoencefálica e ser captado pelo GBM, o MTIC age metilando o DNA, principalmente, na posição O6 e após dificuldade da célula tumoral em encontrar uma base complementar para a base metilada ocorre a morte celular tumoral por apoptose. No entanto, quando a degradação ocorre na corrente sanguínea antes de atravessar a barreira hematoencefálica o MTIC não consegue atravessá-la e este se torna tóxico ao organismo e por este motivo é muito importante entender com detalhes a degradação do TMZ (DI MARTINO *et al*, 2017).

Neste contexto, os espectros no UV-Visível permitiram avaliar a degradação do TMZ em meio aquoso, os dados são apresentados na Figura 12. A degradação é esperada em virtude da conversão química supracitada, mostrada no diagrama da Figura 4. O percentual do TMZ íntegro pode ser calculado por meio da Equação 2, sendo a taxa de degradação de 0,07 mg/h calculado pela primeira derivada da reta ajustada ajuste os dados experimentais (Figura 12b).

Figura 12: Degradação do TMZ após 24 e 48h: a) Espectros UV-Visível e, b) determinação da taxa de degradação.

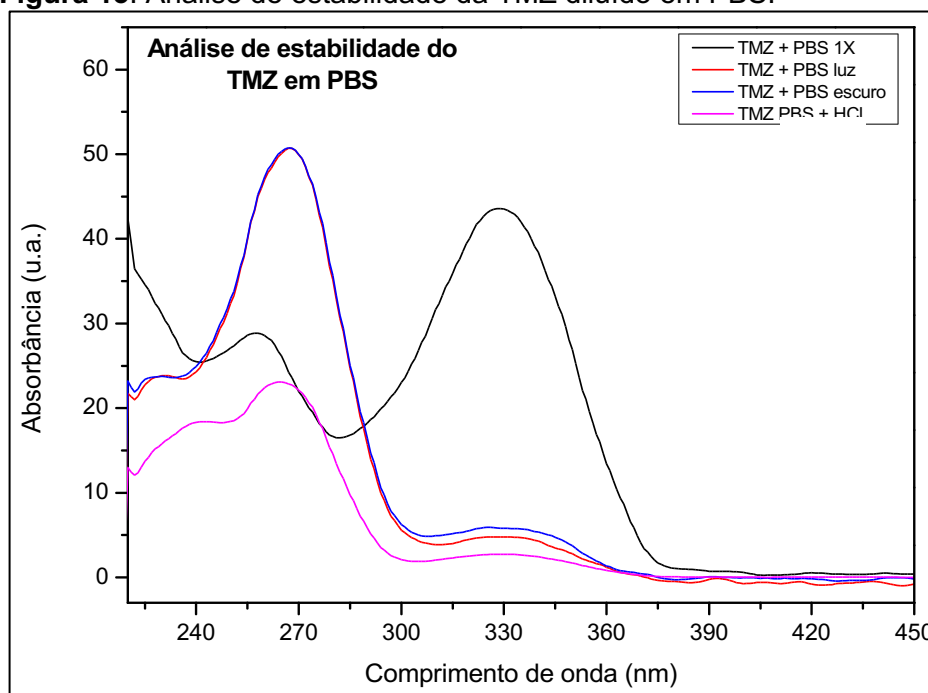


Fonte: A autora, 2020.

Esta taxa de degradação do TMZ de 0,07 mg/h é um resultado importante, pois para comparar os resultados é necessária a diluição do TMZ no momento do experimento, evitando distorções pela degradação. A taxa de degradação poderá servir como base para estudos posteriores de avaliação de estabilidade de nanoveículos associados ao TMZ. De fato, uma das desvantagens do TMZ é a meia vida curta de cerca de 1,8h, o que exige múltiplas altas doses para que o medicamento alcance doses efetivas para combate do tumor. O aumento das doses traz consigo também o aumento da toxicidade, acarretando toxicidade hematológica, cardiopatia aguda, ulceração oral, hepatotoxicidade e pneumonites. Na intenção de melhorar a ação do TMZ, diversos veículos a base de lipossomas e nanopartículas vêm sendo estudados, ainda sem nenhum nanoveículo em uso clínico, sendo a associação com nanopartículas de ouro uma das possibilidades (SHAPIRA-FURMAN *et al*, 2019).

Outro resultado importante foi o estudo da diluição do TMZ em PBS, como apresentado na Figura 13. Habitualmente se utiliza o PBS para análises em culturas de células, mas esta diluição mostrou uma degradação acentuada do TMZ, mesmo em meio ácido, que será comentado na Figura 14.

Figura 13: Análise de estabilidade da TMZ diluído em PBS.

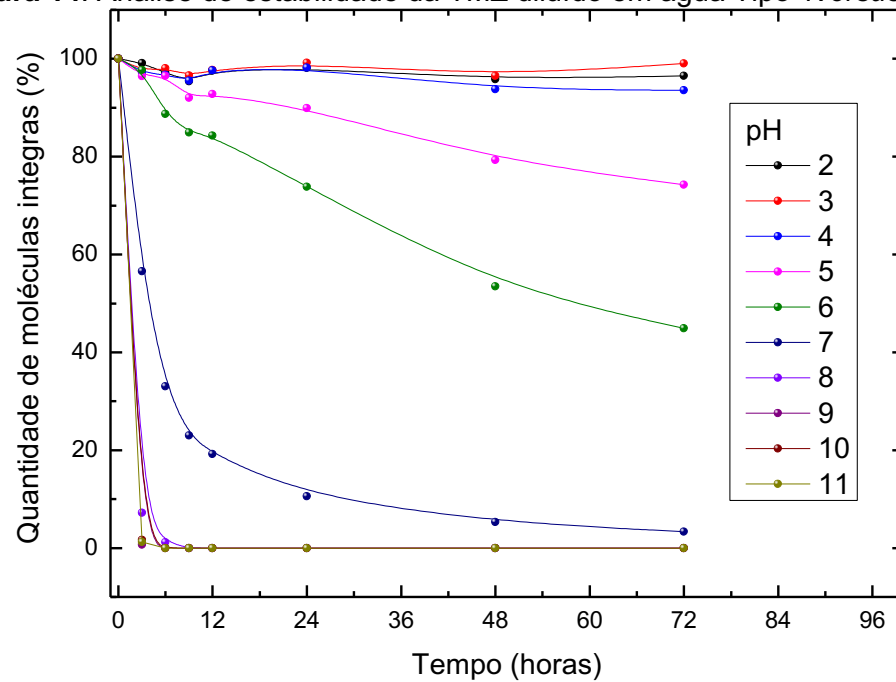


Fonte: A autora, 2020.

Estes resultados mostraram que a banda predominante de 330 nm decresceu, apresentando característica do fármaco degradado, quando a banda de 254 nm é a mais intensa. Por outro lado, a incidência de radiação na faixa do visível não alterou significativamente os espectros de UV-Visível do TMZ, mostrando que este parâmetro não é importante na manipulação do fármaco. Assim, conclui-se que a utilização do PBS nos estudos de viabilidade não é adequada.

Para avaliar o melhor meio (em função do pH) para manipulação do fármaco diluído em água, levando em consideração a degradação, realizou-se a análise da estabilidade do TMZ diluído em meio aquoso variando o pH do meio e registrando os valores em função do tempo. Os resultados são apresentados na Figura 14. O fármaco mostrou-se estável em meio ácido para valores de pH de 2 a 4, não sendo observado degradação no tempo experimental estudado, sendo uma possibilidade para manipulação em estudos futuros de nano compostos contendo TMZ, evitando a degradação antes que ocorra a entrega do fármaco as células tumorais. Enquanto para valores de pH próximos ao fisiológicos e em meio básico, a degradação é acentuada.

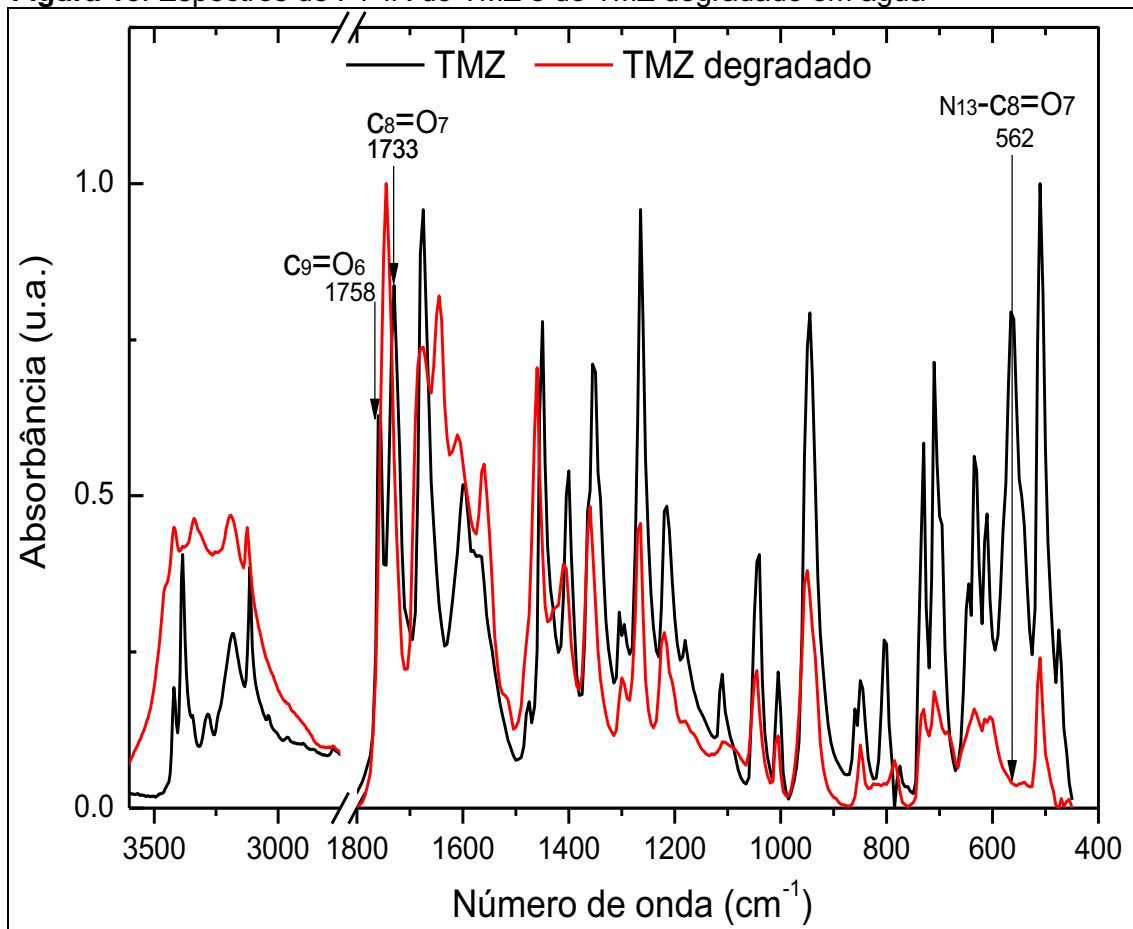
Figura 14: Análise de estabilidade da TMZ diluído em água Tipo 1 versus meio ácido.



Fonte: A autora, 2020.

Para confirmar as mudanças na estrutura molecular do TMZ, antes e após degradação, a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica rápida e efetiva, pois permite identificar compostos e moléculas por meio da frequência de vibrações específicas, correspondentes aos níveis de energia da molécula, ou níveis vibracionais. Neste trabalho o fármaco TMZ foi caracterizado por esta técnica, o que permitirá a avaliação futura de compostos com este fármaco (HETTIARACHCHI *et al*, 2019). Os resultados são apresentados na Figura 15, quando é possível observar as alterações nas bandas vibracionais, correlacionadas a degradação do fármaco, como apresentado na Figura 4.

Figura 15: Espectros de FT-IR do TMZ e do TMZ degradado em água



Fonte: A autora, 2020

A molécula do TMZ é composta por 20 átomos e possui 54 modos normais de vibração, para ajudar a compreensão verifique a numeração dos átomos da Figura 2. Na reação de degradação existe a liberação de CO_2 , logo as principais mudanças estruturais estão nos modos vibracionais de interações do oxigênio, como destacado no espectro. Os principais modos vibracionais relacionados foram destacados na Tabela 6. As vibrações em anel são previstas em 699cm^{-1} , conforme estudo teórico de modelamento molecular (BHAT; AHMAD, 2015).

Tabela 6: Bandas características do TMZ íntegro e degradado em água:

Vibrações do Grupo, a posição do átomo (Fig. 2)	Número de onda (cm^{-1})	
	TMZ íntegro	TMZ degradado
C9=O6	1758	
C8=O7	1733	1744
N13-C8=O7	562	562
Em Anel (699 cm^{-1})	699	709

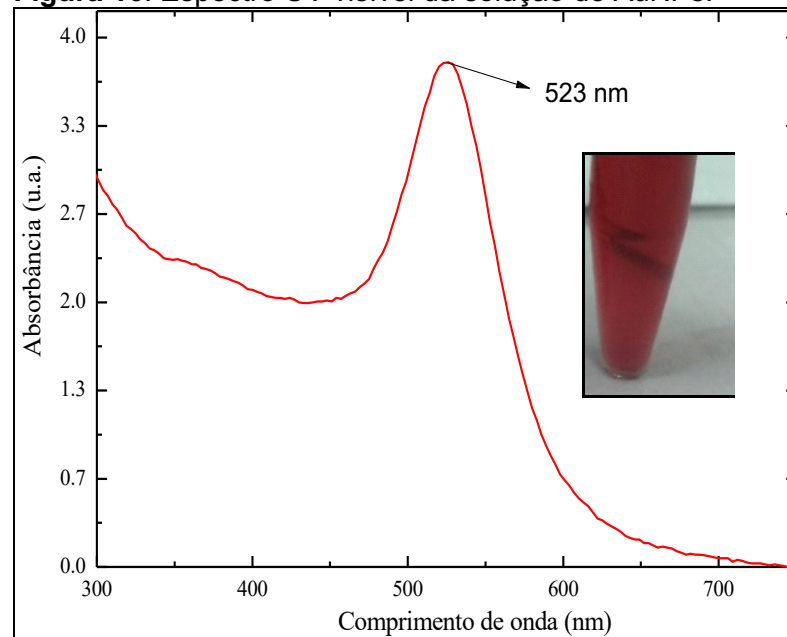
Fonte: A autora, 2020

A análise do espectro mostra que o TMZ degradado não apresenta duas bandas bem definidas centradas em 1758 cm^{-1} e 1733 cm^{-1} , que pode ser explicado pela reação química mostrada na Figura 3. A principal mudança ocorre no rompimento do anel e a perda do átomo de oxigênio, quando podemos notar um desvio nos modo vibracional de C8=O7, acompanhado num desvio no modo de vibração da “respiração” do anel aromático. Neste contexto, a mudança de absorção nos espectros no FT-IR podem ser correlacionados com a degradação do fármaco.

5.2 Caracterizações da nanopartícula de ouro

Devido suas propriedades físicas e químicas únicas, as nanopartículas de ouro apresentam grande potencial quando associadas aos tratamentos convencionais como a quimioterapia a base de TMZ e a radioterapia.

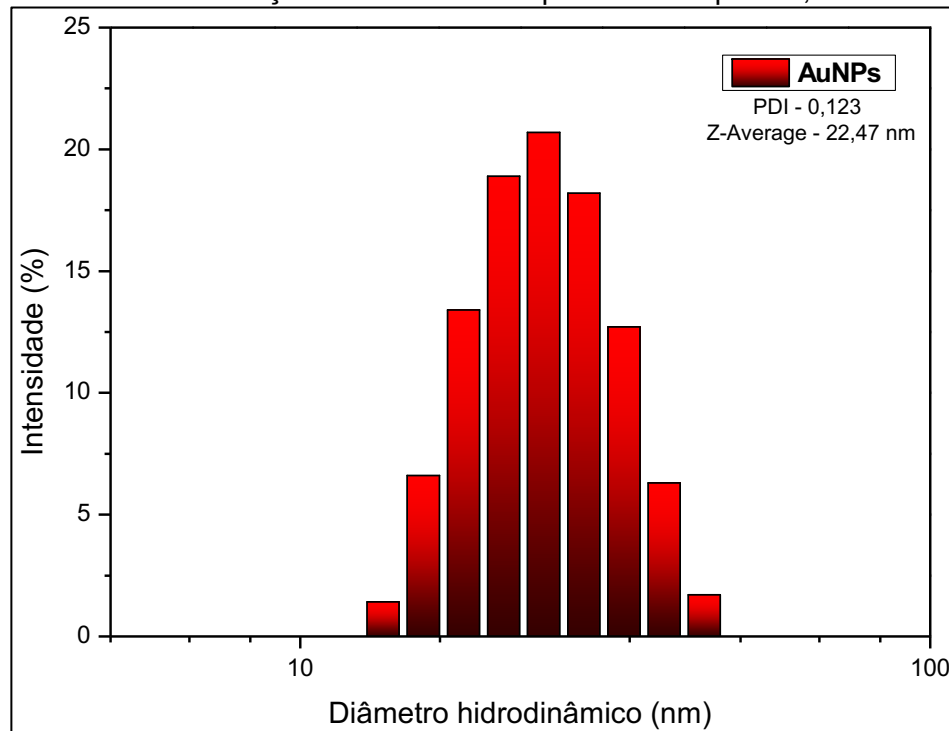
O espectro no UV-visível da solução coloidal de AuNPs é apresentado na Figura 16. A coloração vermelha é típica desta solução coloidal bem como a banda de ressonância plasmônica centrada em 523 nm, compatível com os resultados da literatura (BAPTISTA *et al*, 2008).

Figura 16: Espectro UV visível da solução de AuNPs.

Fonte: A autora, 2020

Os resultados de DLS apresentam a distribuição de diâmetro hidrodinâmico das AuNPs, o gráfico de barra mostra a intensidade do espalhamento em função da distribuição de nanopartículas, com valor médio de 22, 47 nm. Estudos demonstram que as nanopartículas de 15 a 55nm apresentam a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, o que em um fármaco associado possibilitaria uma rápida absorção pelo SNC e maior biodisponibilidade do medicamento, com possibilidade de redução de doses e, conseqüentemente, da toxicidade (SONAVANE; TOMODA; MAKINO, 2008).

Figura 17: Gráfico da distribuição do tamanho das partículas dispersas, como sintetizadas.



Fonte: A autora, 2020

O valor do potencial Zeta da solução coloidal foi medido, sendo igual a $-39,2 \pm 2$ mV. O que demonstra estabilidade da solução coloidal para as nanopartículas sintetizadas, pois elevados valores de potencial Zeta, acima de 30mV, positivos ou negativos, sugerem soluções com nanopartículas mais estáveis, uma vez que a repulsão interpartícula previne a aglomeração (EVERTT, 1989). O potencial Zeta indica as alterações que ocorrem na superfície das partículas, como alterações na força de repulsão interpartícula, refletindo o potencial elétrico influenciado por alterações ocorridas na superfície das partículas com o meio que se encontra. No caso da solução coloidal sintetizada o potencial Zeta negativo está relacionado ao recobrimento com citrato de sódio (com o anion citrato).

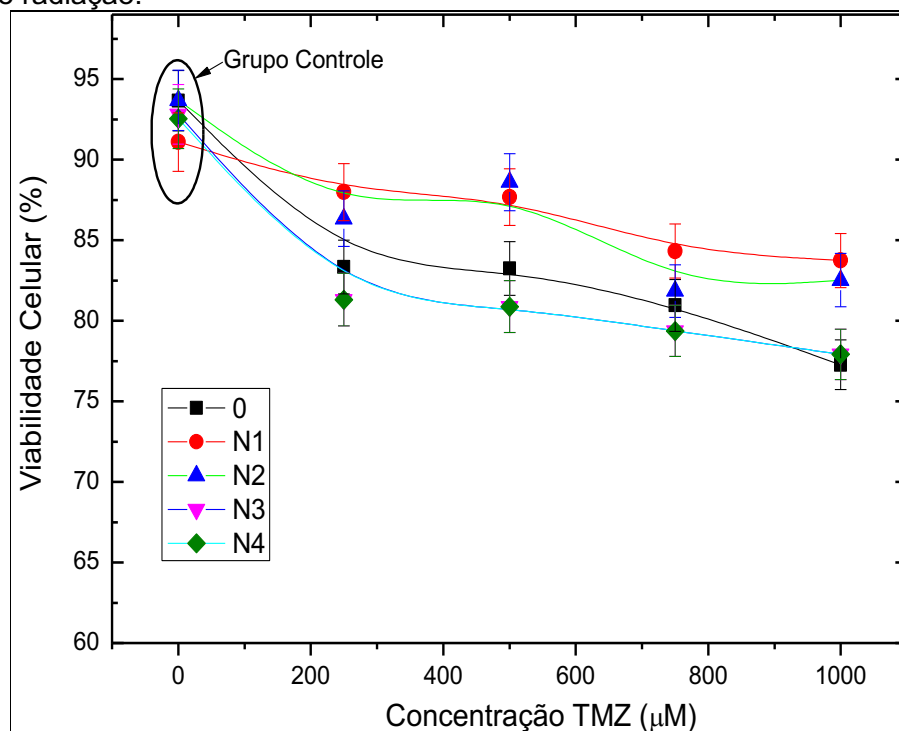
5.3 Avaliações da Viabilidade Celular

Com o intuito de avaliar a influência do TMZ associado às AuNPs em cultura celular, na melhor condição possível de aplicação, optamos por não utilizar antibióticos/antifúngicos na cultura celular da linhagem M059J, o que exigiu muita dedicação durante as manipulações das culturas celulares. Nos experimentos foram realizadas exposições das células do GBM, linhagem M059J, com nano partículas de

ouros nas concentrações de 0 (grupo controle), 10^6 (N1), 10^8 (N2), 10^9 (N3), 10^{10} (N4), partículas/ml, isoladas ou combinadas com TMZ nas concentrações de 0 (grupo controle), 250 μ m, 500 μ m, 750 μ m e 1000 μ m.

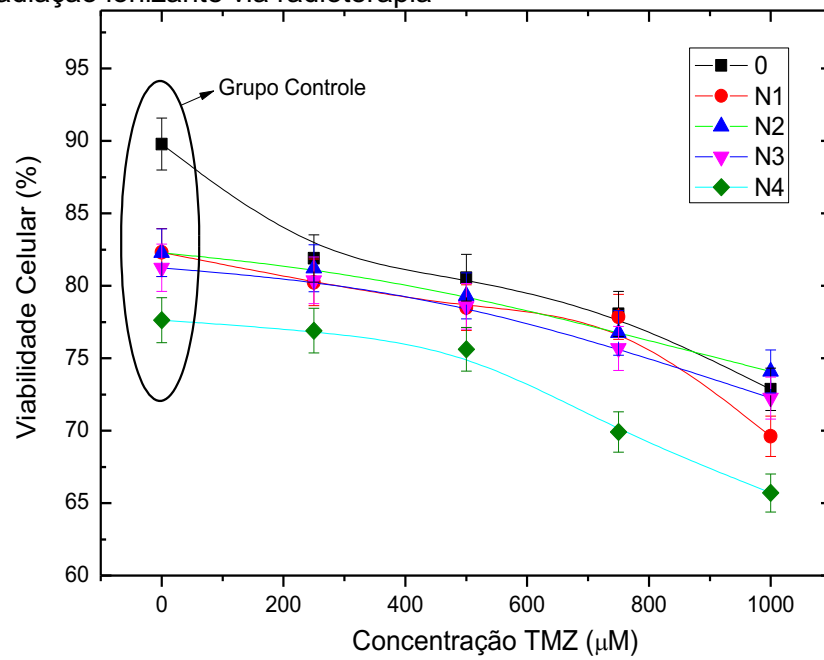
Os resultados da viabilidade celular são apresentados nas Figuras 18, 19 e 20 referentes ao grupo não irradiado, ao grupo que recebeu irradiação com radioterapia e ao grupo que recebeu irradiação com tomografia, respectivamente.

Figura 18: Análise da viabilidade celular com TMZ associado às Nano partículas de ouro na ausência de radiação.



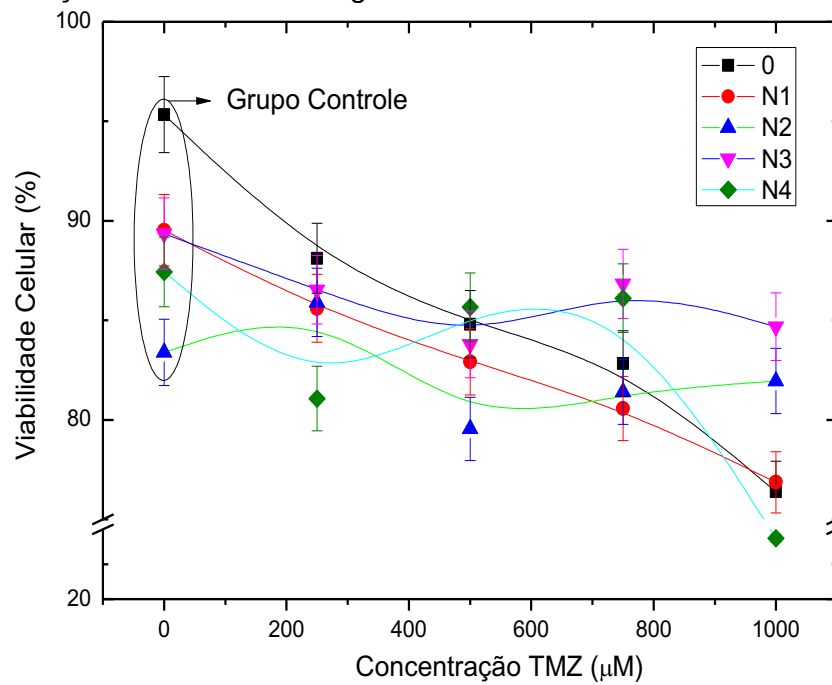
Fonte: A autora, 2020.

Figura 19: Análise da viabilidade celular com TMZ associado a nano partículas de ouro na presença de radiação ionizante via radioterapia



Fonte: A autora, 2020

Figura 20: Análise da viabilidade celular com TMZ associado a nano partículas de ouro na presença de radiação ionizante via tomografia.



Fonte: A autora, 202

Para os experimentos na ausência de irradiação ionizante, após a análise da viabilidade das células com tratamento à base de TMZ e AuNPs, foi possível verificar que quanto maior a concentração de TMZ maior foi a morte celular, chegando a 75% de viabilidade em 48h de exposição. A exposição a concentrações crescentes de AuNPs não se mostrou efetiva para redução da viabilidade celular, tanto que a ausência de nano partículas e com a maior concentração de nano partículas a TMZ mostrou a mesma taxa de viabilidade celular após 48h de exposição demonstrando ausência de efeito sinérgico entre as AuNPs e a TMZ sem uso de irradiação.

Como demonstrado previamente, o mecanismo de ação da TMZ se relaciona a dano do DNA e morte celular por apoptose, para que isto ocorra se faz necessário que a avaliação ocorra depois de transcorrido período suficiente para a morte por apoptose, sendo uma média de aproximadamente 24 dias para o modelo *in vivo*, justificando os ciclos de 21 a 28 dias entre as quimioterapias. Ademais, tanto a quimioterapia quanto a radioterapia são efetuadas em ciclos, visto que apresentam maior ação durante a replicação celular e no referido estudo fizemos dose única, do quimioterápico isolado neste experimento, o que pode justificar morte celular máxima de 75%.

No entanto, após exposição celular a radioterapia, com as mesmas concentrações de TMZ e nano partículas, observou-se morte celular crescente não só com o aumento das concentrações de TMZ, como também com o aumento das concentrações da nano partículas, com viabilidade celular 10% maior quando comparada a exposição N4, T4 sem irradiação e N4, T4 com irradiação, por exemplo. A associação de nano partículas de ouro com TMZ, já se mostrava promissora nos estudos com células tronco de glioma após irradiação, sendo estas células uma das responsáveis pela baixa efetividade do tratamento, tendo em vista sua resistência ao fármaco quando utilizada de maneira isolada, mas apesar de utilizarmos outra metodologia e linhagem celular diferente obtivemos resultados semelhantes (ORZA *et al*, 2013).

Estudos recentes demonstram que as nano partículas de ouro aumentam os danos tumorais após a aplicação de radiação. Desta maneira, seria possível maior dano celular e morte tumoral com menor dose de radiação, com redução de danos as células normais no entorno do tumor, ou seja, aumentaria a sensibilidade e a

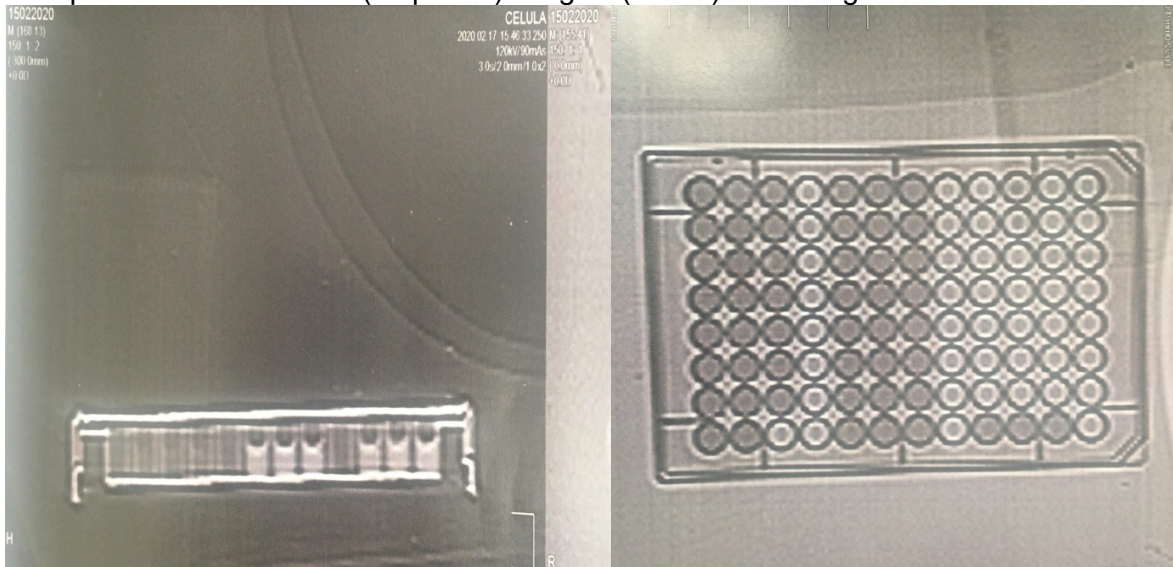
especificidade do tratamento com radiação, com menores efeitos adversos (HAINFIELD *et al*, 2008).

O aumento da resposta a radioterapia com a associação da TMZ e das AuNPs, representam não só uma possibilidade da potencialização do tratamento como também apresenta um potencial de redução da dose de TMZ a ser utilizada, o que representaria um menor risco de toxicidade e uma potencial redução dos custos do tratamento, tendo em vista o valor reduzido das AuNPs, quando comparado com o custo do TMZ.

As nano partículas de ouro também têm demonstrado alta sensibilidade no rastreamento celular não invasivo, quantitativo em células tumorais, com tomografia, melhorando o diagnóstico sem alterar a eficácia terapêutica (MEIR; POPOVTZER, 2018). Sabendo que as nano partículas de ouro aumentam a sensibilidade diagnóstica, que o TMZ aumenta a sensibilidade da radiação e apresenta ação citotóxica nas células tumorais de GBM M059J, optou-se por avaliar se a associação de AuNPs e TMZ teria efeito teranóstico. Desta forma, o presente trabalho analisou a possibilidade, não só do diagnóstico, como também da melhora terapêutica com uso de radiação de média voltagem com tomografia.

A análise de viabilidade após exposição à tomografia por sua vez, apresentou resultados conflitantes tanto para relação de concentrações de TMZ, como para as concentrações de AuNPs. No âmbito do diagnóstico, às imagens não permitiram observar as alterações de concentrações de AuNPs, pois apresentam a mesma tonalidade de cinza, como apresentado nas fotos da Figura 21.

Figura 21: Imagem da placa de células irradiadas com diferentes concentrações de TMZ e nanopartículas. Corte axial (esquerda) e sagital (direita) em tomografia.



Fonte: A autora, 2020

No entanto, neste aspecto o trabalho não demonstrou resultados consistentes. A AuNPs não ficou marcada nas imagens realizadas, ou seja, não se mostrou efetiva para o diagnóstico nas placas celulares irradiadas e apresentou incoerências nos resultados relacionados a viabilidade celular. Este resultado pode ser explicado pelo baixo volume celular e concentração de AuNPs, uma vez que os parâmetros etomógrafo foram projetados para seres humanos e grandes volumes, logo a ação diagnóstica não foi evidenciada. Entretanto, acredita-se que para experimentos *in vivo* esta ação possa ser demonstrada, devido aos estudos publicados.

Quanto às inconsistências de viabilidade celular, acredita-se que os resultados possam estar correlacionados com a ação inconstante e não linear da liberação de radiação do tomógrafo. Para um pequeno volume irradiado, o centro de cada poço deveria ser centrado no equipamento, garantindo uma isodose relativamente constante e demonstrar de maneira efetiva a ação da radiação na viabilidade celular. Entretanto, existe uma limitação experimental, pois apenas um poço poderia ser irradiado por vez e são muitos pontos experimentais. Mas assim como o efeito diagnóstico, o efeito terapêutico não pode ser abandonado até a realização de estudos com tomógrafos específicos para irradiação de pequenos volumes (MEIR; POPOVTZER, 2018).

O grande desafio dos radio-oncologistas é alcançar a melhor distribuição de dose de radiação no tecido tumoral para maior controle local, poupando o parênquima cerebral normal. Devido à alta capacidade de absorção de raios-X decorrente vinculado ao número atômico, as AuNP amplifcam os efeitos da radioterapia. Tratamentos com radiação ionizante dependem da deposição de energia ao longo do caminho da radiação incidente para gerar dano celular. Entrando em contato com a matéria biológica, a radiação ionizante acarreta em ionização de componentes intracelulares (ação direta) e/ou age na molécula de água, gerando radicais livres que lesarão indiretamente a célula irradiada. Os fótons de raios-X, interagem com a matéria biológica por meio de interações descritas pelo efeito Compton e/ou efeito Fotoelétrico. O efeito Compton é um fenômeno que explica a interação do fóton de radiação incidente com um elétron do átomo, que provoca ionização e a emissão de outro fóton, de energia menor respeitando o princípio da conservação de energia. Enquanto o efeito fotoelétrico ocorre quando um fóton interage com um átomo que absorve toda a sua energia, sendo retransmitida a um elétron que ejetado de sua orbita. Ambos os efeitos são potencializados com a interação da radiação de alta energia e as nano partículas de ouro (CHAIN *et al*, 2017).

Explorar o aumento da permeabilidade vascular no entorno tumoral, associado ao acúmulo preferencial de AuNPs no tecido tumoral em detrimento do tecido cerebral normal, aumenta o potencial de uso dessa ferramenta para potencializar o efeito da radioterapia, esperando-se uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e uma ampliação do dano do DNA com indução aumentada a morte das células tumorais irradiadas (PINEL *et al*, 2019).

Os resultados corroboraram com a teoria e os estudos prévios e demonstram que as células de GBM M059J foram mais sensíveis a morte com a associação de AuNPs e TMZ após irradiadas em aparelho de radioterapia, com doses habituais da prática clínica, demonstrando potencial futuro para estudos in vivo e aplicabilidade clínica.

6 CONCLUSÕES

A síntese de AuNPs e suas caracterizações por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Espectroscopia UV-visível permitiram corroborar com os estudos prévios de viabilidade do método de síntese utilizado e demonstrar a estabilidade das AuNPs produzidas, sendo promissor seu uso para estudos futuros como nano carreadoras associadas ao TMZ.

A caracterização do fármaco TMZ pela espectroscopia de UV-Visível permitiu estabelecer uma relação linear em concentração de TMZ versus absorvância da banda em 330 nm. A degradação deste fármaco pode ser acompanhada pelas mudanças de absorção nas bandas de 254 nm e 330 nm.

A caracterização da Temozolomida pela espectroscopia de FTIR permitiu correlacionar por mudanças nos modos vibracionais do fármaco degradado em relação ao não degradado.

Na ausência de radiação, o tratamento da linhagem de GBM M059J com a associação de nano partículas de ouro e TMZ não demonstrou sinergia e aumento da morte celular, quando comparado com a exposição a TMZ isolada. Isso corrobora estudos anteriores de ausência de citotoxicidade das AuNPs.

A avaliação do efeito das AuNPs associadas à TMZ em células de GBM linhagem M059J, após irradiação com tomografia, não demonstrou efeito teranóstico, mas houve diminuição da viabilidade celular. No entanto, baseado em questões técnicas relacionadas ao tamanho dos poços irradiados, posicionamento de isocentro e tipo de aparelho, não é possível abandonar esta hipótese e, sugere-se repetir o estudo *in vivo* ou em tomógrafo de microscopia eletrônica.

A avaliação do efeito das AuNPs associadas à TMZ em células de GBM linhagem M059J, após irradiação com radioterapia, demonstrou aumento da eficiência do tratamento com aumento da mortalidade celular e apesar de ainda serem necessários mais estudos comprobatórios *in vitro* e *in vivo*, essa associação mostra-se promissora levando em consideração a ausência de tratamentos efetivos disponíveis e o baixo prognóstico dos portadores de Glioblastoma Multiforme.

REFERÊNCIAS

- ADEBERG, S. *et al.* Treatment of meningioma and glioma with protons and carbon ions. **Radiat Oncol.**, v. 12, n. 1, 2017.
- ALLALUNIS-TURNER, M. J. *et al.*, Isolation of Two Cell Lines from a Human Malignant Glioma Specimen Differing in Sensitivity to Radiation and Chemotherapeutic Drugs. **Radiat. Res.**, v. 134, n. 3, p. 349–354, 1993.
- ARITA, H. *et al.* A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. **Acta Neuropathol Commun.**, v. 4, n. 1, 2016.
- AUTON, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. **Nature**, n. 526, p. 68–74, 2015.
- BAPTISTA, P. *et al.* Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. **Anal Bioanal Chem.**, v. 391, n. 3, p. 943–950, 2008.
- BHAT, S. A.; AHMAD, S. Quantum chemical calculations and analysis of FTIR, FT-Raman and UV-Vis spectra of temozolomide molecule. **J. Mol. Struct.**, v. 1099, p. 453-462, 2015.
- BINDHU, M.R.; UMADEVI, M. Surface plasmon resonance optical sensor and antibacterial activities of biosynthesized silver nanoparticles. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 121, p. 596–604, 2014.
- BOGDANOV JUNIOR, A. A. *et al.* Gold nanoparticles stabilized with MPEG-grafted poly(L-lysine): in vitro and in vivo evaluation of a potential theranostic agent. **Bioconjug Chem.**, v. 26, n. 1, p. 39-50, 2015.
- BONIFÁCIO, L. S. **Processos de agregação e fusão de nanopartículas de ouro: uma abordagem química.** 2006. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- BRADA, MICHAEL. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. **British Journal of Cancer**, v. 84, n. 1, 2001.
- BRUINSMANN, F. A. *et al.* Nasal Drug Delivery of Anticancer Drugs for the Treatment of Glioblastoma: Preclinical and Clinical Trials. **Molecules**, v. 24, n. 23, 2019.
- CABRERA, A. R. *et al.* Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. **PractRadiat Oncol.**, v.6, n. 4, p. 217–225, 2016.
- CHAN, L. *et al.* Cancer-Targeted Selenium Nanoparticles Sensitize Cancer Cells to Continuous γ Radiation to Achieve Synergetic Chemo-Radiotherapy. **Chem Asian J.**, v. 12, n. 23, p. 3053-3060, 2017.

CLINE, B.; DELAHUNTY, I.; XIE, J. Nanoparticles to mediate X-ray-induced photodynamic therapy and Cherenkov radiation photodynamic therapy. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.**, v. 11, n. 2, 2019.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chem Rev.**, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.
DI MARTINO, A. *et al.* Enhancement of temozolomide stability by loading in chitosan-carboxylated polylactide-based nanoparticles. **J Nanopart Res.**, v. 19, n. 2, 2017.

DREHER, K. L. Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 77, n 1, p. 3–5, 2004.

EVERTT, D. H. Basic Principles of Colloidal Science. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 328-329, 1989.

FABIAN, D. *et al.* Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 2, 2019.

FORMICOLA, B. *et al.* A nanomedicine approach for the treatment of glioblastoma multiforme. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, v. 12, 2019.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clin Cancer Res.**, v. 6, n. 7, p. 2585–2597, 2000.

GANESAN, P. *et al.* Recent trends in the development of nanophytobioactive compounds and delivery systems for their possible role in reducing oxidative stress in Parkinson's disease models. **Int J Nanomedicine.**, v. 10, p. 6757–6772, 2015.

GILBERT, M. R. *et al.* Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. **J Clin Oncol.**, v. 31, n. 32, p. 4085–4091, 2013.

GUO, G. *et al.* Ligand-Independent EGFR Signaling. **Cancer Res.**, v. 75, n. 17, p. 3436–3441, 2015.

HAINFELD, J. F.; SLATKIN, D. N.; SMILOWITZ, H. M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. **Physics in Medicine & Biology**, v. 49, n. 18, 2004.

HAINFELD, J. F. *et al.* Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. **J Pharm Pharmacol.**, v. 60, n. 8, p. 977-985, 2008.

HAINFELD, J. F. *et al.* Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. **Nanomedicine**, v. 8, n. 10, p. 1601-1609, 2013.

HEGI, M. E. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N Engl J Med.**, v. 352, n. 10, p. 997–1003, 2005.

HETTIARACHCHI, S. D. *et al.* Triple conjugated carbon dots as a nano-drug delivery model for glioblastoma brain tumors. **Nanoscale**, v. 11, n. 13, p. 6192-6205, 2019.

HUBBARD, R. D.; FIDANZE, S. 7.06 - Alkylating and Platinum Antitumor Compounds, *In*: TAYLOR, John B.; TRIGGLE, David J. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. [s.l.]: Elsevier, 2007. p. 129-148.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JOH, D. Y. *et al.* Selective targeting of brain tumors with gold nanoparticle-induced radiosensitization. **PloS one**, v. 8, n. 4, 2013.

KRISTIANSEN, K. *et al.* Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. **Cancer**, v. 47, n. 4, p. 649–652, 1981.

LINK, S.; BURDA, C. Electron dynamics in gold and gold–silver alloy nanoparticles: The influence of a nonequilibrium electron distribution and the size dependence of the electron–phonon relaxation. **J. Chem. Phys.**, v. 111, 1999.

LOO, C. *et al.* Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer. **Technol Cancer Res Treat.**, v. 3, n. 1, p. 33–40, 2004.

LUNDQVIST, A. *et al.* 31st Annual Meeting and Associated Programs of the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC 2016): part one: National Harbor, MD, USA. 9-13 November 2016. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 4, suppl. 1, p. 1–106. 2016.

MADHUSUDAN, S.; HICKSON, I. D. DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. **Trends Mol Med.**, v. 11, n. 11, p. 503–511, 2005.

MARANGONI, V. S. **Estudo E Desenvolvimento De Nanocompósitos Contendo Nanopartículas De Ouro Conjugadas Com Biomoléculas: Síntese E Aplicações Em Nanomedicina**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

MARINO, A. *et al.* Multifunctional temozolomide-loaded lipid superparamagnetic nanovectors: dual targeting and disintegration of glioblastoma spheroids by synergic chemotherapy and hyperthermia treatment. **Nanoscale**, v. 11, n. 44, p. 21227-21248, 2019.

MEIR, R.; POPOVTZER, R. Cell tracking using gold nanoparticles and computed tomography imaging. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 10, n. 2, 2018.

MELO JUNIOR, M. A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

MENG, X. *et al.* Dual functionalized brain-targeting nanoinhibitors restrain temozolomide-resistant glioma via attenuating EGFR and MET signaling pathways. **Nature communications**, v. 11, n. 1, 2020.

MENGNAN, Z. *et al.* Schiffelers. **Theranostics**, v. 10, n. 3, p. 1355–1372, 2020.

MILADI, I. *et al.* The in vivo radiosensitizing effect of gold nanoparticles based MRI contrast agents. **Small**, v. 10, n. 6, p. 1116-1124, 2014.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **FASEB J.**, v. 19, n. 3, p. 311–330, 2005.

MSD. **Ficha de informação de segurança de produto químico – FISPQ.**

Temozolomide Injection Formulation. Disponível em:

https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/hh-sds/Temozolomide%20Injection%20Formulation_HH_BR_PT.pdf. Acesso em: 2 maio 2020.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. **Adv Colloid Interface Sci.**, v. 169, n. 2, p. 59–79, 2011.

OHGAKI, H. *et al.* Epidemiology of brain tumors. **Methods Mol Biol.**, n. 472, p. 323–342, 2009.

OLIVEIRA, V. *et al.* Nanotubos de carbono aplicados às neurociências: perspectivas e desafios. **Rev. psiquiatr. clín.**, v. 38, n. 5, p. 201-206, 2011.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **JAMA**, v. 310, n. 17, p. 1842–1850, 2013.

ORTIZ, R. *et al.* Nanoformulations for glioblastoma multiforme: a new hope for treatment. **Future medicinal chemistry**, 11, n. 18, p. 2461-2482, 2019.

ORZA, A. *et al.* Reversing chemoresistance of malignant glioma stem cells using gold nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 689-702, 2013.

OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. **Neuro-oncology**, v. 19, n. suppl. 5, p. v1-v88, 2017.

OSTROM, Q. T. *et al.* Epidemiology of Intracranial Gliomas. **Prog Neurol Surg.**, n. 30, p. 1–11, 2018.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **Eur J PharmBiopharm.**, n. 93, p. 52–79, 2015.

PEREIRA, MAGNUS KALDIEFF. Ressonância de Plasmon de superfície localizado e espalhamento Raman em soluções coloidais de ouro. 2009. Dissertação (Mestrado em física) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing review. **Anal Chim Acta.**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011.

PINEL, S. *et al.* Approaches to physical stimulation of metallic nanoparticles for glioblastoma treatment. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 138, p. 344–357, 2019.

PISSUWAN, D. *et al.* Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. **Trends Biotechnol.**, v. 28, n. 4, p. 207–213, 2010.

POUCHIEU, C. *et al.* Increasing incidence of central nervous system (CNS) tumors (2000-2012): findings from a population based registry in Gironde (France). **BMC Cancer.**, v. 18, n. 1, 2018.

PRABU, S. *et al.* Preparation and characterization of host-guest system between inosine and β -cyclodextrin through inclusion mode. **Spectrochim Acta A Mol BiomolSpectrosc.**, v. 147, p. 151–157, 2015.

ROA, W. *et al.* International Atomic Energy Agency Randomized Phase III Study of Radiation Therapy in Elderly and/or Frail Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme. **J Clin Oncol.**, v. 33, n. 35, p. 4145–4150, 2015.

SAWAYA, R. *et al.* Neurosurgical outcomes in a modern series of 400 craniotomies for treatment of parenchymal tumors. **Neurosurgery**, v. 42, n. 5, p. 1044–1056, 1998.

SCHAUE, D.; MCBRIDE, W. H. **Opportunities** and challenges of radiotherapy for treating cancer. **Nat Rev Clin Oncol.**, v. 12, n. 9, p. 527–540, 2015.

SHAPIRA-FURMAN, T. *et al.* Biodegradable wafers releasing Temozolomide and Carmustine for the treatment of brain cancer. **J Control Release**, n. 295, p. 93–101, 2019.

SKOOG, H. *et al.* **Principles of Instrumental Analysis** 6th. ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007. p. 169–173.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; MAKINO, K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. **Colloids Surf B Biointerfaces.**, v. 66, n. 2, p. 274-280, 2008.

STURM, D. *et al.* Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. **Cancer Cell.**, v. 22, n. 4, p. 425–437, 2012.

STUPP, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncol.**, v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009.

TANNER, K.; DEBORAH, A. Approaches to cell biology teaching: a primer on standards. **Cell biology education**, v. 1, p. 95-100, 2002.

TEMODAR LABEL, 2011. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/021029s020,022277s004lbl.pdf. Acesso em: 20 set. 2019.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin.**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TURKEVICH, J. *et al.* A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discuss. Faraday Soc.**, v. 11, p. 55-75, 1951.

TURKEVICH, J. Colloidal gold. Part I. **Gold Bull**, v. 18, p. 86–91, 1985.

YIN, W. *et al.* Expression Profile Analysis Identifies a Novel Five-Gene Signature to Improve Prognosis Prediction of Glioblastoma. **Front Genet**, v.10, 2019.

YAN, H. *et al.* IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med.**, v. 360, n. 8, p. 765–773, 2009.