

Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

BÁRBARA LOPES JOVITO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFOLHAS DE ÓXIDO DE GRAFENO CONJUGADAS A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SEU EFEITO EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

BÁRBARA LOPES JOVITO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFOLHAS DE ÓXIDO DE GRAFENO CONJUGADAS A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E AVALIAÇÃO IN VITRO DO SEU EFEITO EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

Dissertação apresentada ao programa de pósgraduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Materiais Nanoestruturados Biocompatíveis.

Orientadora: Prof. Dra. Sônia Nair Báo

Brasília

BÁRBARA LOPES JOVITO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFOLHAS DE ÓXIDO DE GRAFENO CONJUGADAS A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SEU EFEITO EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

Dissertação apresentada ao programa de pósgraduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Biologia Animal.

Aprovada	em:	/	//	/

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sônia Nair Báo (Presidente) Institito de Biologia, Universidade de Brasília

Profa. Dra. Mônica Pereira Garcia (Membro Titular)Institito de Biologia, Universidade de Brasília

Prof. Dr. Fabrício Machado Silva (Membro Titular)Instituto de Química, Universidade de Brasília

Dra. Bruna Cândido Guido (Membro Suplente)Institito de Biologia, Universidade de Brasília

Brasília

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, aos meus pais Ângela e Carlos por sempre acreditarem em mim e por sempre terem incentivado a minha educação e concedido todo o apoio necessário em todas as escolhas que fiz durante a minha trajetória até aqui. À minha avó paterna Maria dos Socorro, por ter me ensinado a nunca desistir quaisquer que sejam os empecilhos que a vida nos coloca no caminho.

Aos meus amigos Marina, Jéssica, Ana Carolina e Pablo por todo o apoio e auxílio que me ofereceram durante essa etapa e por muitas vezes terem sido a minha válvula de escape nos momentos exaustivos e estressantes. Ao meu querido, Flávio, por todas as palavras de apoio e incentivo e por ter estado sempre ao meu lado nos momentos de dificuldade. Sem vocês eu não teria conseguido!

À minha orientadora Sônia Nair Báo pela oportunidade de realizar uma tarefa que nem eu mesma me achava capaz de realizar, por todo o apoio e ensinamentos passados e pela capacidade de conduzir o laboratório e todos que nele atuam com tanto esforço e responsabilidade. A levarei sempre como um exemplo de profissionalismo e liderança.

Ao professor Leonardo Paterno do Instituto de Química da Universidade de Brasília, pela colaboração e por ter me recebido tão bem em seu laboratório, sempre com entusiasmo, aberto para tirar dúvidas e discutir novas ideias, por sempre conseguir quebrar o meu negativismo com seu pensamento otimista e por acreditar no meu trabalho.

À professora Maria José também do Instituto de Química da Universidade de Brasília, pelo seu auxílio e empenho nas tarefas colaborativas realizadas, sempre disposta a responder minhas dúvidas e preocupada em passar seus ensinamentos de forma clara e compreensível.

Ao professor Luciano Paulino da Embrapa e ao professor Paulo Souza do Instituto de Física da Universidade de Brasília pela colaboração na realização desse projeto.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, por sempre estarem dispostos a ajudar e por terem feito dessa jornada uma jornada mais leve e divertida. Ana Luísa, Karen, Diogo, Eloisio, Fabíola, Laís, Melissa, Márcia, Guilherme e Ana Brígida, tenho um carinho muito especial por todos vocês.

À Bruna Guido, que acompanhou de perto a realização de muitos experimentos, sempre disposta a discutir resultados e dar opiniões e por ter me ensinado a confiar mais em mim mesma e na minha capacidade. À Ingrid Gracielle por sempre ter me auxiliado no que

fosse necessário e resolver qualquer que fosse o problema! A Mayara Simonelly que mesmo não estando mais no laboratório sempre esteve presente para prestar auxílio necessário.

A todos do Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanoestruturas (LabPolN), onde passei grande parte do tempo e realizei os primeiros passos desse projeto. Ao Alan, Marcos, Ítalo e Priscila, deixo o meu muito obrigado pela paciência, pelos ensinamentos e por terem me recebido tão cordialmente.

Agradeço também à Central Analítica do Instituo de Química e aos laboratórios Cnano do Instituto de Física, LIMI do Instito de Biologia e LTMAC da Faculdade de Saúde pelo uso de alguns equipamentos.

Por fim, agradeço ao Programa de pós-graduação em Biologia Animal, CNPq, CAPES, FINEP e FAPDF pelos auxílios concedidos para a realização desse projeto. À Universidade de Brasília, que levarei sempre com muito orgulho em minha trajetória.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

(Albert Einstein)

RESUMO

Glioblastoma é considerado um astrocitoma de grau IV e é o tipo mais agressivo e frequente dentre os gliomas. O tratamento da doença inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia, porém, confere um prognóstico ruim da doença. O rápido desenvolvimento de mecanismos de resistência, a ocorrência de muitos efeitos adversos e a presença da barreira hematoencefálica (BHE), são fatores que prejudicam o alcance de um bom resultado quimioterápico. Uma alternativa para contornar tais problemas e melhorar o direcionamento de moléculas para o tecido tumoral é o uso de nanocarreadores. Dentre os diversos tipos de nanocarreadores disponíveis, o grafeno tem ganhado atenção devido, principalmente, a sua capacidade de se ligar à moléculas por ligações covalentes ou eletrostáticas, alta eficiência de carreamento de fármacos, possível mecanismo de entrega de fármacos pH-responsivo e efeitos fototérmicos. As nanopartículas de óxido de zinco (np-ZnO) se destacam por apresentarem atividade anticancerígena e seletividade por diferentes linhagens tumorais, incluindo glioma. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de óxido de grafeno conjugadas com nanopartículas de óxido de zinco e avaliar o efeito sinérgico (quimioterápico e fototérmico) da formulação em linhagens U87MG e U138MG de glioblastoma humano e em linhagem não tumoral HNTMC. A síntese partiu de uma primeira etapa de carboxilação do grafeno (OG-COOH), seguida da síntese in situ das np-ZnO da plataforma (OG-ZnO) e posterioramente da incorporação do polímero pluronic PF127 em ambas as formulações (OG-COOH-P e OG-ZnO-P). A síntese do nanocompósito foi confirmada por espectroscopia do infravermelho (IV), onde foi possível observar um deslocamento de +31 cm⁻¹ no estiramento Zn-O de ZnO (441,7 cm⁻¹) para OG-ZnO (472 cm⁻¹) e também por imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV), onde foi possível observar a presença de np-ZnO ancoradas à nanofolhas de grafeno. A adição do pluronic melhorou a estabilidade das formulações em água deionizada e meio de cultivo e também sob condições de cultivo celular. Os ensaios de viabilidade mostraram que os tratamentos com OG-ZnO-P e np-ZnO apresentaram seletividade para as linhagens tumorais. O tratamento com OG-ZnO-P foi capaz de reduzir, ao máximo, em 50% a viabilidade de HNTMC na concentração de 300 $\mu g.mL^{-1}$ em 72 h, ao passo que na linhagem U87MG essa redução foi de 87% e na linhagem U138MG de 65%, sendo que a linhagem U87MG conseguiu a mesma redução de 50% com 100 μg.mL⁻¹ no mesmo tempo. O tratamento com np-ZnO na concentração de 65,75 μg.mL⁻¹

reduziu a viabilidade em 90% da linhagem U87MG e em 47% da linhagem U138MG em 48 h e 72 h de tratamento, enquanto a redução da viabilidade de HNTMC só foi estatisticamente significativa apenas em maiores concentrações. As linhagens U87MG e HNTMC se mostraram mais sensíveis ao tratamento com OG-COOH-P, tendo uma redução estatísticamente significativa da viabilidade a partir de 24 h, ao passo que a linhagem U138MG só obteve tal redução com 72 h de tratamento. Nenhum aumento da citotoxicidade foi observado após fototermia. Os tratamentos foram capazes de causar alterações morfológicas na seguinte ordem OG-COOH-P < OG-ZnO-P < np-ZnO em todas as linhagens. Imagens obtidas por MEV revelaram que o tratamento com OG-ZnO-P foi capaz de induzir alterações nos prolongamentos de adesão e rugosidade da membrana celular das linhagens tumorais. Imagens obtidas por MET após 3 h de tratamento com OG-ZnO-P na linhagem U87MG mostraram sua internalização por meio de vesículas. Por citometria de fluxo, verificou-se que as formulações OG-ZnO-P e np-ZnO induziram expressivamente morte celular por apoptose tardia.

Palavras-chaves: Glioblastoma. Gliomas. Câncer do sistema nervoso central. Nanocarreadores. Nanopartículas. Óxido de grafeno. Óxido de zinco.

ABSTRACT

Glioblastoma is considered a grade IV astrocytoma and is the most aggressive and frequent type of glioma. The treatment includes surgery, radiotherapy and chemotherapy, but results in a poor prognosis. The rapid development of resistance mechanisms, the occurrence of several adverse side effects and the presence of the blood-brain barrier (BBB), are factors that interfere in a good result of chemotherapy. An alternative to overpress these problems and improve the targeting of molecules to the tumor tissue is the use of nanocarriers. Among the different types of nanocarriers, graphene oxide has acquired attention, mainly due to its capacity to connect molecules by covalent or electrostatic bonds, high drug delivery efficiency, possible pH-responsive drug delivery mechanism and photothermal effects. Zinc oxide nanoparticles (np-ZnO) has demonstrated anti-cancer activity and selectivity for different tumor cell lines, including glioma. The present work aimed to synthesize and characterize graphene oxide nanosheets conjugated to zinc oxide nanoparticles and to evaluate its synergistic effect (chemotherapeutic and photothermal) against human glioblastoma cell lines U87MG and U138MG and non-tumor cell line HNTMC. The synthesis started from a graphene carboxylation first step (OG-COOH), followed by the in situ synthesis of np-ZnO on the platform (OG-ZnO) and then on the incorporation of the pluronic polymer PF127 in both formulations (OG-COOH- P and OG-ZnO-P). The synthesis of the nanocomposite was confirmed by infrared spectroscopy (IR), in wich was possible to see a displacement of +31 cm⁻¹ in Zn-O stretch from ZnO (441,7 cm⁻¹) to OG-ZnO (472 cm⁻¹) and also by transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) images, wich it was possible to see the presence of np-ZnO anchored in graphene nanosheets. The incorporation of pluronic improved the stability of the formulations in deionized water and culture medium and also under cell culture conditions. The viability assays shown that OG-ZnO-P and np-ZnO demonstrated selectivity for tumors cell lines. OG-ZnO-P treatment was able to reduce, to the maximum, 50% of the viability of HNTMC in the concentration of 300 µg.mL⁻¹ in 72h. whereas in the U87MG cell line this reduction was 87% and 65% in U138MG cell line, furthermore the U87MG cell line achieved the same 50% reduction with 100 µg.mL⁻¹ at the same time. np-ZnO treatment at a concentration of 65.75 µg.mL⁻¹ reduces viability in 90% on U87MG cell line and in 47% on U138MG cell line in 48 h and 72 h of treatment, while the reduction of viability of HNTMC was statistically significant only in the highest concentrations used. U87MG and HNTMC cell lines were more sensitive to OG-COOH-P

treatment showing a statistically significant reduction in cell viability after 24 h, while the U138MG cell line only shown a reduction with 72 h of treatment. No increase in cytotoxicity was observed after photothermia. The formulations were able to cause morphological changes in the following order OG-COOH-P <OG-ZnO-P <np-ZnO in all cell lines. SEM images revealed that treatment with OG-ZnO-P was able to induce changes in the adherence and robustness of cell membrane in tumor cell lines. Transmission electron microscopy images obtained after 3 h of treatment with OG ZnO-P in U87MG cell line showed its internalization through vesicles. The formulations OG-ZnO-P and np-ZnO induced apoptosis cell death in tumor cell lines, verified by flow citometry.

Keywords: Glioblastoma. Gliomas. Cancer of the central nervous system. Nanocarriers. Nanoparticles. Graphene oxide. Zinc oxide.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Origem e características do câncer	18
Figura 2 Incidência e mortalidade de câncer do sistema nervoso central	20
Figura 3 Incidência do câncer no Brasil	20
Figura 4 Células da glia	21
Figura 5 Classificação histológica dos gliomas	22
Figura 6 Incidência de glioblastoma entre os tumores cerebrais primários	23
Figura 7 Estrutura do óxido de grafeno	28
Figura 8 Janela biológica presente no espectro do infravermelho próximo	30
Figura 9 Delineamento experimental	35
Figura 10 Fotografia digital do sistema utilizado na realização dos ensaios de fototern	nia40
Figura 11 Análise termogravimétrica das amostras OG-COOH, OG-ZnO e np-ZnO	46
Figura 12 Espectros FTIR ATR das amostras OG, OG-COOH, OG-ZnO e np- ZnO	51
Figura 13 Espectros RAMAN das amostras OG, OG-COOH e OG-ZnO	52
Figura 14 Espectros UV-Vis das amostras OG, OG-COOH, OG-COOH-P, OG-Zr ZnO- P e np-ZnO	
Figura 15 Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de OG-COOH ZnO	
Figura 16 Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de OG-COOH, OG-Zr ZnO	_
Figura 17 Composição elementar química das amostras por EDS	55
Figura 18 Imagens de OG, OG-COOH e OG-ZnO obtidas por microscopia o atômica.	_
Figura 19 Gráficos de distribuição de frequência da altura média dos dados obti	idos por

Figura 20 Estabilidade das formulações OG-ZnO, OG-ZnO-P, OG-COOH, OG-COOH-P enp-ZnO em diferentes meios
Figura 21 Estabilidade das formulações OG-ZnO, OG-ZnO-P, OG-COOH e OG-COOH-F sob condições ambientais de cultivo celular
Figura 22 Avaliação da estabilidade coloidal das formulações OG-COOH-P e OG-ZnO-P61
Figura 23 Avaliação da estabilidade da formulação OG-ZnO-P em diferentes valores de pH
Figura 24 Avaliação da fototermia mediada por OG-COOH
Figura 25 Avaliação da viabilidade celular da linhagem U87MG
Figura 26 Avaliação da viabilidade celular da linhagem U138MG67
Figura 27 Avaliação da viabilidade celular da linhagem HNTMC
Figura 28 Avaliação da viabilidade celular das linhagens U87MG, U138MG e HNTMC após tratamento por fototermia
Figura 29 Avaliação morfológica da linhagem U87MG por microscopia óptica
Figura 30 Avaliação morfológica da linhagem U138MG por microscopia óptica
Figura 31 Avaliação morfológica da linhagem HNTMC por microscopia óptica
Figura 32 Avaliação morfológica de superfície por microscopia eletrônica de varredaura
Figura 33 Avaliação da internalização celular de OG-ZnO P por microscopia eletrônica de transmissão
Figura 34 Avaliação da via de morte celular induzida por OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO nas linhagens U87MG e U138MG81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Dados de análise termogravimérica das amostras OG, OG-COOH e OG-ZnO47
Tabela 2 Dados de diâmetro hidrodinâmico (DH), Índice de Polidispersão (IPd), PotênciaZeta (PZ) e pH das formulações OG, OG-COOH, OG-ZnO, OG-COOH-P e OG-ZnO-P
Tabela 3 Concentração inibitória de 50% das formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO para a linhagem U87MG nos tempos de 24h, 48h e 72h70
Tabela 4 Concentração inibitória de 50% das formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO para a linhagem U138MG nos tempos de 24h, 48h e 72h70
Tabela 5 Concentração inibitória de 50% das formulações OG-ZnO-P OG-COOH-P e np-ZnO para a linhagem HNTMC nos tempos de 24h, 48h e 72h71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3T3-L1 Linhagem celular de adipócitos de camundongo

Anexina V-FITC/Anexina V Anexina V conjugada com isotiocianato de

fluoresceína

BCNU Carmustina

BHE Barreira hematoencefálica

BVZ Bevacizumabe

C2C12 Linhagem celular de mioblastoma

CCNU Lomustina

CDKN2A Gene inibidor de cinase dependente de ciclina 2A

CDKN2A Gene que codifica a proteína polipose coli

adenomatosa

DH Diâmetro hidrodinâmico

DI Água deionizada

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DTG Termogravimetria derivada

Espectroscopia de raios X por dispersão de energia

EUA Estados Unidos da América

FDA Food and Drug Administration

FT-IR ATR Espectroscopia no infravermelho com transformada de

Fourier, no modo de reflectância total atenuada

HEK Linhagem de células embrionárias de rim humano

HeLa Linhagem celular de tumor cervical

HepG2 Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano

hMLH1 Gene que codifica proteína MutL Homolog-1

hMSH2 Gene que codifica proteína de reparo de DNA Msh2

HNTMC Linhagem celular primária de células mesenquimais

extraída de polpa de dente humana

hPMS2 Gene que codifica proteína de reparo de DNA Hpms2

IPd Índice de polidispersão

IVP Infravermelho próximo

KB Linhagem celular de carcinoma epidérmico

LCR Líquido cefalorraquidiano

MET Microscópio eletrônico de transmissão/Microscopia

eletrônica de transmissão

MEV Microscópio eletrônico de varredura/Microscopia

eletrônica de varredura

MFA Microscópio de força atômica/Microscopia de força

atômica

MTT brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazolium

np-ZnO Nanopartículas de óxido de zinco

OG Óxido de grafeno

OG-COOH Óxido de grafeno carboxilado

OG-COOH-P Óxido de grafeno carboxilado conjugado com

Pluronic F127

OG-ZnO Nanofolhas de grafeno conjugadas com

nanopartículas de óxido de zinco

OG-ZnO-P Nanofolhas de grafeno conjugadas com

nanopartículas de óxido de zinco e Pluronic F127

PATCHED Gene que codifica receptor de proteína

transmembrana

PBS Tampão fosfato-salino

PI Iodeto de propídio

PRKARIA Gene que codifica a subunidade reguladora de

proteína quinase tipo I-alfa dependente de AMPc

PZ Potencial zeta

SFB Soro fetal bovino

siRNA Pequeno RNA de interferência

SNC Sistema nervoso central

T98G Linhagem celular de glioblastoma humano

TFD Terapia fotodinâmica

TFT Terapia fototérmica

TG Termogravimetria/Termogravimétrica

TMZ Temozolamida

TP53 Gene que codifica a proteína p53

TSC 2 Gene que codifica tuberina

TSC1 Gene que codifica hemartina

U138MG Linhagem celular de gliobalstoma humano

U87MG Linhagem celular de gliobalstoma humano

UV-Vis Ultravioleta visível

VHL Gene da síndrome Von Hippel-Lindau

ZnO Óxido de zinco

SUMÁRIO

1.	REVISAO DA LITERATURA	16
	1.1. Câncer	16
	1.2. Câncer do Sistema Nervoso Central	19
	1.3. Glioblastoma	21
	1.4. Nanocarreadores no tratamento contra o câncer	26
	1.5. Óxido de grafeno e terapia fototérmica	27
	1.6. Óxido de zinco	31
2.	JUSTIFICATIVA	33
3.	OBJETIVOS	34
	3.1. Objetivo geral	34
	3.2. Objetivos específicos	34
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
	4.1. Delineamento experimental	35
	4.2. Obtenção de óxido de grafeno carboxilado	35
	4.3. Obtenção de nanofolhas de óxido de grafeno conjugadas com nanopartículas de óx de zinco	
	4.4. Conjugação com Pluronic F127	36
	4.5. Obtenção de nanopartículas de óxido de zinco	37
	4.6. Caracterização físico-química das formulações	37
	4.7. Caracterização morfológica das formulações	38
	4.8. Estudo da estabilidade das formulações	39
	4.9. Avaliação da fototermia mediada por OG-COOH	39
	4.10 Cultura e manutenção das células	41
	4.11 Ensaio de viabilidade celular	41
	4.12 Avaliação de alterações morfológicas e internalização celular	42
	4.13 Avaliação da via de morte celular	43
	4.14 Cálculo do IC50	44
	4.15 Análise estatística	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
	5.1. Caracterização físico-química das formulações	45
	5.2. Caracterização morfológica das formulações	54
	5.3. Estabilidade das formulações	58
	5.4. Fototermia mediada por OG-COOH	62

	5.5. Viabilidade celular	. 64
	5.6. Alterações morfológicas e internalização celular	.72
	5.7. Análise de via de morte celular	. 79
6.	CONCLUSÃO	. 83
7.	PERSPECTIVAS	. 85
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	. 86

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer

O termo *Neoplasia* significa "novo crescimento". Células neoplásicas são ditas *transformadas* porque se replicam de forma descontrolada, sem respeitar as influências regulatórias que controlam o crescimento celular normal, possuindo um certo grau de autonomia (ROBBINS, 2013). No uso médico comum, uma neoplasia é referida como *tumor* e, apenas tumores malignos são denominados de *câncer*. Há quatro características fundamentais pelas quais se podem distinguir tumores benignos e malignos: diferenciação e anaplasia, velocidade de crescimento, invasão local e metástase (ROBBINS, 2013).

A diferenciação celular refere-se à extensão em que as células tumorais se assemelham aos seus antepassados normais morfológica e funcionalmente. Neoplasias benignas são compostas por células bem diferenciadas que se assemelham estreitamente a suas contrapartes normais, enquanto que neoplasias malignas podem apresentar-se desde bem diferenciadas até completamente indiferenciadas (anaplásicas), sendo esta última uma característica de malignidade (ROBBINS, 2013). Em geral tumores benignos crescem lentamente e tumores malignos mais rapidamente, sendo que a taxa de crescimento dos tumores malignos normalmente correlaciona-se inversamente com o seu nível de diferenciação, ou seja, tumores pouco diferenciados tendem a crescer mais rapidamente do que os tumores bem diferenciados (ROBBINS, 2013). A característica mais marcante que diferencia tumores benignos de malignos é que, enquanto neoplasias benignas permanecem localizadas em seu local de origem, os cânceres possuem a capacidade de se espalhar por meio de infiltração, invasão, destruição e penetração do tecido circundante, podendo também estabelecer novos tumores em locais distantes (metástases) quando as células cancerígenas atingem a circulação sanguínea ou linfática (ROBBINS, 2013).

A doença tem origem em uma desordem genética causada por mutações do DNA que podem ser causadas por agentes ambientais, como substâncias químicas, radiação ou vírus, ou pode ser herdada na linhagem germinativa (GREAVES E MALEY, 2012; ROBBINS, 2013). Seu desenvolvimento é visto como um processo complexo composto por várias etapas chamado de *seleção clonal*, proposto inicialmente em 1976 por Peter Nowell e aceito até hoje. O processo se inicia com uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma única célula. Alterações genéticas aleatórias dentro dessas células neoplásicas criam novas

células mutantes e, ocasionalmente, algumas das alterações genéticas conferem uma vantagem seletiva, como crescimento mais rápido, sobrevivência, invasão ou metástase, e os descendentes de células portadoras dessas mutações se tornam consequentemente dominantes. As rodadas sequenciais de diversificação e seleção levam a progressão do tumor a níveis mais altos de malignidade e com uma complexa heterogeneidade de subpopulações com diferentes composições genéticas (NOWELL, 1976; GREAVES E MALEY, 2012; DING et al., 2013).

Um fato importante a ser considerado, é que o próprio tratamento com quimioterapia ou radioterapia, pode alterar os ecossistemas do tecido cancerígeno e criar novas pressões, recursos e oportunidades seletivas, permitindo o surgimento de células cancerígenas variantes preexistentes que conseguiram sobreviver ao tratamento (GREAVES E MALEY, 2012).

Quatro classes de genes reguladores normais (proto-oncogenes promotores de crescimento, genes supressores de tumor inibidores do crescimento, genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e genes envolvidos no reparo do DNA), envolvidos em processos de crescimento, sobrevida e senescência, são os principais alvos do dano genético (ROBBINS, 2013).

O acúmulo de mutações dá origem a uma série de propriedades chamadas características do câncer (HANAHAN E WEINBERG, 2011) (Figura 1), que incluem: (1) Sinalização proliferativa persistente – gerada por estímulo autócrino e parácrino de fatores de crescimento e uma hiper-responsividade de seus receptores e de componentes de sua via de sinalização (HANAHAN E WEINBERG, 2011), (2) Evasão de supressores de crescimento – que envolve a supressão de genes responsáveis por frear a proliferação celular e reconhecer e realizar reparos de danos ao DNA (HANAHAN E WEINBERG, 2011), (3) Resistência à morte celular – causada por um aumento da expressão dos reguladores antiapoptóticos ou dos sinais de sobrevivência e redução dos fatores pró-apoptóticos (HANAHAN E WEINBERG, 2011), (4) Potencial replicativo ilimitado (imortalidade) – devido a presença ativa da enzima telomerase, que substitui sistematicamente segmentos teloméricos, permitindo que as mesmas se proliferem sem fim (HANAHAN E WEINBERG, 2011), (5) Indução de angiogênese – por meio da criação de novos vasos sanguíneos para suprir necessidades de oxigênio e nutrientes, além de também contribuir para o processo de metástase (HANAHAN E WEINBERG, 2011;), (6) Invasividade e metástase – relacionada a capacidade de regular negativamente a expressão de moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz e regular positivamente genes que expressam moléculas de adesão e de migração celular (HANAHAN E WEINBERG, 2011; WELCH E HURST, 2019), (7) Instabilidade genômica e mutabilidade – o que conferem às células cancerígenas alterações genéticas que conduzem à expansão clonal, a progressão tumoral e a aquisição de todas as características aqui mencionadas (HANAHAN E WEINBERG, 2011; GREAVES E MALEY, 2012), (8) Promoção da inflamação – a qual ajuda a recrutar fatores que facilitam o crescimento, a angiogênese, a invasão e a metástase (HANAHAN E WEINBERG, 2011). (9) Desregulação do metabolismo energético – ocasionada por uma maior captura de glicose para suprir as necessidades de um metabolismo super-ativo (HANAHAN E WEINBERG, 2011), (10) Prevenção da destruição imune – que se dá pela desativação de componentes do sistema imunológico ou recrutamento de células inflamatórias imunossupressoras (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

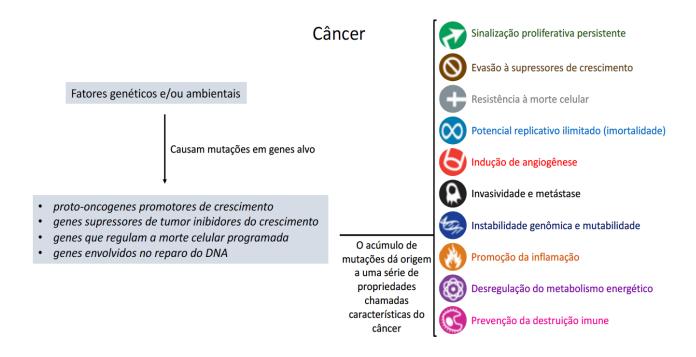


Figura 1 Origem e características do câncer. Esquematização evidenciando como se dá a origem do câncer e suas principais características. Adaptado de HANAHAN E WEINBERG, 2011.

Os números de incidência e mortalidade de câncer vêm aumentando nos últimos anos, o que pode ser influenciado, em parte, devido ao envelhecimento e crescimento da população, sendo que a doença já ocupa a primeira ou a segunda causa de morte em quase 100 países de todo o mundo (BRAY et al., 2018). Os tipos de câncer mais comuns variam entre regiões de todo o mundo, o que pode ser explicado devido as diferentes características sociais, econômicas e estilo de vida de cada população (BRAY et al., 2018). Alguns tipos de câncer se mostram mais incidentes em regiões mais desenvolvidas que em regiões em desenvolvimento,

porém a diferença de mortalidade entre essas duas regiões é menor, devido ao fato de países em desenvolvimento apresentarem uma maior mortalidade em muitos tipos de câncer (BRAY et al., 2018). De uma forma geral, o câncer tem se mostrado uma causa importante de morbimortalidade em todo o mundo independentemente do nível de desenvolvimento humano (BRAY et al., 2018).

1.2 Câncer do Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso central (SNC) engloba o encéfalo (cérebro, tronco cerebral, diencéfalo, cerebelo, hemisférios e sistema ventricular) e a medula espinhal (SURYADEVARA et al., 2018). Tumores que têm sua origem em estruturas anatômicas que compõem o sistema nervoso central são classificados como tumores primários do SNC, já quando se originam pela migração de tumores originários de outros locais para qualquer região do sistema nervoso central são classificados como metastáticos (SURYADEVARA et al., 2018; ABTA, 2018). As maiores taxas de incidência de tumores cerebrais metastáticos têm como origem primária o câncer de pulmão, seguido por câncer de mama, melanoma e carcinoma de células renais (BOLLIG-FISCHER et al., 2013). Tumores primários do sistema nervoso consistem em um grupo bastante heterogêneo de neoplasias, que vão desde tumores benignos tratáveis a tumores bastante agressivos e praticamente incuráveis. Tumores primários malignos tendem a se espalhar pelo cérebro e medula espinhal, mas raramente se espalham para outros órgãos (ABTA, 2018).

No ano de 2018, foram estimados 296.851 mil casos incidentes de câncer do sistema nervoso central em todo o mundo, com morte estimada de 241.037 mil casos (GLOBOCAN, 2020), demonstrando uma alta taxa de letalidade (81,2%), juntamente com canceres de pâncreas (94,2%), fígado (92,9%), esôfago (88,9%) e pulmão (84,1%) (Figura 2).

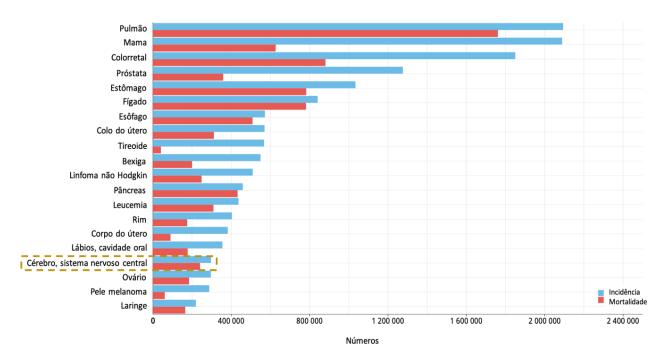
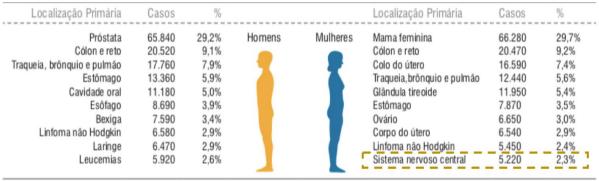


Figura 2 Incidência e mortalidade de câncer do sistema nervoso central. Número estimado de casos incidentes e mortes de 20 tipos de câncer em todo o mundo, no ano de 2018, em ambos os sexos, em todas as idades (entre 0 e 85+ anos). Adaptado de GLOBOCAN, 2020.

Para o Brasil, estimam-se 5.870 novos casos de câncer do sistema nervoso central em homens, ocupando o 11° lugar entre os mais prevalentes e 5.220 em mulheres, ocupando o 10° lugar entres os mais prevalentes para cada ano do triênio 2020-2022 (Figura 3). 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 (INCA, 2019). Em termos de mortalidade, no Brasil, ocorreram, em 2017, 4.795 óbitos em homens, correspondendo ao risco de 4,75/100 mil e 4.401 óbitos em mulheres com risco de 4,25/100 mil (INCA, 2019).



*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3 Incidência do câncer no Brasil. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma, INCA, 2019.

1.3 Glioblastoma

Glioma é um termo genérico para referir-se a tumores originários de células da glia ou células-tronco que desenvolvem características gliais por transformação neoplásica e são os tumores primários mais frequentes do SNC (OSTROM et al., 2014). As células da glia constituem a maioria das células do sistema nervoso e estão envolvidas integralmente no desenvolvimento, manutenção e reparo do tecido neuronal (SURYADEVARA et al., 2018). Três principais tipos celulares compõem a glia: astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias (Figura 4) (SURYADEVARA et al., 2018). Os astrócitos são células altamente ramificadas e constituem o tipo celular mais numeroso e que desempenha o maior número de funções, que incluem: participação na formação da barreira hematoencefálica (BHE), função protetora cicatrizadora em resposta a danos ao SNC e atividades metabólicas essenciais, incluindo metabolismo eletrolítico, regulação de neurotransmissores e armazenamento de energia (SURYADEVARA et al., 2018). Os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização dos axônios dos neurônios do SNC (SURYADEVARA et al., 2018). As células ependimárias dão origem ao plexo coroide, responsável pela produção do líquido cefalorraquidiano (LCR). As células são ligadas umas às outras, formando um epitélio cubóide simples com cílios e microvilos apicais que funcionam para facilitar a circulação do LCR por todo o sistema ventricular (SURYADEVARA et al., 2018).

A micróglia, quarto tipo celular que compõe a glia, constitui as células imunológicas do SNC. São responsáveis por mediar reações inflamatórias, ativar ações contra patógenos externos e substâncias estranhas e de fagocitar detritos celulares resultantes do processo de morte celular normal e também células danificadas. (LULL E BLOCK, 2010; SURYADEVARA et al., 2018). Esse tipo celular não entra na classificação dos gliomas.

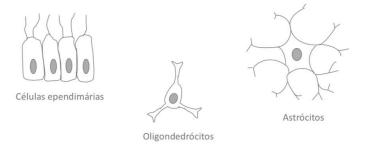


Figura 4 Células da glia. Representação ilustrativa dos três pricipais tipos celulares que compõem a glia: células ependimárias, oligodendrócitos e astrócitos. A micróglia não está representada.

Os gliomas são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de acordo com o tipo celular envolvido em: astrocitoma (astrócitos), oligodendrogliomas (oligodendrócitos), tumores ependimários (células ependimarias), oligoastrocitoma (astrócitos e oligodendrocitos) e tumores neuronais-gliais mistos (quando envolvem também células nervosas). Também são classificados por meio de características histopatológicas, características moleculares e grau de agressividade de I a IV, o qual se refere a taxa de crescimento e invasividade (Figura 5) (PERRY e WESSELING, 2016). Entre os anos de 2012 e 2016, os gliomas representaram aproximadamente 25,5% de todos os tumores primários e outros do SNC e 80,8% dos tumores malignos do total de 39.917 casos analisados nos EUA (OSTROM et al., 2019).

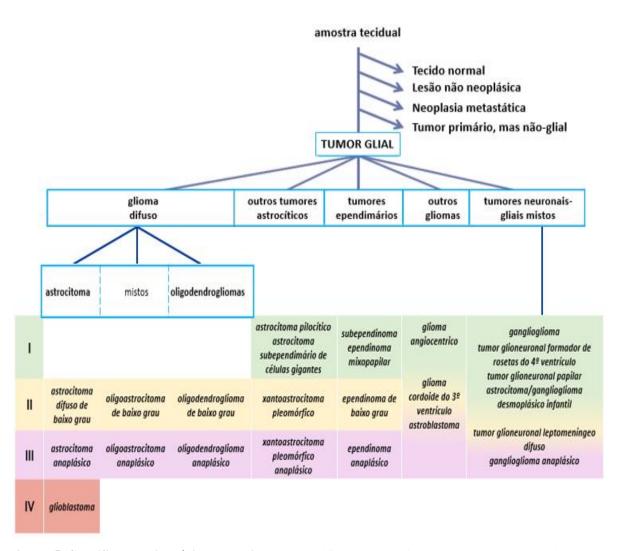


Figura 5 Classificação histológica dos gliomas. Classificação dos gliomas de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de agressividade. Adaptado de PERRY e WESSELING, 2016.

Glioblastoma ou glioblastoma multiforme é considerado um astrocitoma de grau IV e o tipo mais agressivo dentre os gliomas, estando dentro do grupo de gliomas difusos, os quais possuem alta capacidade de se infiltrar nas proximidades do parênquima cerebral normal (ALDAPE et al., 2015, PERRY E WESSELING, 2016). É também o tipo mais frequente, representando 57,3% dos gliomas entre os anos de 2012 a 2016 do total de 39.917 casos analizados nos EUA (Figura 6) (OSTROM et al., 2019). O glioblastoma é caracterizado pela presença de atividade mitótica (o que os diferencia dos atrocitomas de grau I e II), juntamente com a presença de microvasos sanguíneos e de células necróticas (características que o diferenciam do astrocitoma de grau III) (ALDAPE et al., 2015, PERRY E WESSELING, 2016, ABTA, 2018). Pode ainda ser classificado como primário, quando se apresenta sem evidência clínica precursora, ou secundário, quando se desenvolve através da progressão molecular e do grau de malignidade de um glioma de grau inferior ao longo do tempo (ALDAPE et al., 2015).

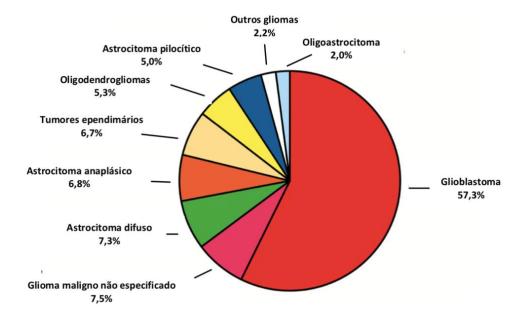


Figura 6 Incidência de glioblastoma entre os tumores cerebrais primários. Relatório estatístico do CBTRUS: tumores primários do cérebro e do sistema nervoso central diagnosticados nos Estados Unidos em 2012–2016. Adaptado de OSTROM et al, 2019.

A etiologia da doença ainda é pouco conhecida e apenas a exposição a altas doses de radiação ionizante foi confirmada como fator de risco até o momento (OSTROM et al., 2014). Algumas síndromes hereditárias incluindo neurofibromatose tipo 1 e 2, schwannomatose, meningioma e meduloblasoma, além de mutações germinativas em vários genes como TSC1/TSC2 (complexo de esclerose tuberosa), VHL (doença de von Hippel-Lindau), TP53 (síndrome de Li-Fraumeni), PATCHED (síndrome de Gorlin), PRKAR1A (complexo de

Carney), CDKN2A (síndrome melanoma-astrocitoma), e APC e os genes de reparo de desemparelhamento hMSH2, hMLH1 e hPMS2 (síndrome de Turcot), parecem representar uma predisposição genética para o desenvolvimento de tumores cerebrais (MELEAN et al, 2004). Nenhuma associação conclusiva foi encontrada entre o desenvolvimento da doença e uso de telefones celulares (INTERPHONE, 2010; OSTROM et al., 2014; CHAPMAN et al., 2016). Diversos estudos evidenciam uma relação inversa entre a presença de condições alérgicas com o risco de desenvolvimento de gliomas, outros estudos também correlacionam esse risco com o uso de anti-histamínicos, porém os dados destes últimos são bastante inconsistentes (LACHANCE et al., 2011; OSTROM et al., 2014; AMIRIAN et al., 2016). Fatores ambientais como tabagismo, exposição a campos magnéticos de baixa frequência, exposição a pesticidas e solventes orgânicos, não possuem evidências conclusivas de associação com o risco de desenvolver a doença (RUDER et al., 2009; LACHANCE et al., 2011; OSTROM et al., 2014; BENKE et al., 2017; PARENT et al., 2017).

O manejo terapêutico inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A ressecção cirúrgica é o primeiro passo na maioria dos casos, porém sua remoção extensa e completa é dificultada devido a localização de alguns tumores em importantes áreas cerebrais, como áreas que controlam a fala, função motora e os sentidos. Além disso, por conta do alto grau de invasividade, as células infiltrantes que são muitas vezes difíceis de ter seus limites detectados por técnicas de imagiamento, não conseguem ser remanejadas e permanecem no tecido circundante, sendo responsáveis pela futura progressão e recorrência da doença, o que acontece com bastante frequência (SARKARIA et al., 2017; PAOLILLO et al., 2018). A radioterapia se baseia no uso de radiação (prótons e nêutrons, raios X ou gama) de alta energia visando parar ou reduzir a proliferação celular e geralmente é aplicada após biópsia ou cirurgia, porém a necrose e edema induzidos pela alta dose de radiação são fortes desvantagens (MENEZES, 2012; PAOLILLO et al., 2018). A quimioterapia é um método adjuvante. Apenas lomustina (CCNU), carmustina (BCNU), temozolomida (TMZ) e bevacizumabe (BVZ) estão aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) no tratamento de tumores cerebrais de alto grau, sendo os três primeiros agentes alquilantes e o quarto um anticorpo monoclonal antiangiogênico (SARKARIA et al., 2017, ABTA, 2018). Porém o rápido desenvolvimento de mecanismos de resistência e ocorrência de muitos efeitos adversos aos agentes alquilantes e o curto tempo de meia vida de BCNU são fatores que conferem baixo resultado ao tratamento (LU et al., 2012; HANIF et al., 2017).

Outros fármacos antineoplásicos que não possuem seu uso aprovado para o tratamento da doença também são utilizados, geralmente como segunda linha de tratamento (HANIF et

al., 2017). Para tentar contornar os problemas de BCNU (curto tempo de meia vida e efeitos adversos), foi desenvolvido o *gliadel wafer*, discos poliméricos biodegradáveis contendo BCNU, os quais são implantados na cavidade tumoral logo após a ressecção cirúrgica do tumor, fornecendo uma liberação controlada de 7,7 mg de BCNU por cerca de 5 dias, porém além de ser um método invasivo possui efeitos adversos como edema cerebral, convulsões, anormalidade cicatrizante, infecção, trombose e hipertensão intracraniana (XING et al., 2015).

A hipertermia é outra estratégia adotada no tratamento de pacientes com glioblastoma e se baseia no aumento da temperatura, geralmente alcançada pelo uso de microondas, irradiação infravermelha e ultrassom. Uma limitação desses sistemas se dá pelo aquecimento não intencional de tecido saudável, porém o uso de nanomateriais tenta resolver esse problema (PAOLILLO et al., 2018).

Outro fator que contribui para a dificuldade do tratamento se dá pela presença da barreira hematoencefálica (BHE), a qual possui uma função protetora e controla o transporte de moléculas entre a circulação sanguínea e o cérebro. A BHE é composta por uma camada de células endoteliais capilares desprovidas de fenestração e conectadas por junções intercelulares apertadas, a qual impede a passagem da maioria das moléculas pela via paracelular, ficando disponíveis como porta de entrada apenas a difusão passiva para moléculas lipofílicas de baixo peso molecular (<500 Da) e as vias de transcitose mediada por adsorção e receptores ou proteínas transportadoras, porém a permeabilidade de diversas moléculas, incluindo muitos fármacos ainda é dificultada pela presença de ptoteínas transportadoras de efluxo (SARKARIA et al., 2017; ARVANITIS et al., 2020; JENA et al., 2020). A BHE também é envolta por uma lâmina basal, que fornece ligantes que ativam diversas vias de sinalização. Pericitos e astrócitos são células que contribuem para a manutenção da lâmina basal, sendo que os pés vasculares dos astrócitos também envolvem as células endoteliais, foramando uma barreira protetora adicional (SARKARIA et al., 2017; ARVANITIS et al., 2020; JENA et al., 2020).

Diversos estudos têm sugerido uma ruptura da integridade da BHE em pacientes com glioblastoma, porém as técnicas de imagiamento disponíveis fornecem apenas uma avaliação qualitativa grosseira e não dizem muito em que grau a BHE é interrompida, o que pode variar de paciente para paciente e em diferentes regiões do tumor (SARKARIA et al., 2017). Os estudos também mostram que há uma heterogeneidade dessa perda de integridade da BHE dentro do microambiante de uma mesma lesão, entre lesões metastáticas e entre diferentes tipos e subtipos de tumor (ARVANITIS et al., 2020). Entretanto, apesar desses achados, a entrega de fármacos permanece sendo dificultada na doença, por exemplo, tumores

metastáticos possuem uma baixa resposta a fármacos que geram boa resposta no tratamento do tumor em seu local de origem, o que sugere que a maioria dos pacientes mantêm uma BHE intacta ou que apesar de ter sua estrutura física alterada, os mecanismos de efluxo de fármacos permanecem viáveis (SARKARIA et al., 2017; ARVANITIS et al., 2020).

1.4 Nanocarreadores

Os termos nanociência e nanotecnologia se referem, respectivamente, ao estudo e manipulação de materiais e ao *design*, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas em escala nanométrica, na qual os materiais podem apresentar propriedades e características físico-químicas e comportamento óptico, elétrico e magnético, diferentes, ausentes ou até mesmo opostas daquelas apresentadas em uma escala maior (THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

Na área biomédica, destaca-se o seu uso como nanocarreadores, onde são acoplados a fármacos com o intuito de melhorar suas características e seletividade. Nesse sentido, o uso de nanocarreadores apresenta algumas vantagens para o tratamento do câncer e doenças do SNC das quais pode-se citar: o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis, proteção dos mesmos contra a degradação enzimática, liberação constante e controlada, reduzindo a dose administrada, facilidade de manipulação e adição de ligantes em sua superfície, reduzindo os efeitos adversos e permitindo que ocorra uma interação a nível molecular com maior especificidade e passagem pela BHE sem interferir em sua integridade (OCHEKPE et al. 2009; MASSERINI, 2013; MIRANDA e FIGUEIRAS, 2014).

Os diferentes tipos de nanocarreadores disponíveis possuem a capacidade de estocar fármacos e de se ligar a diferentes moléculas de acordo com suas características físico-químicas, as quais são definidas e podem ser ajustadas por sua composição, dimensões e diferentes formas. Os nanocarreadores são classificados de acordo com os constituintes de sua composição, dentro os quais encontram-se nanomateriais formulados com uso de polímeros (nanopartículas poliméricas, miscelas poliméricas e dendrimeros), materiais lipídicos (lipossomos e nanopartículas lipídicas sólidas), nanomateriais constituídos por metais (nanopartículas de óxido de ferro e nanopartículas de ouro), nanomateriais constituídos por outros elementos inorgânicos (nanopartículas de sílica) (LOMBARDO et al., 2019), além dos

nanomateriais da família do grafeno (nanotubos de carbono, fulerenos e grafeno) (ZHANG et al., 2016).

A quantidade de nanoestruturas que consegue alcançar a região tumoral é difícil de prever e pode variar de acordo com as propriedades físico-químicas do nanomaterial como tamanho, forma e carga elétrica e depende de características do tumor, como sua localização, conteúdo do estroma e a densidade dos vasos sanguíneos (PERRY et al., 2017), já que alguns tumores se mostram hipervascularizados enquanto outros se mostram hipovascularizados (HANAHAN E WEINBERG, 2011; PERRY et al., 2017), permitindo uma maior ou menor entrega de material, respectivamente.

1.5 Óxido de grafeno e terapia fototérmica

Dentre os diversos tipos de nanocarreadores disponíveis, o grafeno tem ganhado atenção devido sua alta relação superfície/massa (estrutura 2-D), alta possibilidade de modificação, alta eficiência de carreamento de fármacos, possível mecanismo de entrega de fármacos pH-responsivo e efeitos fototérmicos (YANG et al., 2010; 2011). O óxido de grafeno (OG), consiste em uma forma altamente oxidada de grafeno contendo grupos de ácido carboxílico, epóxido e hidroxila (Figura 7), sendo assim muito utilizado em estudos biológicos e como nanocarreador, pois a presença de tais grupos funcionais tornam o material inerentemente hidrofílico, reduzindo a necessidade de solubilização, e proporcionam oportunidade de vincular moléculas funcionais por meio de ligação covalente ou interações eletrostáticas (McCALLION et al., 2016).

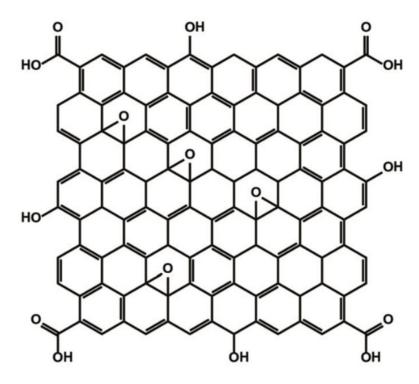


Figura 7 Estrutura do óxido de grafeno. O óxido de grafeno é composto por uma rede plana (2D) de carbonos sp2 com a presença de grupos oxigenados ao longo de sua extenção. Adaptado de DE MELO et al., 2019.

As aplicações do óxido de grafeno no câncer abrangem seu uso no diagnóstico e no tratamento da doença. Para seu uso no diagnóstico podem ser conjugados a moléculas específicas, agindo como biosensores ou detectores para o isolamento de células tumorais ou podem ser conjugados com agentes contrastantes no auxílio de diagnóstico por imagem (ESKIIZMIR et al., 2018). Seu uso no tratamento do câncer pode ser classificado em dois grandes grupos: uso como nanocarredor ou uso como agente fototérmico para terapia fototérmica. Em ambos os casos, pode ou não ser incorporado um ligante que aumente sua especificidade para a região tumoral (direcionamento ativo) e geralmente são empregados compostos que aumentam sua biocompatibilidade e estabilidade em meio fisiológico, como polímeros sintéticos, polissacarídeos naturais, proteínas e fosfolipídeos (SHIM et al., 2016).

Como nanocarreador é principalmente estudado para entrega de fármacos, mas vem sendo bastante estudado para ser utilizado na entrega de DNA ou pequeno RNA de interferência (siRNA) na terapia gênica e pequenos peptídeos ou moléculas que ativam o sistema imune na imunoterapia (ESKIIZMIR et al., 2018 DE MELO et al., 2019). Em revisões realizadas por SHIM et al., (2016) e ESKIIZMIR et al., (2018), são abordados numerosos trabalhos que utilizam grafeno para carreamento de diversos fármacos com ou sem a presença de ligantes para aumentar sua especificidade, testados em diferentes linhagens

celulares, incluindo gliomas. Em três dos estudos envolvendo gliomas, nanofolhas de grafeno conjugadas com um fármaco e um ligante alvo demonstraram uma maior redução da viabilidade celular e um aumento da internalização celular comparados aos fármacos livres *in vitro* (LIU et al., 2013; WANG et al., 2014; ZHOU et al., 2014). Um dos estudos também constatou um maior acúmulo na região tumoral e maior redução do volume tumoral *in vivo* (LIU et al., 2013). Além disso, uma das formulações teve uma liberação do fármaco pH dependente (ZHOU et al., 2014). Em um outro estudo, nanofolhas de grafeno conjugadas a um fármaco sem nenhum ligante alvo registraram os mesmos efeitos observados nos estudos mencionados anteriormente *in vitro* e a formulação foi capaz de aumentar a estabilidade do fármaco utilizado (LU et al., 2012).

A terapia fototérmica (TFT) pode ser entendida como uma extensão da terapia fotodinâmica (TFD) (ESTELRICH E BUSQUETS, 2018). Na TFD um agente fotossensibilizante é exposto a um comprimento de onda específico, o que leva a transmissão de energia para moléculas de oxigênio ao seu redor, gerando espécies reativas de oxigênio, dentre elas o oxigênio singleto, extremamente danoso para o tecido alvo (DOLMANS et al., 2003). A TFT não requer a presença de oxigênio para atuar, seu efeito se dá pela excitação de um agente fototérmico, que após exposição pela radiação gera uma oscilação sincronizada dos elétrons da banda de condução que resulta na produção de calor (MELAMED et al., 2015). Na TFT é preferível o uso de materiais que possuem efeito fototérmico na faixa do infravermelho próximo (IVP), que vai de 650 nm a 1064 nm, pois isso a torna menos prejudicial aos tecidos saudáveis devido a presença de janelas biológicas entre 700 nm a 980 nm e entre 1000 nm a 1400 nm (JAQUE et al., 2014). Janelas biológicas são definidas como regiões do espectro eletromagnético onde a absorção e dispersão da energia pelos tecidos é baixa, tornando-os parcialmente "transparentes", ou seja, quase não sofrem ação da energia emitida (JAQUE et al., 2014). A hemoglobina e a água, componentes abundantes nos tecidos, têm seu menor coeficiente absorção na região em torno de 650-900 nm (Figura 8) (WEISSLEDER, 2001).

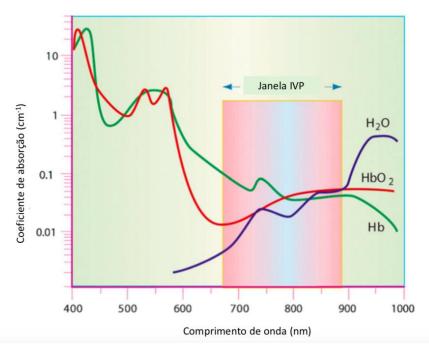


Figura 8 Janela biológica presente no espectro do infravermelho próximo. A imagem mostra a absorção mínima da luz pela hemoglobina (<650 nm) e pela água (>900 nm). IVP: infravermelho próximo. Adapatado de WEISSLEDER, 2001.

As respostas celulares causadas pelo efeito fototérmico dependem da duração da exposição e da magnitude da temperatura atingida, mas em geral incluem desnaturação e coagulação proteica, estresse oxidativo, danos ao DNA, colapso na membrana celular, disfunção da atividade mitocondrial e aumento do fluxo sanguíneo, favorecendo a chegada de agentes citotóxicos ao local e ocasionando migração e ativação de células imunológicas (JAQUE et al., 2014, DE MELO et al., 2019). Além disso, o calor fotoinduzido causa a liberação de agentes já internalizados presentes nos endossomos/lisossomos, bem como promove sua liberação dos nanocarreadores (DE MELO et al., 2019).

O grafeno também pode atuar no combate ao câncer como um agente fototérmico devido sua capacidade de absorver energia no infravermelho próximo (IVP) e transformá-la em calor. Os nanomateriais à base de grafeno podem ser utilizados na terapia fototérmica sozinhos, ou podem ser conjugados a agentes fotossensibilizantes, radionuclídeos, fármacos, genes, oligonucleotideos e até mesmo outros agentes fototérmicos, como por exemplo, nanopartículas de ouro para uma terapia fotodinâmica, radioterapia, quimioterapia, gene terapia ou imunoterapia combinada. Diversos estudos com terapia fototérmica isolada ou combinada utilizando grafeno são encontrados em revisões de ESKIIZMIR et al., 2018 e DE MELO, 2019.

1.6 Óxido de zinco

O zinco é um componente natural e uma parte inerente da natureza, que cumpre importantes funções metabólicas em seres humanos, animais e plantas. A exposição a níveis naturais do zinco na biosfera é essencial para todos os organismos vivos. O óxido de zinco (ZnO) é reconhecido como um aditivo nutricional valioso e é amplamente utilizado em aplicações cosméticas, farmacêuticas e médicas. Embora seja geralmente reconhecido como seguro, a inalação de pó e vapores de óxido de zinco deve ser evitada (MIRZAEI E DARRIUD, 2017). O ZnO em nanoescala apresenta propriedades ópticas e elétricas distintas, as quais despertaram um grande interesse científico e tecnológico em diversas áreas. Em revisão realizada por MIRZAEI E DARRIUD, 2017 e por JIANG CAI, 2018 sobre aplicações biomédicas de nanopartículas de óxido de zinco (np-ZnO), há estudos incluindo atividades anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes, antidiabéticas e antiinflamatórias, tratamento de diferentes problemas dermatológicos, bem como "drug delivery" e aplicações em bioimagem.

Diversos estudos têm demonstrado atividade anticancerígena de np-ZnO e sua seletividade por diferentes linhagens. Nanopartículas de óxido de zinco de diferentes formatos demonstraram maior citotoxicidade em linhagem de tumor cerebral (U87MG) e de tumor cervical (HeLa) em comparação com células de rins normais (HEK) (WAHAB et al, 2011). Outro estudo demonstrou que np-ZnO apresentaram toxicidade contra células de glioma humano, mas não sobre astrócitos humanos normais e similarmente induzem morte celular em linhagens de câncer de mama e próstata, porém não exercem efeitos citotóxicos importantes em células normais de mama e próstata (OSTROVSKY et al, 2009). Investigação sobre a citotoxicidade de np-ZnO contra células de câncer de mioblastoma C2C12 em co-cultura com células de adipócitos 3T3-L1, mostrou que as np-ZnO são mais citotóxicas para células de câncer que células 3T3-L1 (CHANDRASEKARAN E PANDURANGAN, 2016). Outro estudo, demonstrou a especificidade das np-ZnO contra gliomas T98G humanos, comparando sua citotoxicidade também em linhagens epidermoides KB e células renais HEK normais, onde verificou-se que as nanopartículas são mais tóxicas contra as células cancerígenas T98G, moderadamente eficazes contra as células KB e menos tóxicas contra as células HEK humanas normais (WAHAB et al., 2013).

As vias responsáveis pela toxicidade das np-ZnO ainda são incertas, porém alguns mecanismos comumente propostos incluem a geração de espécies reativas de oxigênio e uma

alteração no balanço da expressão de genes e proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (OSTROVSKY et al., 2009, CHANDRASEKARAN E PANDURANGAN, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) possui uma das mais altas taxas de letalidade dentre os diversos tipos de câncer existentes e contribui de forma significativa para a mortalidade no mundo inteiro. O glioblastoma consiste em um tumor cerebral primário e é o tipo mais agressivo e frequente dentre os gliomas.

O tratamento da doença inclui basicamente a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, porém confere um prognóstico ruim da doença, sendo que diversas dificuldades apresentadas para o tratamento adequado e obtenção de bons resultados são, em sua maioria, resultado da incapacidade que os agentes quimioterápicos utilizados no seu manejo têm de se acumular nos tecidos alvos, impedindo, dessa forma, o alcance de doses adequadas para um efeito terapêutico desejado e consequente potencialização dos efeitos adversos causados pela ação desses agentes em outros tecidos. Abordagens que melhorem tal característica, como o uso de nanocarreadores, podem ser promissoras para enfrentar tais problemas.

Além disso, devido ao pouco arsenal terapêutico disponível para o tratamento da doença, sendo que apenas lomustina (CCNU), carmustina (BCNU), temozolomida e bevacizumabe (BVZ) estão aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) no tratamento de tumores cerebrais de alto grau, apesar do uso off-label de diversos outros quimioterápicos, a busca de novas estratégias se torna necessária.

Tendo em vista que o uso de nanopartículas de óxido de zinco têm demonstrado atividade antitumoral e seletividade em diferentes linhagens cancerígenas, incluindo gliomas e a multifuncionalidade do óxido de grafeno que o permite atuar como nanocarredor de diversas moléculas e nanopartículas, além de atuar como agente fototérmico, o estudo proposto neste trabalho visa o uso de ambas as propriedades desses nanomateriais para uma terapia combinada (quimioterápica e fototérmica) e poderá contribuir na busca de novas opções farmacológicas para o tratamento da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanofolhas de óxido de grafeno conjugadas com nanopartículas de óxido de zinco e avaliar seu efeito em linhagem U138MG e U87MG de glioblastoma humano e em linhagem não tumoral HNTMC, linhagem primária de células mesenquimais extraída de polpa de dente humano.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar nanofolhas de óxido de grafeno conjugadas com nanopartículas de óxido de zinco.
- Avaliar o efeito sinérgico (quimioterápico e fototérmico) da formulação sintetizada (OG-ZnO-P) em células U138MG e U87MG (glioblastoma humano) e linhagem não tumoral HNTMC e comparar com as suas contrapartes livres (OG-COOH-P e np-ZnO).
- Avaliar as alterações morfológicas celulares ocasionadas pelos tratamentos.
- Avaliar as vias de internalização da formulação OG-ZnO-P
- Avaliar as vias de morte celular induzida pelas formulações.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

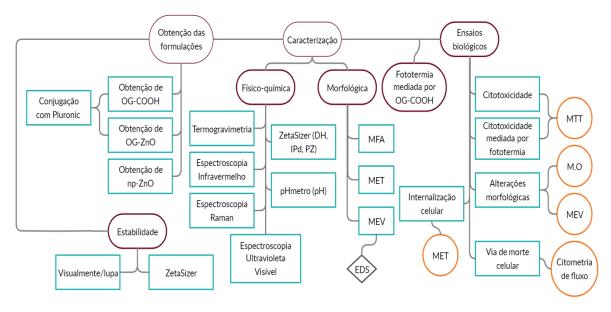


Figura 9 Delineamento experimental. Organograma esquemático dos experimentos desenvolvidos no projeto.

4.2 Obtenção de óxido de grafeno carboxilado

Síntese de óxido de grafeno e suas posteriores funcionalizações foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais (LABPOLN) do Instituto de Química da Universidade de Brasília, sob supervisão do professor Dr. Leonardo Giordano Paterno. O óxido de grafeno (OG), fornecido pelo LABPOLN, foi obtido por esfoliação ultrassônica de uma amostra de óxido de grafite. Óxido de grafeno carboxilado (OG-COOH) foi obtido segundo método descrito por ZHANG et al., 2011. 22,5 g de hidróxido de sódio (NaOH) e 18,75 g de ácido cloroacético (CICH₂COOH) foram adicionados a 150 mL de uma suspensão aquosa de OG de 2,5 mg.mL⁻¹. A suspensão foi submetida a agitação com ultrassom de ponteira (Sonitech Branson, modelo Sonifier 450 – 400 W) em banho de água a temperatura ambiente durante 3 h (3 ciclos de 1 h com pausa de 5 min entre cada), no modo pulsado (1 s ligado, 1 s desligado) com potência de 160 W. Ao término da reação de carboxilação, a suspensão foi purificada por diálise, utilizando membrana de 12 kDa por sete dias, protegido de luz. Após diálise, a amostra foi centrifugada por 1 h a 7x10³ rpm (HERMLE, MODELO Z 32 HK) e o produto (sobrenadante) foi ultrassonicado novamente por mais 1,5 h (200 W), também no modo pulsado descrito anteriormente, para redução do tamanho das folhas de OG-

COOH e, depois, centrifugado com rotação de 8x10³ rpm durante 1h. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em temperatura entre 2 °C e 8 °C e protegido da luz.

4.3 Obtenção de nanofolhas de óxido de grafeno conjugadas com nanopartículas de óxido de zinco

A síntese de óxido de grafeno com nanopartículas de óxido de zinco (OG-ZnO) foi baseada em método descrito por MEULENKAMP, 1998 com algumas modificações. Primeiramente, 996,1 mg de acetato de zinco dihidratado (Zn(OAc)₂.2H₂O) foi dissolvido em água deionizada e a mistura foi colocada em agitação ultrassônica no modo pulsado (1 s ligado, 1 s desligado) com 120 W em banho de gelo até completa dissolução do acetado (aproximadamente 4 min). Logo depois, mantendo a agitação ultrassônica com 100 W, 50 mL de uma solução básica (pH 11) de OG-COOH (1,18 g.L⁻¹), totalizando em 59 mg de OG-COOH, pré-preparada pela adição de hidróxido de amônio (NH₄.OH) foi adicionada gota a gota ao sistema e a agitação foi mantida por mais 30 min em banho de gelo. A suspensão resultante foi centrifugada a 8x10³ rpm por 20 min e o sobrenadante (um líquido incolor) descartado. O precipitado foi ressuspenso em água deionizada e colocado em diálise por dois dias. A suspensão foi novamente centrifugada a $8x10^3$ rpm por 30 min e o sobrenadante (um líquido incolor) foi novamente descartado. O precipitado foi ressuspenso em 40 mL de água deionizada e o pH da suspensão (~6,5) foi ajustado com NaOH até pH ~10 e colocado em banho ultrassom até completa ressuspensão (~3 h). A suspensão foi novamente centrifugada 8x10³ rpm por 20 min e o sobrenadante foi recolhido e armazenado em temperatura entre 2 °C e 8 °C e protegida da luz. Foi obtido um volume final de 53 mL (3,58 g.L⁻¹), totalizando em 189,74 mg do compósito.

4.4 Conjugação com Pluronic F127

Para aumentar a estabilidade das formulações de OG-COOH e OG-ZnO obtidas, o polímero Pluronic F127 foi utilizado. Para incorporação do polímero, uma concentração duas vezes maior em relação a concentração de OG-COOH presente em cada formulação foi adicionada e as suspensões foram colocadas em agitação magnética por 30 min. As

suspensões obtidas foram denominadas OG-COOH-P e OG-ZnO-P. Ambas as formulações foram armazenadas em temperatura entre 2 °C e 8 °C e protegidas da luz.

4.5 Obtenção de nanopartículas de óxido de zinco

Nanopartículas de óxido de zinco (np-ZnO) também foram obtidas do Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais (LABPOLN) do Instituto de Química da Universidade de Brasília. A descrição da síntese e caracterização das nanopartículas encontram-se no trabalho de GROSS et al., 2019. Foi seguido mesmo protocolo descrito por MEULENKAMP, 1998. Uma solução precursora de acetato de zinco dihidratado (Zn(OAc)₂.2H₂O) foi obtida pela dissolução de 1,10 g de acetato em 50 mL de etanol sob agitação magnética e aquecimento de 80 °C, sendo, ao final, resfriada em banho de gelo. Foi também preparada uma solução base, obtida pela dissolução de 0,29 g de hidróxido de lítio (LiOH.H2O) em 50 mL de etanol, utilizando-se agitação ultrassônica no modo pulsado (1 s ligado, 1 s desligado) com 135 W até completa dissolução do composto (aproximadamente 15 min). Essa solução base foi então adicionada gota a gota a solução precursora sob agitação ultrassônica no modo pulsado (1 s ligado, 1 s desligado) com 135 W em banho de gelo. Após total vertimento da solução base a agitação ultrassônica foi mantida por mais 30 min. O produto final foi lavado várias vezes com etanol utilizando uma centrifugação de 8x10³ rpm por 10 min a cada lavagem e ao final foi ressuspendido em etanol e armazenado em temperatura entre 2 °C e 8 °C.

4.6 Caracterização físico-química das formulações

A proporção de OG:ZnO do compósito foi realizada em colaboração com professora Dra Maria José Araújo Sales no Instituto de Química da Universidade de Brasília por meio de análise termogravimétrica (DTG 60H, Shimadzu). As amostras foram previamente secas por processo de liofilização e durante as análises foram submetidas a aquecimento de 0 °C a 600 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min.

O diâmetro hidrodinâmico (DH), o potencial zeta (PZ) e o índice de polidispersão (IPd) foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética

em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Para as análises, as amostras foram diluídas em água ultrapura na concentração de 1% (v/v) e as leituras foram realizadas em temperatura de 25°C e ângulo de dispersão fixo de 90°. Sempre que eram averiguados parâmetros no Zetasizer, era também medido o pH de cada formulação por pHmetro. Para as medidas no equipamento ZetaSizer, eram realizadas três leituras de no máximo 50 corridas cada, determinadas no modo automático. As medidas de pH eram realizadas apenas uma só vez em monoplicata.

A caracterização estrutural foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, no modo de reflectância total atenuada (FT-IR ATR) com um espectrômetro VARIAN modelo 640-IR na faixa de 500-4000 cm⁻¹ (32 scans com resolução de 0,18 cm⁻¹) e por espectroscopia RAMAN (JOBIN YVON T 6400), utilizando laser azul de 405 nm com potência de 10%. Para análises no infravermelho e RAMAN, as amostras foram antes secas por processo de liofilização.

Para estudo do espectro de absorção no UV-vis (VARIAN, CARY 5000), as amostras foram diluídas em água ultrapura nas seguintes concentrações: OG-ZnO e OG-ZnO-P (0,0765 mg.mL⁻¹), OG, OG-COOH e OG-COOH-P (0,026 mg.mL⁻¹) e np-ZnO (0,05 mg.mL⁻¹) e colocadas em cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico contendo duas janelas polidas. As leituras foram realizadas em comprimentos de onda de 200-800 nm com velocidade de varrimento de 10 nm/s e resolução de 0,05 nm.

4.7 Caracterização morfológica das formulações

A caracterização da forma e da morfologia foi investigada em microscópio eletrônico de transmissão (MET) (JEOL JEM-1011, Japão), microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL JSM-700 1F, Japão) e por microscópio de força atômica (MFA) (SPM 9600, SHIMADZU, JAPÃO), este último com auxílio do professor Dr. Luciano Paulino da Silva, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Para análises no MET, as amostras foram diluídas na proporção de 1:1000 (v/v) e 5 μL da diluição foram pingados sobre uma telinha de cobre coberta com filme de Formvar®. Após secas ao ar por 24 h, as amostras foram observadas no microscópio a 80 kV e as imagens capturadas por uma câmera UltraScan e processadas pelo programa Digital Micrograph 3.6.5 (GATAN, USA). Para análises no MEV, as amostras foram secas por processo de liofilização, colocadas sob "stubs" e visualizadas no microscópio

a 15 kV, sendo também realizada espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS). Para análise de MFA, as amostras foram diluídas na proporção de 1:1000 (v/v) e 2 μL foram pingados sobre suporte de mica recém clivada. Para a varredura foi utilizado o modo dinâmico e força constante para obtenção das imagens, com scanner de 125 μm nos eixos X e Y e de 7 μm no eixo Z e utilizando cantelever retangular de silício (espessura: 4±1 μm, cumprimento: 125±10 μm, largura: 30±7,5 μm) com frequência de ressonância de aproximadamente 300 kHz e constante de força de 10-130 N/m. As imagens foram processadas utilizando o software SPM 9600 no modo off-line. Gráficos de distribuição de frequência foram criados utilizando o software Origin Lab 9, sendo contados > 169 eventos para cada análise de MFA.

4.8 Estudo da estabilidade das formulações

A avaliação da estabilidade das formulações OG-COOH, OG-COOH-P, OG-ZnO, OG-ZnO-P e np-ZnO foi realizada visualmente após dispersão das mesmas em água deionizada (DI), PBS e meio de cultura DMEM 10% SFB depois de 24 h mantidas em geladeira. Para avaliar os efeitos da adição do polímero Pluronic nas formulações, após dispersão das mesmas em meio DMEM 10% em placa de 96 poços mantida em incubadora úmida à 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h, 48 h e 72 h para mimetizar os parâmetros utilizados nos testes de viabilidade cellular, foram obtidas imagens com lupa binocular Stemi 508 (Zeiss, Alemanha) com auxílio do software Axion Vision 100 (Zeiss, Alemanha). A estabilidade coloidal das formulações OG-COOH-P e OG-ZnO-P foi acompanhada por até 180 dias após a obtenção das formulações, mantidas em temperatura entre 2 °C e 8 °C protegidas da luz, por meio de medidas de DH, IPd, PZ e pH. A estabilidade da formulação OG-ZnO-P também foi verificada por meio de medidas de DH, IPd, PZ em diferentes valores de pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0), ajustados pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) em água deionizada.

4.9 Avaliação da fototermia mediada por OG-COOH

Para avaliação de fototermia mediada por OG-COOH, foi empregado um sistema de laboratório construído e disponibilizado pelo Laboratório de Softwares e Instrumentação em

Física do Núcleo de Física Aplicada do Instituto de Física da Universidade de Brasília, coordenado pelo professor Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza. O sistema dispõe de um laser com comprimento de onda no infravermelho próximo de 808 nm, alimentado com uma fonte DC (Agilent E4356A) com corrente de 2,14 A e diferença de potencial de 4,9 V, resultando em uma potência de 0,563±0,002 W, medida por um medidor de energia e potência (FIELD MAX II) (Figura 9). Como o feixe do laser possui uma área de 0,26 cm², a densidade de potencia aplicada foi de 2,16 W.cm⁻² (0,563 W / 0,26 cm²). Suspensões de OG-COOH nas concentrações de 50-400 μg.mL⁻¹ em DI foram colocadas no volume de 150 μL em poços de uma placa de 96 poços e irradiadas pelo laser durante 10 min. Um termopar do tipo K (Minipa) acoplado a um termômetro digital foi utilizado para verificar a variação de temperatura do sistema em tempo real a cada 1 min. Água deionizada foi utilizada como controle e o ensaio foi realizado em triplicata.

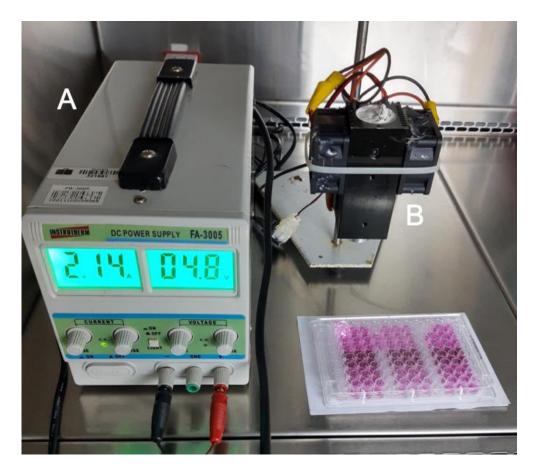


Figura 10 Fotografia digital do sistema utilizado na realização dos ensaios de fototermia. O sistema dispõe de um laser com comprimento de onda no infravermelho próximo de 808 nm (**B**), alimentado com uma fonte DC (Agilent E4356A) com corrente de 2,14 A e diferença de potencial de 4,9 V (**A**), resultando em uma potência de 0,563±0,002 W, medida por um medidor de energia e potência (FIELD MAX II).

4.10 Cultura e manutenção das células

Para realização dos ensaios biológicos *in vitro*, foram utilizadas linhagens U138MG e U87MG de glioblastoma humano, as quais foram utilizadas por possuírem características morfológicas, moleculares e taxa de ploriferação diferentes, e células mesenquimais não tumorais humanas (HNTMC) obtidas a partir do cultivo primário de polpa dentária de voluntários saudáveis no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília, sob aprovação do Comitê de Ética Humana da Universidade de Brasília (UnBDOC 104934/2008).

As linhagens U138MG e HNTMC foram cultivadas em meio Dulbecos's modified Eagle's medium (DMEM) e linhagem U87MG foi cultivada em meio Eagle's minimun essential medium (MEM), ambos contendo 10% de soro bovino fetal (SFB) e mantidas em incubadora úmida à 37 °C com 5% de CO₂.

4.11 Ensaio de viabilidade célular

Células U138MG foram plaqueadas com densidade de 2x10³ células/poço e células U87MG e HNTMC foram plaqueadas com densidade de 3x10³ células/poço em microplacas de 96 poços durante 24 h e depois submetidas a tratamento com OG-ZnO-P (25; 50; 100; 200 e 300 μg.mL⁻1) e concentrações proporcionais de OG-COOH-P (8,56; 17,12; 34,25; 68,5 e 100,74 μg.mL⁻1) e np-ZnO (16,44; 32,88; 65,75; 131,5 e 197,26 μg.mL⁻1). Para excluir a citotoxicidade do etanol, o grupo tratado com np-ZnO foi normalizado por um grupo tratado com etanol no mesmo volume utilizado para a maior concentração de np-ZnO, que foi de 0,23% (v/v). Células tratadas apenas com meio foram usadas como controle. A viabilidade celular foi medida após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento por meio do método de brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada concentração, o ensaio foi realizado em triplicata (n=3) e foram realizados três ensaios independentes.

Para avaliação da citotoxicidade mediada por fototermia, células U138MG foram plaqueadas com densidade de $2x10^3$ células/poço e células U87MG e HNTMC foram

plaqueadas com densidade de 3x10³ células/poço em microplacas de 96 poços durante 24 h e e submetidas a tratamento com OG-COOH-P (34,25 μg.mL⁻¹), OG-ZnO-P (100 μg.mL⁻¹) e np-ZnO (65,75 μg.mL⁻¹) durante 3 h. Células tratadas apenas com meio foram usadas como controle. Após o tratamento, as células foram, ou não, irradiadas com laser durante 3 min, utilizando os mesmos parâmetros para realização da avaliação de fototermia mediada por OG-COOH (Figura 9), resultando em uma fluência do laser de 0,4 kJ.cm⁻² (0,563 W x 180 s / 0,26 cm²). O grupo tratado com np-ZnO não foi irradiado, já que a formulação não possui efeito fototérmico, sendo utilizado apenas para se comparar e eficácia dos diferentes tratamentos frente ao efeito fototérmico do grafeno. A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT após 24 h. Cada ensaio foi realizado em triplicata (n=3) e foram realizados três ensaios independentes.

4.12 Avaliação de alterações morfológicas e internalização celular

Alterações morfológicas foram avaliadas por microscopia óptica por uso de microscópio de luz Axiovert (Zeiss, Alemanha) e auxílio do software Axio Vision 100 no Laboratório de Baculovírus, Universidade de Brasília, UnB. Células U138MG foram plaqueadas com densidade de 2x10³ células/poço e células U87MG e HNTMC foram plaqueadas com densidade de 3x10³ células/poço em microplacas de 96 poços durante 24 h e tratadas com OG-ZnO-P (200 μg.mL⁻¹), OG-COOH-P (68,5 μg.mL⁻¹), np-ZnO (131,5 μg.mL⁻¹) e etanol no mesmo volume utilizado para tratamento com np-ZnO (0,154% v/v). As imagens foram obtidas após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento com todas as formulações.

Para visualização de alterações morfológicas da superfície celular, foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL JSM-700 1F, Japão). As células foram plaqueadas com densidade de 5x10⁴ em placa de 6 poços contendo no fundo uma lamínula (18 x 18 mm) durante 24 h e separadas em dois grupos, grupo controle não tratado e tratado com OG-ZnO-P na concentração de 200 μg.mL⁻¹. Após 24 h de tratamento, as células foram fixadas e desidratadas como descrito no protocolo utilizado para análise no MET, descrito abaixo. Após a desidratação, as amostras foram secas ao Ponto Crítico, montadas em porta espécime metálico ("stubs"), metalizadas com ouro (Au) e analisadas no microscópio a 15 kV.

A internalização celular de OG-ZnO-P foi analisada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (JEOL JEM-1011, Japão). Células plaqueadas com

densidade de 1x10⁶ células/poço durante 24 h foram separadas em dois grupos, grupo controle não tratado e grupo tratado com OG-ZnO-P durante 3 h na concentração de 200 μg.mL⁻¹. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas com Karnovsky (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose e 0,005 M de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) overnight a 4 °C. Subsequentemente, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixadas durante 30 min com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e 5 mM de CaCl₂. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e contrastadas com acetato de uranila 0,5% overnight a 4°C. As células foram então desidratadas em gradiente crescente de acetona (50%, 70%, 90% e 2x 100%) e infiltradas com proporções crescente de resina Spurr/acetona (1:2, 1:1, 2:1) e com resina pura, onde foram emblocadas em estufa a 65 °C por 48 h. Após os cortes ultrafinos, obtidos com um ultramicrótomo (Leica, UCT, AG, Viena, Áustria), o material foi visualizado no microscópio eletrônico de transmissão (MET) a 80 kV e as imagens capturadas por uma câmera UltraScan e processadas pelo programa Digital Micrograph 3.6.5 (GATAN, USA).

4.13 Avaliação da via de morte celular

A via de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo por meio de marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI). Primeiramente, as células foram plaqueadas em placa de 6 poços com densidade de 5x10⁴ células/poço durante 24 h e depois foram tratadas com OG-ZnO-P (200 μg.mL⁻¹ para U87MG e 300 μg.mL⁻¹ para U138MG), OG-COOH-P (68,5 μg.mL⁻¹ para U87MG e 300 μg.mL⁻¹ para U138MG) e np-ZnO (131,5 μg.mL⁻¹ para U87MG e 197,26 μg.mL⁻¹ para U138MG) por 72 h. Concentrações menores foram utilizadas para a linhagem U87MG por ter se mostrado mais sensível aos tratamentos. Decorrido o tempo de tratamento, tanto as células aderidas quanto as células em suspensão foram recolhidas e lavadas com PBS. As células foram ressuspendidas em 100 μL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4) contendo 5 μL de anexina-V, no qual permaneceram por 15 min a temperatura ambiente, protegidas da luz. Logo depois, foram acrescentados 400 μL de tampão de ligação de anexina V e 500 μL de solução de PI em PBS (4 μL/mL) (para resultar em concentração final de 2 μg/mL de PI) e as suspensões celulares permaneceram em gelo por 5 min. Depois foram lavadas novamente com PBS e analisadas no citômetro FCT Calibur (Becton Dickinson). Análise dos dados foi

feita utilizando o programa FlowJo v 5.2.7. Um grupo controle não marcado, um grupo tratado com peróxido de hidrogênio 20% por 30 min para indução de apoptose marcado apenas com anexina e outro grupo submetido a banho maria a 90 °C por 15 min para indução de necrose marcado apenas com PI também foram utilizados. Foram realizados três experimentos independentes realizados em monoplicata contando $1x10^4$ eventos cada.

4.14 Cálculo do IC50

O valor da concentração das formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC50) foi calculado por meio de regressão não linear no software GraphPad Prism, utilizando os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular (item 4.10) nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

4.15 Análise estatística

Dados estatísticos foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism 6. O teste de múltiplas comparações one-way ANOVA foi utilizado para comparações envolvendo apenas um fator e two-way ANOVA para comparações envolvendo dois fatores, realizados com pós teste de Bonferroni e intervalo de confiança de 95%. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos e os resultados foram expressos como a média \pm erro médio padrão (SEM).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química das formulações

Na curva termogravimétrica (TG) da amostra OG-COOH (massa inicial = 2,55 mg), observa-se perda de massa até, aproximadamente, 500 °C, sendo essa perda, no início, associada à saída de água, seguida pela saída de CO dos grupos COOH, que ocorre próxima a 500 °C (Figura 11A), totalizando uma perda de massa de ~22,67% (0,58 mg) (Tabela 1). A decomposição da amostra não ocorre em uma temperatura bem definida e parece ocorrer aos poucos à medida que a temperatura aumenta, verificada pela presença de diversos picos pequenos presentes na curva da primeira derivada da curva TG (DTG) (Figura 11A). Nas curvas TG e DTG de np-ZnO (massa inicial = 4,11 mg), observam-se duas decomposições distintas e bastante evidentes, sendo a primeira relacionada à possível eliminação de água com interações mais significativas com o Zn²⁺, tendo em vista que sua decomposição ocorre acima de 100 °C, e a segunda com a saída de CO remanescente do carboxilato (do acetato) sem interações fortes com o íon zinco, resultando em uma perda de massa total de ~24,17% (0,1 mg) (Figura 11B e Tabela 1). Ao fim da curva TG, a partir de, aproximadamente, 400 °C, parece ocorrer um ganho de massa. Porém, esse fenômeno pode estar associado com a quantidade de massa da amostra utilizada para a análise, menor do que o recomendado pelas normas do equipamento DTG-60H Shimadzu (entre 5,0 mg e 10,0 mg), resultando em um valor de detecção abaixo do recomendado (Figura 11B). As curvas TG e DTG de OG-ZnO (massa inicial = 9,53 mg) apresentam apenas uma decomposição bem definida, associada à perda de água, provavelmente com interações mais fortes com o zinco em comparação com np-ZnO, tendo em vista os maiores valores de temperatura em que a decomposição ocorre, totalizando em uma perda de massa ~16,17% (1,54 mg) (Figura 11C e Tabela 1). Dados da temperatura inicial de decomposição (T_i), temperatura de decomposição (T_d) e a perda de massa total em porcentagem encontram-se na Tabela 1.

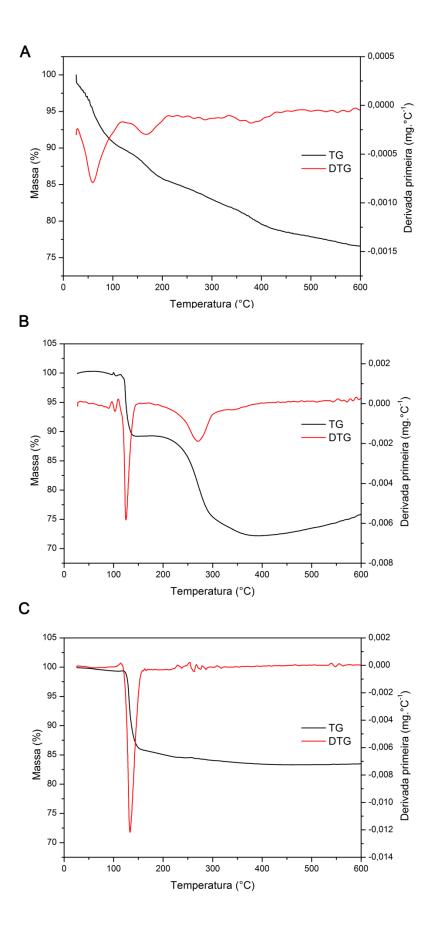


Figura 11 Análise termogravimétrica das amostras OG-COOH, np-ZnO e OG-ZnO. Gráfico de curvas TG e DTG das amostras (A) OG-COOH, (B) np-ZnO e (C) OG-ZnO.

Tabela 1 Dados de análise termogravimétrica das amostras OG, OG-COOH e OG-ZnO. São mostrados os dados de temperatura inicial de análide (Ti), temperatura de decomposição (Td) e a perda de massa total em porcentagem de cada amostra analisada.

Formulação	T _i (°C)	T _d (°C)	Perda de massa total (%)
OG-COOH	47	-	22,60
np-ZnO	122	124	24,17
		272	
OG-ZnO	131	134	16,17

A proporção de OG-COOH:ZnO do compósito OG-ZnO foi de 1,00 g OG-COOH:1,92 g ZnO. O cálculo foi feito por meio das análises de perda de massa das amostras OG-COOH e OG-ZnO e análise estequiométrica da reação de síntese da seguinte maneira:

$$Ai - 0,1617Ai = Ar$$
 (1)
 $Bi - 0,226Bi = Br$ (2)
 $Ar - Br = C$ (3)
 $C/Bi = P$ (4)

Onde: Ai = massa inicial de OG-ZnO; (9,53 mg), A(r) = massa residual de OG-ZnO (7,99 mg), composta por carbono e óxido de zinco; Bi = massa inicial de OG-CCOH (2,96 mg), corrigida de acordo com a estequiometria da reação de síntese (59 mg OG-COOH \rightarrow 189,74 mg OG-ZnO – item 4.2); B(r) = massa residual de OG-COOH (2,29 mg), composta por carbono; C = massa de ZnO encontrada no compósito (5,7 mg) e P a proporção OG-COOH:ZnO (1,00 g:1,92 g).

Valores médios de diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta (PZ), índice de polidispersão (IPd) e pH de todas as formulações estão listados na Tabela 2. Após processo de carboxilação, houve uma redução do DH das nanofolhas de grafeno, partindo de 175,8 nm para 104,3 nm e também uma redução do PZ, de -20,6 mV para -48,8 mV, sendo o potencial negativo condizente, visto que os ácidos carboxílicos possuem pK_a entre 4 e 5 (SOUTO E

DUARTE, 2006), estando na forma de carboxilato (COOH) no pH da formulação (8,15). Após síntese do compósito OG-ZnO, houve um aumento do DH das nanofolhas para 167 nm, acompanhada de uma redução do PZ para -53,7 mV, sendo o aumento do tamanho, indício da presença e ancoramento das np-ZnO nas nanofolhas de OG-COOH e a redução do PZ condizente com o pH da formulação (10,2), no qual o ZnO que tem seu ponto isoelétrico em torno de 9,5 (CAO et al., 2018) encontra-se na sua forma aniônica. Após incorporação de Pluronic F127 em ambas as amostras, OG-COOH e OG-ZnO, houve um aumento do DH, de 104,3 nm para 114,6 nm em OG-COOH e de 167 nm para 195,9 nm em OG-ZnO, e do PZ, passando de -48,8 mV para -34,8 mV em OG-COOH e de -53,7 mV para -25,7 mV em OG-ZnO, indicando o encobrimento da nanofolhas pelo polímero aniônico e o mascaramento das cargas negativas presentes na superfície, dados condizentes ao encontrado na literatura (SAHU et al., 2013) e anteriormente por nosso grupo (SANTOS et al., 2018).

Tabela 2 Dados de diâmetro hidrodinâmico (DH), Índice de Polidispersão (IPd), Potêncial Zeta (PZ) e pH das formulações OG, OG-COOH, OG-ZnO, OG-COOH-P e OG-ZnO-P. Os valores de DH, IPd e PZ expressam a média de três leituras ± DP e os valores de pH expressam resultado de uma leitura em monoplicata.

Formulação	DH (nm)	IPd	PZ (mV)	рН
OG	175,8 ± 1,464	$0,171 \pm 0,005$	-20,6 ± 0,7	6
од-соон	$104,3 \pm 0,987$	$0,319 \pm 0,045$	$-48,8 \pm 1,25$	8,15
OG-ZnO	$167 \pm 0,436$	0.2 ± 0.011	$-53,7 \pm 0,3$	10,2
ОG-СООН Р	114,6 ± 1,217	$0,266 \pm 0,013$	-34.8 ± 3.4	8,76
OG-ZnO P	$195,9 \pm 1,343$	$0,189 \pm 0,019$	$-25,7 \pm 0,379$	10,67

As formulações finais obtidas (OG-COOH-P e OG-ZnO-P), apresentaram um diâmetro hidrodinâmico abaixo de 200 nm. Ao contrário do endotélio vascular normal, com células justapostas, o endotélio vascular tumoral é defeituoso e descontínuo podendo apresentar fenestrações que vão de 200-2000 nm. Nanoestruturas menores que o corte das fenestrações conseguem adentrar e se acumular na região tumoral. Apesar da heterogeneidade

de resultados encontrados na literatura, a maioria dos estudos sugere que nanocarreadores de menor tamanho possuem uma maior capacidade de penetração no tumor. Porém nanoestruturas muito pequenas podem atravessar o endotélio vascular normal de tecidos saudáveis e não ter seletividade pela região tumoral, bem como atravessar a barreira capilar pulmonar (35 nm) ou a barreira capilar renal (10 nm), podendo ocasionar embolismo pulmonar e sofrer uma rápida depuração renal (MINCHINTON E TANNOCK, 2006; PERRY et al., 2017; DANAEI et al., 2018).

As duas formulações finais também apresentaram potencial zeta negativo. Nanopartículas carregadas (negativamente ou positivamente) conseguem manter uma estabilidade coloidal devido a repulsão eletrostática entre elas e, além disso, parecem interagir melhor com o endotélio vascular e com a matriz extracelular, causando um maior acúmulo tumoral quando comparadas com nanopartículas sem carga (neutras) (MINCHINTON E TANNOCK, 2006)

Apesar de todos os indícios citados, diversos estudos têm demonstrado que o acúmulo de nanomateriais também depende de características do tumor, como sua localização, conteúdo do estroma e a densidade dos vasos sanguíneos (PERRY et al., 2017) e devido a variedade e complexidade de tipos tumorais existentes é difícil de prever.

O IPd de todas as formulações foi menor ou próximo a 0,3. Valores de IPd entre 0,1 e 0,7 representam um valor bom, indicando uma amostra com distribuição de tamanho quase monodispersa. Valores acima de 0,7 sugerem larga distribuição de tamanhos (STETEFELD et al., 2016).

Uma das principais dificuldades para o tratamento do glioblastoma se dá pela presença da barreira hematoencefálica, sendo que apesar de indícios que sugerem a perda de sua integridade em pacientes acometidos pela doença, acredita-se que isso não acontece de forma homogenia e entre todos os pacientes e que mesmo com a sua integridade alterada, sua capacidade de efluxo de fármacos é mantida, representando ainda um grande desafio para o uso de muitos fármacos e para que um tratamento adequado seja obtido. Algumas abordagens atualmente utilizadas para tentar ultrapassar tal problema é o acoplamento de fármacos ou nanomateriais a ligantes de receptores que são superexpressos tanto nas células tumorais quanto na BHE, a coadministração de inibidores das proteínas de efluxo e o uso de ultrassom de baixa intensidade para romper transitoriamente a estrutura da BHE e aumentar sua permeabilidade momentaneamente (ARVANITIS et al., 2020, JENA et al., 2020).

Um estudo conduzido por Mendonça et al. (2015), demonstrou que nanofolhas de óxido de grafeno reduzino com diâmetro hidrodinâmico de 342 \pm 23,5 nm e IPd de 0,56 \pm

0,03 foram capazes de se acumular no tecido cerebral de ratos Wistar após sua administração intravenosa via veia caudal dos animais. O mecanismo proposto no estudo foi de que o nanomaterial foi capaz de alcançar o tecido cerebral por uma passagem paracelular pela BHE por causar uma ruptura transitória da sua estrutura, a qual demonstrou retornoar à sua integridade normal após sete dias decorridos da administração da formulação.

Na Figura 12 são apresentados os espectros FTIR das amostras preparadas. O espectro de OG indica a presença de estiramento –OH (3290 cm⁻¹), C=O (1737 cm⁻¹) e COO⁻ (1624 cm⁻¹), característicos de sua estrutura. Em OG-COOH observa-se estiramento C=C (1585 cm⁻¹), indicando eliminação de CO após carboxilação. No espectro de ZnO observa-se a presença de estiramento simétrico e assimétrico de COO⁻ (1400 cm⁻¹ e 1568 cm⁻¹), OH em Zn(OH)₂ (3400 cm⁻¹) e estiramento Zn-O de ZnO (441,7 cm⁻¹). No compósito há presença de estiramento simétrico de COO⁻ (1440 cm⁻¹) e observa-se um deslocamento de +31 cm⁻¹ no estiramento Zn-O de ZnO (441,7 cm⁻¹) para OG-ZnO (472 cm⁻¹), evidenciando a interação entre ZnO e OG no compósito.

Nos espectros RAMAN (Figura 13), observa-se a presença de duas bandas características do grafeno, a banda D, relacionada a presença de imperfeições ou defeitos no material devido a presença de grupos oxigenados que interrompem os contatos sp^2 entre os átomos de carbono planar e a banda G, associada à vibração no plano de átomos de carbono sp^2 devido aos modos vibratórios presentes nas conexões C = C (OLIVEIRA et al., 2019). As análises obtidas mostraram que a razão das intensidades das bandas D (~1375 cm⁻¹) e G (~1600 cm⁻¹) (I_D/I_G) aumenta de OG (0,936) para OG-COOH (1,020), indicando redução (aumento da proporção de domínios sp^2/sp^3) das folhas de grafeno após carboxilação, fato que pode ser explicado por conta da redução do tamanho das folhas de grafeno após o processo, observado por uma redução do valor de DH, visto que a ruptura das folhas de grafeno ocorre em pontos de falha da estrutura, ou seja, onde há presença de grupos oxigenados. I_D/I_G permanece constante de OG-COOH para OG-ZnO (1,001).

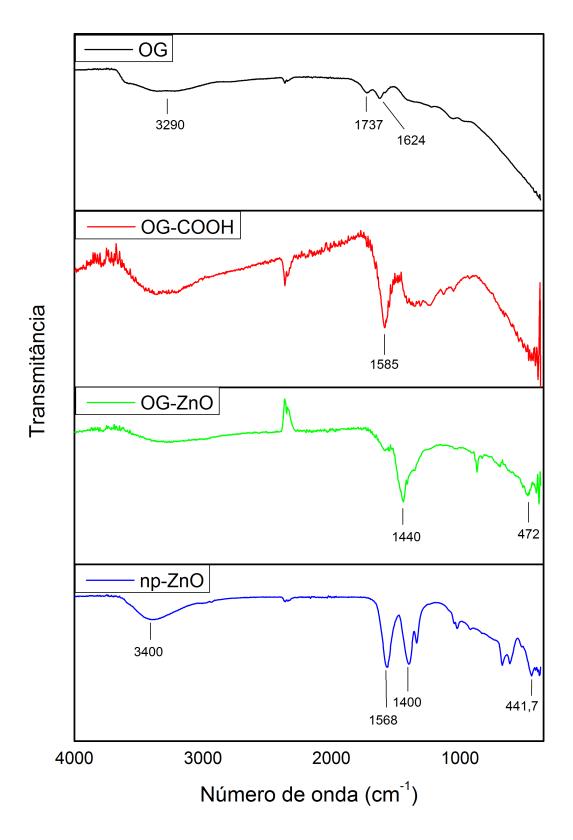


Figura 12 Espectros FTIR ATR das amostras OG, OG-COOH, OG-ZnO e np-ZnO. Gráfico FT-IR em transmitância das amostras analisadas. No espectro OG, destacam-se os picos em 3290 cm⁻¹ (OH), 1737 cm⁻¹ (C=O) e 1624 cm⁻¹ (COO⁻). No espectro OG-COOH, destaca-se um único pico em 1585 cm⁻¹ (C=C). No espectro OG-ZnO, destacam-se os picos em 1440 cm⁻¹ (COO⁻) e em 472 (Zn-O). No espectro np-ZnO, destacam-se os picos em 3400 cm⁻¹ (OH), 1568 cm⁻¹ e 1400 cm⁻¹ (COO⁻) e 441,7 cm⁻¹ (Zn-O).

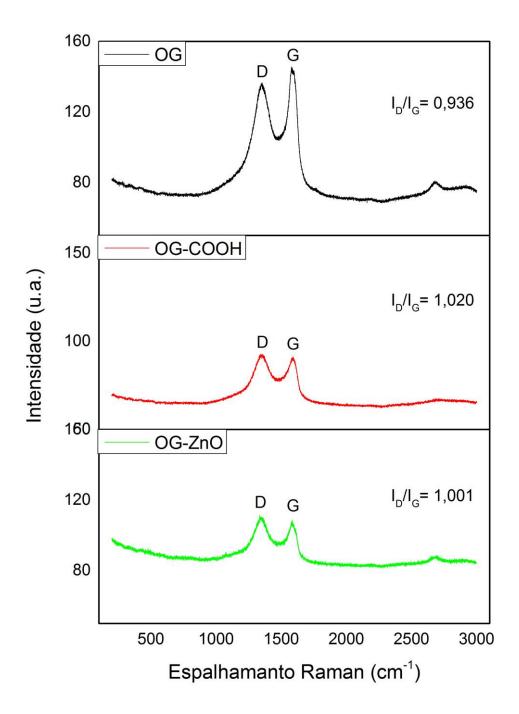


Figura 13 Espectro RAMAN das amostras OG, OG-COOH e OG-ZnO. Espectro com identificação das bandas D e G características do óxido de grafeno e a razão entre as duas bandas das amostras analisadas.

Nos espectros de UV-vis (Figura 14), é possível observar que a transição π - π * de carbono sp² de OG (230 nm), sofreu um deslocamento para valores de menor energia em OG-COOH (251 nm), sugerindo que a conjugação eletrônica nas folhas de grafeno (ligações C=C) é restaurada, o que indica processo de redução após a etapa de carboxilação (LI et al., 2008).

O pico não se desloca após a síntese do compósito, indicando que a proporção de domínios sp^2/sp^3 se mantém, corroborando com dados obtidos por espectroscopia RAMAN. Em np-ZnO observa-se pico em 361 nm referente a transição direta da banda de valência para a banda de condução (BV-BC), característica do composto. No compósito consegue-se observar a transição π - π * do grafeno (251 nm), porém a transição de ZnO é encoberta. Um leve deslocamento na transição π - π * é observado após adição do pluronic F127 de 251 nm para 253 nm, tanto em OG-COOH quanto em OG-ZnO, demonstrando que a incorporação do mesmo não altera as transições eletrônicas das amostras.

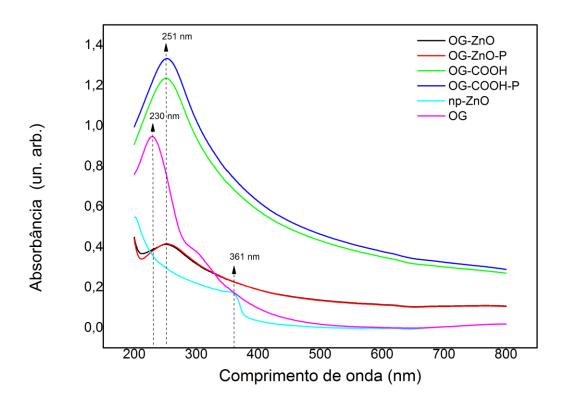


Figura 14 Espectro UV-Vis das amostras OG, OG-COOH, OG-COOH-P, OG-ZnO, OG-ZnO-P e np-ZnO. Gráfico de absorção UV-Vis indicando a presença de picos em 230 nm da amostra OG e em 251 nm das amostras OG-COOH, OG-ZnO, OG-COOH-P e OG-ZnO-P, referentes a transição π - π * do grafeno e a presença de pico em 361 nm da amostra np-ZnO, referente a transição BV-BC do material.

5.2 Caracterização morfológica das formulações

Em imagem obtida por MET de OG-COOH pode-se observar finas folhas de grafeno sobrepostas umas as outras (Figura 15A) e em OG-ZnO se observa a presença de nanopartículas de óxido de zinco ancoradas e uniformemente espalhas sobre as nanofolhas de grafeno (Figura 15B).

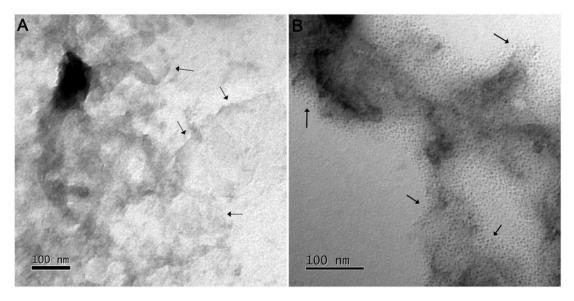


Figura 15 Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão. (A) OG-COOH e (B) OG-ZnO. As setas indicam delimitações das nanofolhas de óxido de grafeno (em A) e nanopartículas de óxido de zinco (em B). Barra de escala: 100 nm.

Nas imagens obtidas por MEV foi possível visualizar uma única folha de óxido de grafeno em OG-COOH (Figura 16A), também foram observadas nanopartículas de óxido de zinco de formato elipsóide ancoradas às nanofolhas de óxido de grafeno em OG-ZnO (Figura 16B) e um aglomerado de nanopartículas de óxido de zinco (Figura 16C).

Análise de EDS (Figura 17) da amostra OG-COOH detectou a presença dos elementos carbono (C) e oxigênio (O), presentes na estrutura do grafeno, além de sódio (Na), magnésio (Mg), cálcio (Ca) e titânio (Ti), elementos residuais da síntese de OG e processo de carboxilação. Na amostra OG-ZnO além da presença de carbono (C) e oxigênio (O), também foi detectada a presença de zinco (Zn), indicando a presença das nanopartículas na superfície e de titânio (Ti) resíduo do processo de agitação ultrassônica. Na amostra de np-ZnO foi detectada a presença de oxigênio (O) e zinco (Zn), elementos estruturais do material.

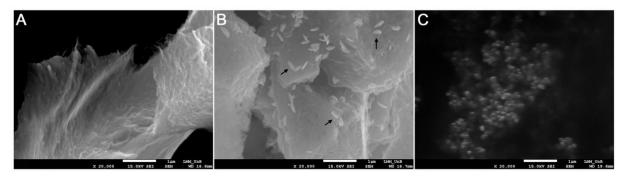


Figura 16 Micrografias de microscopia eletrônica de varredura. (A) OG-COOH, (B) OG-ZnO e (C) np-ZnO. Nanopartículas de óxido de zinco ancoradas às nanofolhas de grafeno são indicadas pelas setas (em B). Barra de escala: 1μm.

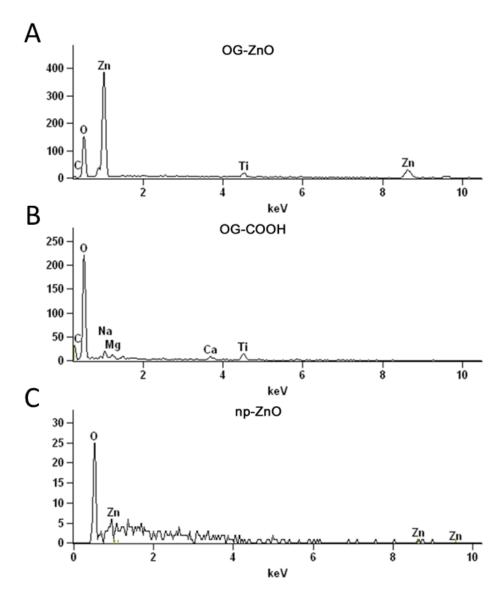


Figura 17 Composição elementar química das amostras obtidas por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS). Espectros EDS das amostras (A) OG-ZnO, mostrando a detecção dos elementos carbono (C), oxigênio (O) e zinco (Zn). (B) OG-COOH, mostrando a detecção dos elementos carbono (C), oxigênio (O), magnésio (Mg), cálcio (Ca) e titânio (Ti). (C) np-ZnO, mostrando a detecção dos elementos oxigênio (O) e zinco (Zn).

Na análise de MFA, observou-se redução no tamanho das nanofolhas de óxido grafeno (OG) (Figura 18A) após o processo de carboxilação (Figura 18B), também observado nas medidas de DH, nenhuma alteração visual foi observada após síntese do nanocompósito comparada a OG-COOH (Figuras 18C e 18D). Houve um aumento na altura média das nanofolhas após os processos de carboxilação e síntese do nanocompósito (Figura 19A, 19B e 19C). O aumento na altura média após o processo de carboxilação se deve ao fato da tendência que essas nanoestruturas têm de formar agregados e um novo aumento após a síntese do nanocompósito indica a presença de nanopartículas ancoradas às nanofolhas de grafeno.

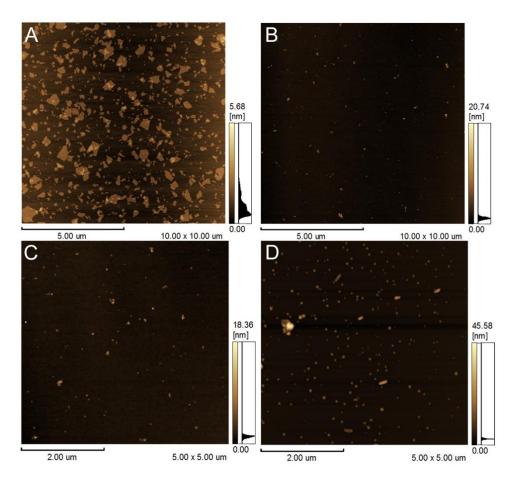
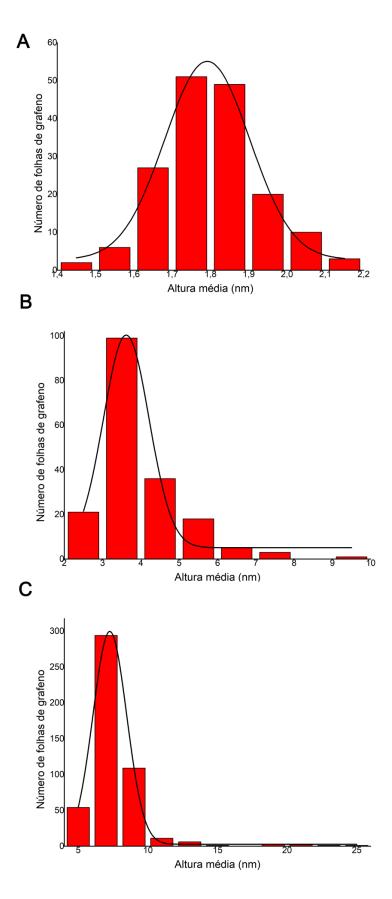


Figura 18 Imagens de OG, OG-COOH e OG-ZnO obtidas por microscopia de força atômica. (A) OG 10μm x 10μm, (B) OG-COOH 10μm x 10μm, (C) OG-COOH 5μm x 5μm e (D) OG-ZnO 5μm x 5μm.



 $\label{eq:figura 19} \textbf{Gráficos de distribuição de frequência da altura média dos dados obtidos por microscopia de força atômica. (A) OG, (B) OG-COOH e (C) OG-ZnO. \\$

5.3 Estabilidade das formulações

A alta área de superfície em relação ao volume das nanoestruturas geralmente resulta em alta reatividade e instabilidade coloidal em comparação com suas contrapartes em dimensões maiores. Tal instabilidade pode levar a agregação das partículas e pode alterar suas propriedades físico-químicas, reatividade, destino, transporte e interações biológicas, como por exemplo, biodisponibilidade e absorção (ZHANG, 2014). O Pluronic F127 é um copolímero triplo, composto por um bloco de poli(óxido de etileno), intercalado com um bloco de poli(óxido de propileno) e um outro bloco de poli(óxido de etileno) e foi escolhido para garantir a estabilização das formulações em meio aquoso e biológico já que seu método de conjugação não requer reação química que utiliza grupos funcionais para fixar covalentemente as cadeias poliméricas, pois através de seus segmentos de poli(óxido de propileno) podem formar interações hidrofóbicas com as nanofolhas de óxido de grafeno, enquanto que seus segmentos de poli(óxido de etileno) se estendem para a água e causam um impedimento estérico, evitando a agregação das partículas (FRISE et al., 2012; SAHU et al., 2013). Além disso, diversos trabalhos já demonstraram o aumento da estabilidade de nano OG após conjugação com Pluronic F127 (SAHU et al., 2013; YAN et al., 2015).

A avaliação visual da estabilidade das formulações em diferentes meios (água deionizada (DI), PBS e meio de cultura (DMEM), mostrou que as formulações foram instáveis em PBS e relativamente estáveis em DI e DMEM. Estudos atuais mostram que nanoestruturas, incluindo np-ZnO e OG, são estabilizadas em meios contendo SFB, o que se deve a presença de proteínas séricas que interagem com essas nanoestruturas e aumentam sua dispersão, levando a baixa precipitação (HU et al., 2011; HSIAO e HUANG, 2013; ANDERS et al., 2015; DE LUNA et al., 2016; WU et al., 2019). A incorporação do polímero Pluronic F127 às formulações OG-ZnO e OG-OOH melhorou suas estabilidades tanto em DI quanto em DMEM (Figura 20).

Ainda para verificar se a presença do Pluronic F127 nas formulações reduzia sua precipitação em condições de cultivo celular, foi realizado um ensaio em placa de cultivo celular, onde as formulações permaneceram por 24 h, 48 h e 72 h em incubadora úmida à 37 °C com 5% de CO₂. Os dados mostraram que o polímero foi capaz de reduzir a precipitação das formulações mesmo após 72 h de incubação (Figura 21). Na Figura 21, é possível observar a presença de material (precipitado) no fundo da placa, o qual aparece indicado pelas

setas pretas, das formulações sem o polímero. Após adição do mesmo, a presença de material no fundo do poço reduz expressivamente.

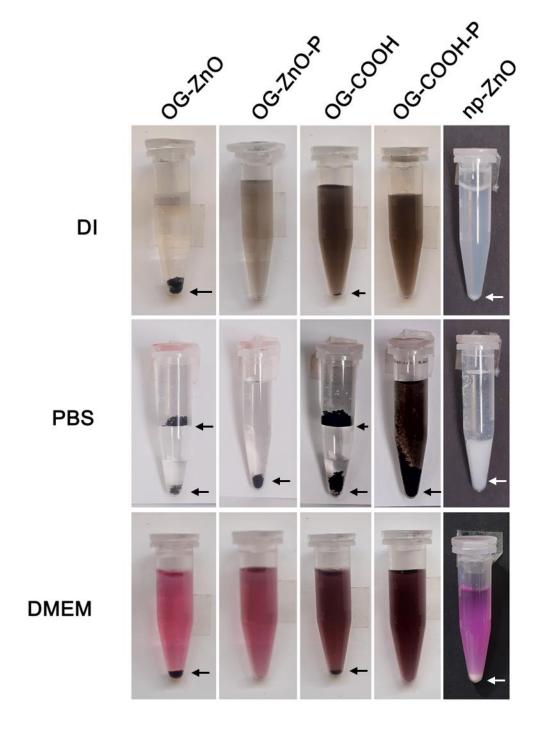


Figura 20 Estabilidade das formulações OG-ZnO, OG-ZnO-P, OG-COOH, OG-COOH-P e np-ZnO em diferentes meios. A imagem mostra fotografias digitais dos nanomateriais dispersos em água deionizada (DI), PBS e meio de cultivo celular DMEM + 10% de SFB após 24 h de incubação. Setas pretas e brancas indicam a presença de precipitados e instabilidade das formulações.

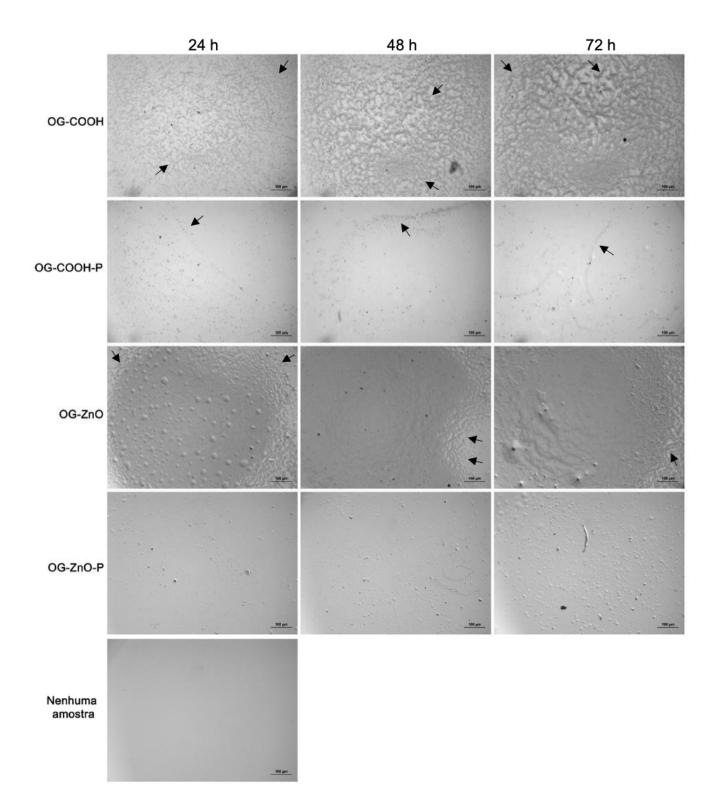


Figura 21 Estabilidade das formulações OG-ZnO, OG-ZnO-P, OG-COOH e OG-COOH-P sob condições ambientais de cultivo celular. Imagens obtidas por lupa binocular após incubação das formulações em placa de cultivo celular com meio de cultura DMEM + 10% de SFB em incubadora úmida à 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h, 48 h e 72 h. As setas pretas indicam precipitação do material no fundo da placa.

Medidas de DH, IPd, PZ e pH foram utilizados para avaliar a estabilidade das amostras OG-COOH-P e OG-ZnO-P (Figura 22). Nenhuma grande variação foi observada até 180 dias de estocagem, exceto por uma queda no PZ de OG-COOH-P após os primeiros dias, passando de -34,8 mV no dia zero para -49,2 mV e -54 mV nos dias 15 e 30, respectivamente, o qual retornou aos seus valores anteriores nos dias seguintes, e essas variações foram ambas isoladas, não sendo acompanhadas de grande variação de nenhum outro parâmetro. Observouse uma tendência de aumento do DH e IPd e redução do pH da formulação OG-ZnO-P ao longo do tempo, mas a única variação expressiva foi um aumento do DH após 180 dias, passando de 195,9 nm no dia zero para 250,7 nm. Os valores de IPd mantiveram-se constantes, entre 0,25 e valores próximos a 0,3 para OG-COOH-P e entre valores próximos a 0,2 e abaixo de 0,3 para OG-ZnO-P. Valores de pH mantiveram-se entre 8 e 9 em OG-COOH-P e entre 10 e 11 em OG-ZnO-P.

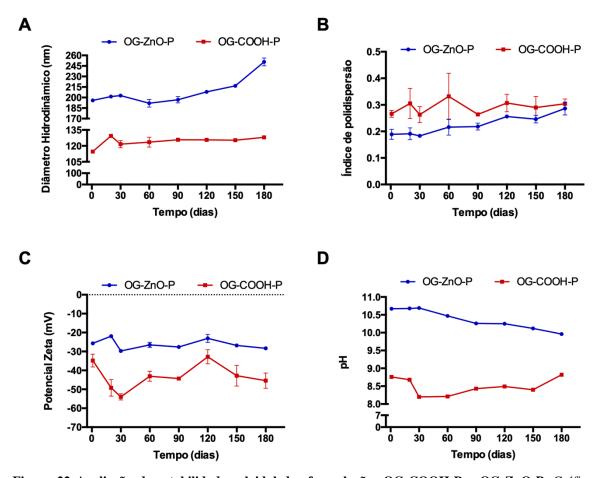


Figura 22 Avaliação da estabilidade coloidal das formulações OG-COOH-P e OG-ZnO-P. Gráficos da variação dos parâmetros de: (A) Diâmetro Hidrodinâmico (DH), (B) Índice de Polidispersão (IPd), (C) Potencial Zeta (PZ) e (D) pH das formulações ao longo de 180 dias armazenadas em temperatura de 2 °C a 8 °C e protegidas da luz. Os valores de DH, IPd e PZ expressam a média \pm SD de três leituras e os valores de pH expressam resultado de uma leitura em monoplicata.

A estabilidade de OG-ZnO-P foi avaliada também em valores diferentes de pH (Figura 23), e, apenas em pH mais baixo (3,0), demonstrou ter sua estabilidade expressivamente alterada, observada por uma redução expressiva do DH e aumento expressivo do PZ, o que pode ser devido a dissolução das np-ZnO em meio ácido (BIAN et al., 2011; AVRAMESCU et al., 2016).

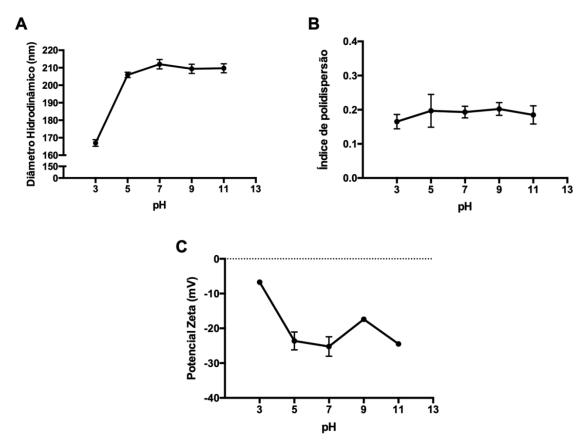


Figura 23 Avaliação da estabilidade da formulação OG-ZnO-P em diferentes valores de pH. Gráficos da estabilidade por meio da medição dos parâmetros de: (A) Diâmetro Hidrodinâmico (DH), (B) Índice de Polidispersão (IPd) e (C) Potencial Zeta (PZ) após diluição da amostra em 1% (v/v) em água deionizada com diferentes valores de pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0) ajustados pela adição de HCl ou NaOH. Os valores de DH, IPd e PZ expressam a média ± SD de três leituras.

5.4 Fototermia mediada por OG-COOH

Para verificar o aumento da temperatura de OG-COOH sob exposição do laser, a amostra foi exposta em diferentes concentrações (50 – 400 μg.mL⁻¹) a um laser IVP de 808 nm com densidade de potência de 2,16 W.cm⁻² por até 10 min. A avaliação de fototermia mostrou que o aumento da temperatura foi diretamente proporcional ao aumento da concentração da formulação e ao tempo de exposição ao laser, sendo que a temperatura

aumenta rapidamente nos primeiros minutos e depois começa a subir mais lentamente, atingindo um platô entre aproximadamente 3 e 4 min de exposição (Figura 24), dados similares aos encontrados anteriormente por nosso grupo (SANTOS et al., 2018). Após o primeiro minuto de exposição, a temperatura conseguiu atingir 40,3 °C, 43,8 °C, 47,8 °C e 48 °C nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 μg.mL⁻¹, respectivamente, e com 3 min de exposição (tempo em que se atinge um platô no aumento da temperatura), conseguiu-se atingir 50,2 °C na menor concentração (50 μg.mL⁻¹), o que já é suficiente para causar danos celulares irreversíveis, como desnaturação proteica, e causar danos ao DNA (JAQUE et al., 2014). Foi possível ainda o alcance de temperaturas entre 60 °C e 70 °C entre 6 e 10 min de exposição nas maiores concentrações (200 e 400 μg.mL), nas quais também é possível observar uma queda da temperatura entre 9 min e 10 min, indo de 66 °C para 63,5 °C em 400 μg.mL e de 64,4 °C para 56,8 °C em 200 μg.mL. Dados encontrados por SANTOS et al. (2018), demonstrou o alcance de 62,2 °C após exposição da formulação na concentração de 200 μg.mL⁻¹ durante 10 min com uso do mesmo laser e uma densidade de potência de 9,2 W.cm⁻².

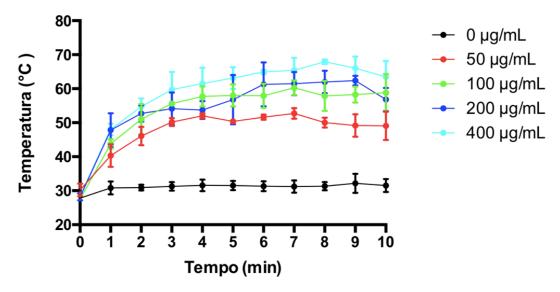


Figura 24 Avaliação da fototermia mediada por OG-COOH. Gráfico mostrando a correlação do aumento de temperatura com relação ao aumento da concentração da formulação e ao tempo de exposição ao laser IVP de comprimento de onda de 808 nm. Os dados representam a média ± SD de um ensaio em triplicata.

5.5 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o objetivo de comparar a citotoxicidade da formulação proposta OG-ZnO-P com suas contrapartes livres OG-COOH-P e np-ZnO, bem como para selecionar as concentrações de trabalho para realização dos demais ensaios. Para tal propósito foram selecionadas duas linhagens tumorais de glioblastoma humano (U138MG e U87MG) e linhagem não tumoral (HNTMC).

O tratamento com OG-ZnO-P só foi capaz de causar uma redução significativamente estatística da viabilidade celular da linhagem U87MG em concentrações menores (<200 µg.mL⁻¹) no tempo de tratamento de 72 h, onde houve uma redução de, aproximadamente, 35% - 40% (p<0.05), nas concentrações de 25 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹, uma redução um pouco maior que 50% (p<0,001) na concentração de 100 µg.mL⁻¹ e uma redução de 75% e 87% (p<0,0001) nas concentrações de 200 e 300 μg.mL⁻¹, respectivamente, sendo que nessas duas últimas concentrações, a redução foi de 45% (p<0,01) e 75% (p<0,0001) em 24 h e não sofreu grande alteração em 48 h (Figura 25A). A linhagem se mostrou mais sensível ao tratamento com OG-COOH-P nas menores concentrações em 24 h de tratamento, onde apresentou uma redução de 33% (p<0,05) com as duas menores concentrações utilizadas (8,56 μg.mL⁻¹e 17,12 μg.mL⁻¹), redução próxima aos valores encontrados para essas concentrações com 72 h de tratamento com OG-ZnO, uma redução de 40% (p<0,01) nas concentrações de 34,25 µg.mL⁻¹ e 64.5 µg.mL⁻¹ e de 50% na concentração de 102,74 µg.mL⁻¹. Para as maiores concentrações (68.5 µg.mL⁻¹ e 102.74 µg.mL⁻¹), houve um aumento adicional de, aproximadamente, 10% na redução da viabilidade celular após 48h e novamente após 72h (Figura 25B). O tratamento com np-ZnO causou redução da viabilidade celular da linhagem U87MG nas três maiores concentrações em 24 e 48h de tratamento e nas quatro maiores concentrações em 72h de tratamento, porém as reduções foram bem expressivas, todas com p<0,0001, sendo de 75% na concentração de 65,75 µg.mL⁻¹ em 24h, chegando próxima de 90% na mesma concentração em 48 h e 72 h e e nas concentrações de 131,5 µg.mL⁻¹ e 197,26 µg.mL em 24 h, as quais causaram uma redução de quase 100% em 48 h e 72 h de tratamento (Figura 25C).

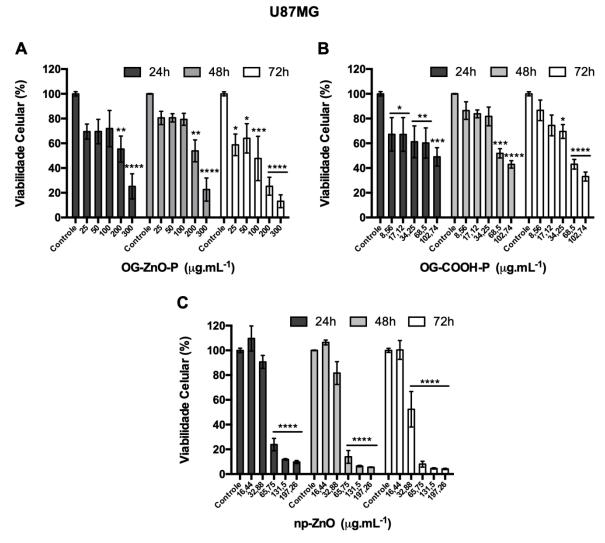


Figura 25 Avaliação da viabilidade celular da linhagem U87MG. Gráficos da viabilidade celular após tratamento com as formulações (A) OG-ZnO- P, (B) OG-COOH- P e (C) np-ZnO em diferentes concentrações por 24 h, 48 h e 72 h. Os dados representam a média ± SEM de três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos indicam significância estatística com relação ao grupo controle não tratado, sendo *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001.

O tratamento com OG-ZnO-P, assim como na linhagem U87MG, só foi capaz de causar uma redução significativamente estatística da viabilidade celular da linhagem U138MG em concentrações menores (<100 μg.mL⁻¹) no tempo de tratamento de 72 h, onde observou-se uma redução de 25% (p<0,01) na concentração de 25 μg.mL⁻¹, de 30% (p<0,01) nas concentrações de 50 μg.mL⁻¹ e 100 μg.mL⁻¹, de 45% (p<0,0001) na concentração de 200 μg.mL⁻¹ e de 65% (p<0,0001) com 300 μg.mL⁻¹. Nas duas maiores concentrações essa redução foi de, aproximadamente 25% (p<0,05) em 24 h e de, aproximadamente, 20%

(p<0.05), 30% (p<0.01) e 40% (p<0.0001) nas concentrações de 100, 200 e 300 µg.mL⁻¹, respectivamente, em 48h (Figura 26A). A linhagem se mostrou mais resistente ao tratamento com OG-COOH, o qual só foi capaz de causar uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular na concentração de 300 µg.mL⁻¹ em 48 h, a qual foi de 33% (p<0,01) e após 72 h de tratamento, onde a redução foi de 30% (p<0,05) na concentração de 8,56 µg.mL⁻¹ 1 , 36% (p<0,01) nas concentrações de 17,12 µg.mL $^{-1}$ e 34,25 µg.mL $^{-1}$, 38% (p<0,01) na concentração de 68,5 µg.mL⁻¹ e de 47% (p<0,0001) na concentração de 102,74 µg.mL⁻¹ (Figura 26B). O tratamento com np-ZnO causou redução da viabilidade celular da linhagem U138MG nas duas maiores concentrações (131,5 µg.mL⁻¹ e 197,26 µg.mL⁻¹) em 24 h de tratamento, sendo que as mesmas foram de 37% (p<0.001) e 52% (p<0.0001), maiores que com os demais tratamentos nas mesmas concentrações e tempo de tratamento. A formulação também foi capaz de reduzir a viabilidade celular nas três maiores concentrações em 48 h e 72 h de tratamento, as quais foram de 40% (p<0,001) e 47% (p<0,0001) na concentração de 65.75 ug.mL⁻¹ nos tempos de 48 h e 72 h, respectivamente, de 55% (p<0,0001) e 62% (p<0,0001) nas duas ultimas concentrações em 48 h e de mais de 80% (p<0,0001) nas mesmas concentrações em 72h, também maiores que os demais tratamentos sob as mesmas condições (Figura 26C).

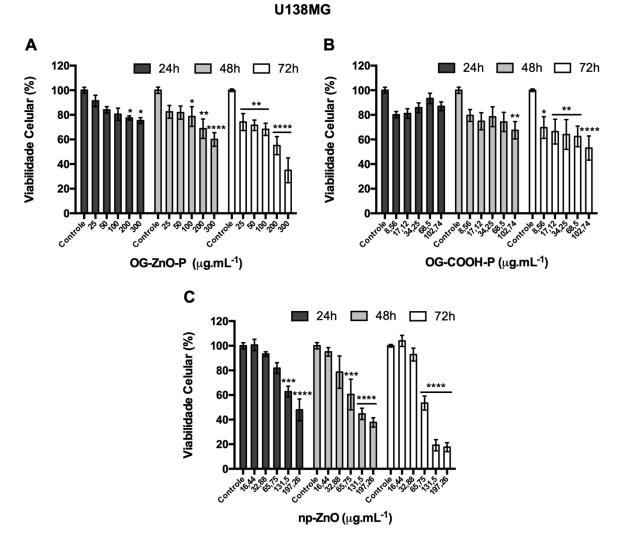


Figura 26 Avaliação da viabilidade celular da linhagem U138MG. Gráficos da viabilidade celular após tratamento com as formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO em diferentes concentrações por 24 h, 48 h e 72 h. Os dados representam a média ± SEM de três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos indicam significância estatística com relação ao grupo controle não tratado, sendo *p<0,05; ***p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001.

A linhagem HNTMC, para todos os tempos de tratamento com OG-ZnO-P, manteve a viabilidade reduzida apenas em concentrações $\geq 200~\mu g.mL^{-1}$, sendo que a menor viabilidade atingida foi próxima de 50% (p<0,0001) com 300 $\mu g.mL^{-1}$ e 72h, o que demonstra uma maior sensibilidade e seletividade pelas linhagens tumorais com o uso dessa formulação (Figura 27A). A linhagem, assim como a linhagem U87MG, se mostrou mais sensível ao tratamento com OG-COOH-P, apresentando uma redução de 25% e 30% (p<0,05) com as concentrações de 17,12 $\mu g.mL^{-1}$ e 34,25 $\mu g.mL^{-1}$ e uma redução de mais de 40% (p<0,0001) nas concentrações de 68,5 $\mu g.mL^{-1}$ e 102,74 $\mu g.mL^{-1}$ e de 50% na concentração de 102,74 $\mu g.mL^{-1}$ em 24 h. Nas concentrações \leq 68,5 $\mu g.mL^{-1}$ após 48 h e 72 h de tratamento, a viabilidade se

manteve próxima ou acima de 70%. Houve uma redução de aproximadamente 50% (p<0001) após 48 h na maior concentração, a qual se manteve após 72h (Figura 27B). A linhagem HNTMC teve sua viabilidade reduzida apenas com as duas concentrações mais altas de np-ZnO, as quais foram de, aproximadamente, 50% (p<0,01) em 24 h, 55% (p<0,001) em 48h e de 70% (p<0,0001) em 72h (Figura 27C).

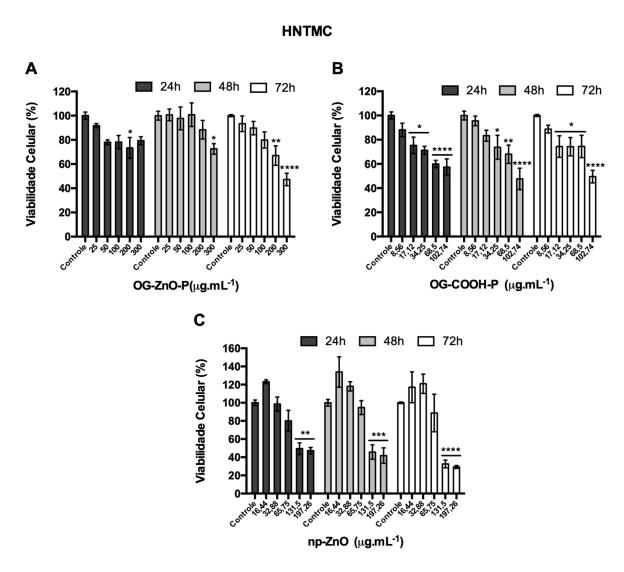


Figura 27 Avaliação da viabilidade celular da linhagem HNTMC. Gráficos da viabilidade celular após tratamento com as formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO em diferentes concentrações por 24 h, 48 h e 72 h. Os dados representam a média ± SEM de três ensaios independentes realizados em triplicata. Os asteriscos indicam significância estatística com relação ao grupo controle não tratado, sendo *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001.

Por meio desses dados e valores de IC50 econtrados (Tabelas 3, 4 e 5), pôde-se observar que as linhagens U87MG e HNTMC foram sensíveis aos tratamentos na seguinte ordem OG-ZnO-P < OG-COOH-P < np-ZnO, enquanto a linhagem U138MG foi mais sensível a OG-ZnO-P < OG-COOH-P < np-ZnO, sendo que para essa linhagem não foi

possível obter valor do IC50 para o tratamento com OG-COOH-P no tempo de 24 h, pois o mesmo não reduziu a viabilidade celular em 50% em nenhuma das concentrações utilizadas. Todas as linhagens foram mais sensíveis ao tratamento com np-ZnO em comparação com o tratamento com OG-ZnO-P. Estudo realizado por Wu e colaboradores (2019) mostrou que OG foi capaz de reduzir a toxicidade de np-ZnO quando administrados combinadamente em linhagem A549 de carcinoma de pulmão humano, possivelmente pelo fato de OG se ligar a membrana celular e reduzir a internalização celular de np-ZnO. Achados similares foram encontrados por De Luna et al. (2016), onde a internalização de óxido de grafeno acoplado a nanopartículas de prata (OG-Ag) por macrófagos foi menor que a nanopartícula livre (AgNp), apesar da toxicidade do nanocompósito ter sido maior.

Os ensaios de viabilidade mostraram que os tratamentos com OG-ZnO-P e np-ZnO aprsentaram seletividade para as linhagens tumorais. O tratamento com OG-ZnO-P foi capaz de reduzir, ao máximo, em 50% (p<0,0001) a viabilidade de HNTMC na concentração de 300 μg.mL⁻¹ em 72h, ao passo que na linhagem U87MG essa redução foi de 87% (p<0,0001) e na linhagem U138MG de 65% (p<0,0001), sendo que a linhagem U87MG conseguiu a mesma redução de 50% (p<0,001) com 100 μg.mL⁻¹ no mesmo tempo e próximo disso (45%) com p<0,01, na concentração de 200 μg.mL⁻¹ em 24h. O tratamento com np-ZnO na concentração de 65,75 µg.mL⁻¹ reduziu a viabilidade em 90% (p<0,0001) da linhagem U87MG e em 47% (p<0,001 e p<0,0001) da linhagem U138MG em 48 h e 72 h de tratamento, no qual a viabilidade de HNTMC se manteve entre 95% e 88%, sendo estatisticamente significativa apenas nas maiores concentrações. Pelos valores de IC50 também foi possível observar que, em geral, a linhagem HNTMC se mostrou mais resistente aos tratamentos com OG-ZnO- P e np-ZnO, apresentando valres de IC50 mais altos comparada as linhagens tumorais. Apesar do óxido de zinco ser considerado seguro pelo FDA, estudos com o material em nanoescala ainda precisam ser elucidados. O excesso de zinco pode ser prejudicial, podendo ocasionar toxicidade neuronal e lesão cerebral, reação inflamatória nos pulmões quando inalados e podem causar um desbalanço metabólico que pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (MALHOTRA E MANDAL, 2016). A incorporação de polímeros ao grafeno, reduzem sua capacidade de se agregar e aumentam sua biocompatibilidade (SHIM et al., 2016). Tendo em vista que os estudos aqui apresentados demonstraram que as formulações OG-ZnO-P e np-ZnO tiveram uma certa seletividade para as linhagens tumorais estudadas, seria interessante também avaliar os efeitos tóxicos de cada uma e assim comparar os seus riscos e benefícios.

A linhagem U87MG foi a que se mostrou mais sensível a todos os tratamentos e é a que possui a maior velocidade de proliferação comparada ao das outras duas linhagens. Um estudo realizado por Taccola et al. (2011), sugere que os mecanismos de toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco podem estar relacionados ao potencial proliferativo de cada célula. No estudo, np-ZnO foram tóxicas para células-tronco mesenquimais, que possuem alta taxa de ploriferação, mas não em linhagem osteogênica diferenciada, que possui uma menor taxa ploriferativa (TACCOLA et al.,2011).

Tabela 3 Concentração em $\mu g.mL^{-1}$ das formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC50) para a linhagem U87MG nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

H87MC

COMIG					
Formulação	24h	48h	72h		
OG-ZnO-P	167	182,6	64,11		
OG-COOH-P	162,6	82,28	56,38		
np-ZnO	52,23	45,15	33,99		

Tabela 4 Concentração em μg.mL⁻¹ das formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC50) para a linhagem U138G nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

U138MG

Formulação	24h	48h	72h
OG-ZnO-P	4186	818,6	198
OG-COOH-P	-	7248	293,7
np-ZnO	185	111,14	75,3

Tabela 5 Concentração em μg.mL⁻¹ das formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC50) para a linhagem HNTMC nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.

HNTMC

Formulação	24h	48h	72h
OG-ZnO-P	13373	418,8	304,4
OG-COOH-P	149,6	110	165,1
np-ZnO	156	148,3	119,2

Para verificar a possibilidade de um efeito sinérgico (quimioterápico e fototérmico) da formulação OG-ZnO-P, as células foram tratadas com OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO nas concentrações de 100 μg.mL⁻¹, 34,25 μg.mL⁻¹ e 65,75 μg.mL⁻¹, respectivamente, visto que nessas concentrações a viabilidade celular não foi expressivamente alterada (> 60%) para os tratamentos com OG-ZnO-P, OG-COOH-P, permitindo se observar o efeito fototérmico na viabilidade desses grupos. O tempo escolhido de irradiação com o laser foi de 3 min de acordo com os resultados obtidos no ensaio de fototermia mediada por OG-COOH, que demonstrou que a partir desse tempo o aumento da temperatura atingia um platô. Os resultados obtidos utilizando esses parâmetros mostraram que no grupo contole não houve diferença na viabilidade celular entre os grupos irradiados e não irradiados, o que se era esperado, e o mesmo resultado foi obtido para os grupos tratados com OG-ZnO-P e OG-COOH-P, sendo que, dos tratamentos propostos, o tratamento com np-ZnO foi o que mais reduziu a viabilidade celular em todas as linhagens (Figura 28).

O efeito da terapia fototérmica depende de diversos fatores, tais como o tempo de incubação que controla o quanto de nanomaterial é internalizado pelas células e está relacionado a diversos outros fatores como características físico-químicas da nanoestrutura e linhagem tumoral utilizada. Outros fatores que podem interferir no resultado são o comprimento de onda utilizado, modulação no tempo, fluência energética e polarização do laser (JAQUE et al., 2014). Sendo assim, novos estudos com a alteração dos parâmetros utilizados talvez forneçam bons resultados.

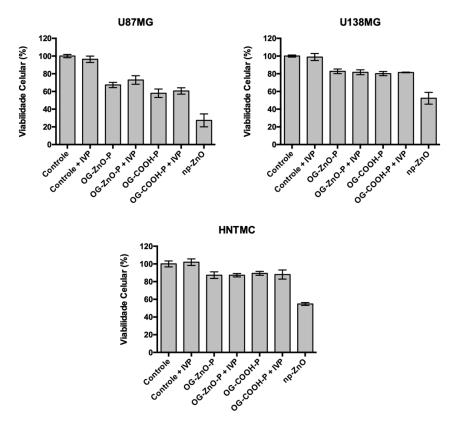


Figura 28 Avaliação da viabilidade celular das linhagens U138MG, U87MG e HNTMC após tratamento por fototermia. Gráficos da viabilidade celular após tratamento com as formulações OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO nas concentações de 100 μg.mL⁻¹; 34,25 μg.mL⁻¹ e 65,75 μg.mL⁻¹, respectivamente, irradiadas ou não com laser de 808 nm. Os dados representam a média ± SEM. p<0,05.

5.6 Alterações morfológicas e internalização celular

Imagens de microscopia óptica (Figuras 29, 30 e 31) mostram que os tratamentos com OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO foram capazes de causar alterações morfológicas nas células. As alterações são mais pronunciadas nos tratamentos com OG-ZnO-P e np-ZnO, onde observa-se uma expressiva redução da densidade celular logo após 24 h de tratamento, porém não parece haver grande diferença entre os tempos de tratamento observados. Entre as alterações são observadas redução do volume celular, alteração da forma fusiforme para mais esférica, perda dos pontos de adesão focal e projeções citoplasmáticas.

A linhagem U138MG mostrou-se mais sensível ao tratamento com np-ZnO comparado ao tratamento com OG-ZnO-P. A linhagem controle HNTMC aparentou sofrer menos alterações morfológicas que as linhagens tumorais U138MG e U87MG após todos os tratamentos. O tratamento com etanol, que foi utilizado para normalizar o tratamento com np-ZnO, nas quais eram diluídas, não foi capaz de causar nenhuma alteração morfológica em nenhuma das linhagens.

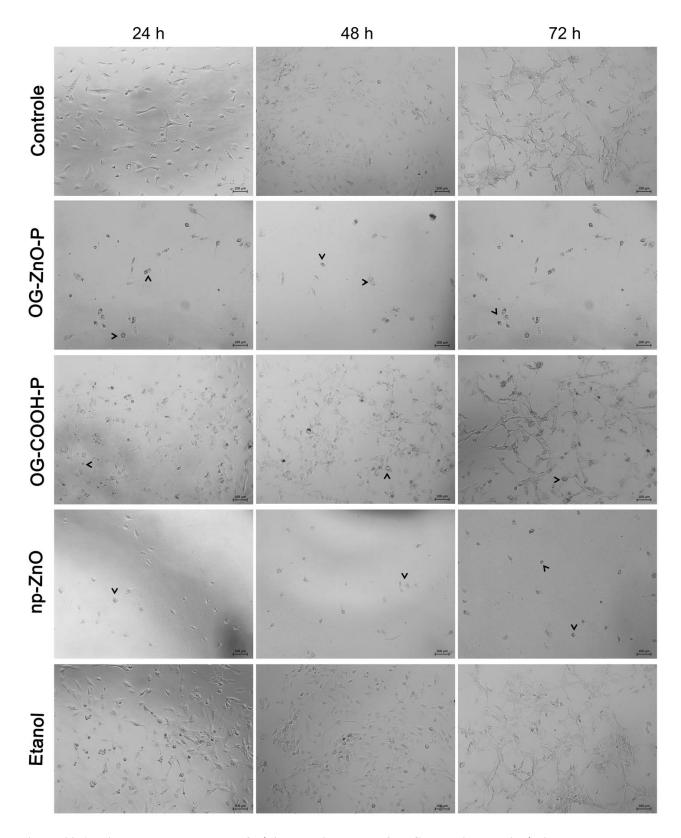


Figura 29 Avaliação de alterações morfológicas da linhagem U87MG por microscopia óptica. As células foram tratadas com OG-ZnO- P (200 $\mu g.mL^{-1}$), OG-COOH-P (68,5 $\mu g.mL^{-1}$), np-ZnO (131,5 $\mu g.mL^{-1}$) e etanol no volume correspondente ao utilizado no tratamento com np-ZnO (0,154% v/v) durante 24 h, 48 h e 72 h. As cabeças de seta indicam a presença de células esféricas (que sofreram alteração morfológica). Barra de escala: 100 μm .

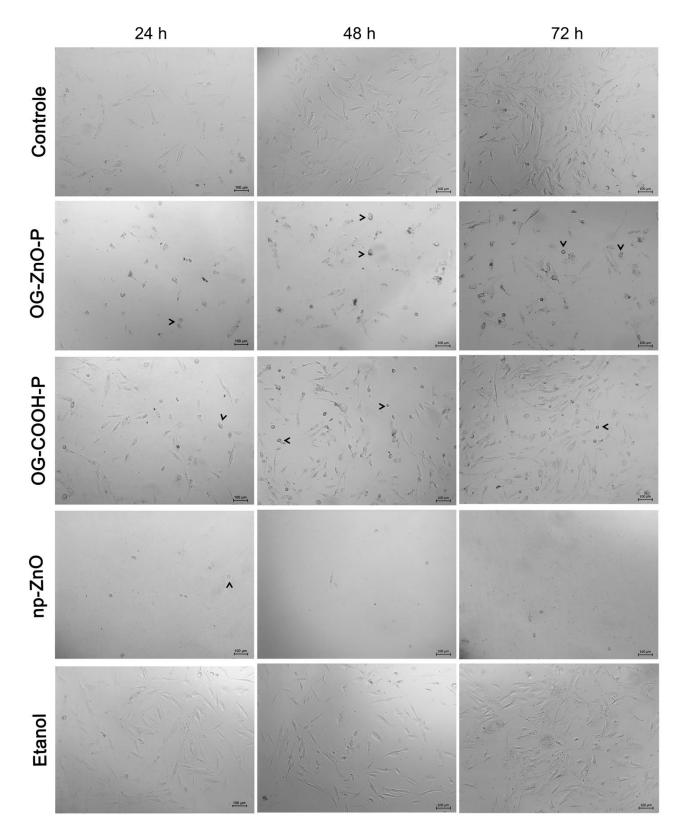


Figura 30 Avaliação de alterações morfológicas da linhagem U138MG por microscopia óptica. As células foram tratadas com OG-ZnO-P (200 $\mu g.mL^{-1}$), OG-COOH-P (68,5 $\mu g.mL^{-1}$), np-ZnO (131,5 $\mu g.mL^{-1}$) e etanol no volume correspondente ao utilizado no tratamento com np-ZnO (0,154% v/v) durante 24 h, 48 h e 72 h. As cabeças de seta indicam a presença de células esféricas (que sofreram alteração morfológica). Barra de escala: 100 $\mu m.$

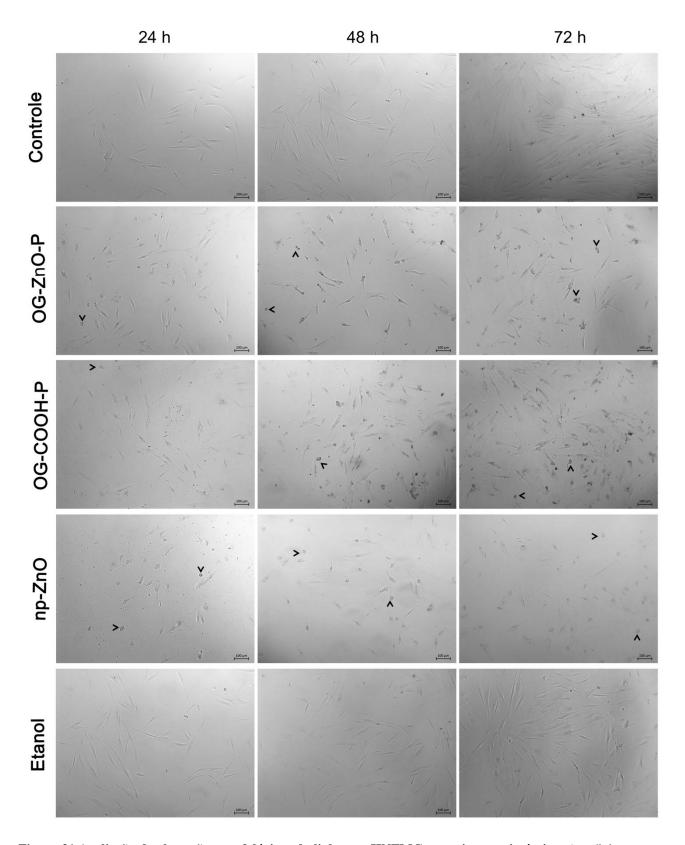


Figura 31 Avaliação de alterações morfológicas da linhagem HNTMC por microscopia óptica. As células foram tratadas com OG-ZnO-P (200 $\mu g.mL^{-1}$), OG-COOH-P (68,5 $\mu g.mL^{-1}$), np-ZnO (131,5 $\mu g.mL^{-1}$) e etanol no volume correspondente ao utilizado no tratamento com np-ZnO (0,154% v/v) durante 24 h, 48 h e 72 h. As cabeças de seta indicam a presença de células esféricas (que sofreram alteração morfológica). Barra de escala: 100 μm .

Para avaliar com mais detalhes as alterações causadas por OG-ZnO-P, formulação sugerida neste trabalho, imagens da superfície celular das linhagens tumorais U138MG e U87MG, as quais se mostraram mais sensíveis ao tratamento, foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura, após tratamento com a formulação na concentração de 200 μg.mL⁻¹ por 24 h. As imagens mostram que o tratamento foi capaz de alterar o tamanho e a forma das células, bem como reduzir os prolongamentos de adesão da linhagem U87MG e foi observado um aumento na rugosidade da membrana celular da linhagem U138MG após o tratamento (Figura 32).

Com o objetivo de verificar a internalização ou a permanência do óxido de grafeno na membrana celular como estudos apresentados por De Luna et al. (2016) e Wu et al. (2019), imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram feitas após tratamento com OG-ZnO-P na concentração de 200 µg.mL⁻¹ por 3 h da linhagem U87MG, a qual se mostrou mais sensível ao tratamento. As imagens mostram que após 3 h de tratamento com OG-ZnO-P as células já são capazes de internalizar a formulação. As imagens permitem observar uma grande quantidade de material próximo a membrana plasmática e a visualização de sua internalização por meio da formação de vesículas. Não foi possível identificar ou diferenciar a presença de nanofolhas de óxido de grafeno (Figura 33).

O principal mecanismo de internalização celular de nanomateriais é a endocitose, mecanismo no qual as moléculas são internalizadas em pequenas vesículas (CANTON E BATTAGLIA, 2012).

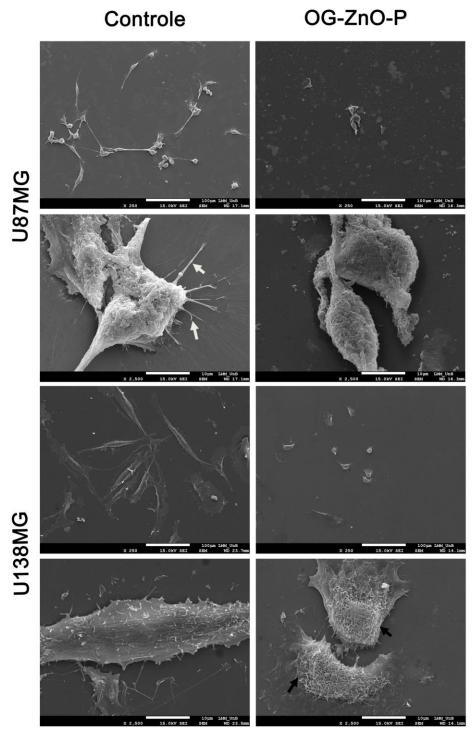


Figura 32 Avaliação morfológica de superfície por microscopia eletrônica de varredura. As imagens mostram células U87MG e U138MG controle (à esquerda) e células tratadas com OG-ZnO-P na concentração de 200 μ g.mL⁻¹ por 24 h (à direita). As setas brancas indicam os pontos de adesão celular e as setas pretas granulações na membrana celular. Barra de escala: 100 μ m (primeira e terceira linha) e 10 μ m (segunda e quarta linha).

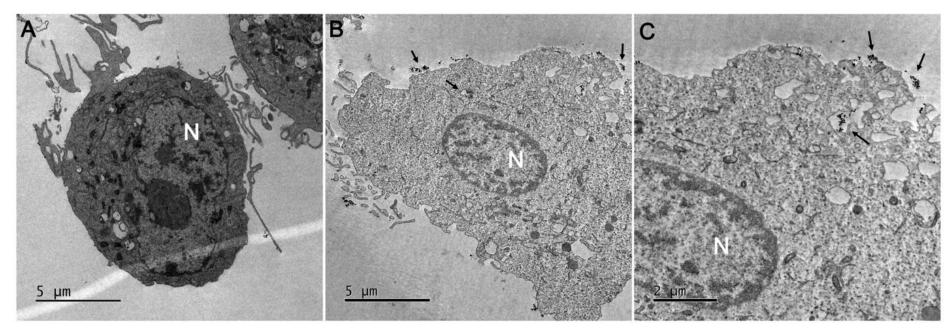


Figura 33 Avaliação da internalização celular de OG-ZnO P por microscopia eletrônica de transmissão. As imagens mostram células U87MG controle não tratadas (A) e células U87MG tratadas com OG-ZnO-P na concentração de 200 μg.mL⁻¹ por 3 h (B e C). As setas pretas indicam a presença de nanopartículas e a formação de vesículas. N (núcleo). Barra de escala: 5 μm (em A e B) e 2 μm (em B).

5.7 Análise de via de morte celular

Dentre os diferentes mecanismos de morte celular, podemos citar duas vias principais, a apoptose e a necrose. As duas vias diferem bastante entre as proteínas envolvidas e as alterações morfológicas causadas nas células. Resumidamente, a morte por apoptose envolve um mecanismo extremamente regulado que envolve o encolhimento citoplasmático, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e é finalizado pela fragmentação da célula em pequenas vesículas (corpos apoptóticos) que são eliminadas por fagocitose sem atingir células vizinhas. Essa via de morte pode ser ativada por duas vias diferentes. A via intrínseca é iniciada pela permeabilização da membrana externa mitocondrial que pode ser ocasionada por alterações microambientais como a redução da sinalização por fatores de crescimento, danos ao DNA, sobreacaraga de espécies reativas de oxigênio e alterações microtubulares ou defeitos mitóticos. A via extrínseca pode ser ocasionada por alterações no microambiente extracelular que ativam receptores de morte ou receptores de dependência (quando há queda do nível do ligante abaixo de um valor limite). A morte por necrose se inicia por perturbações no microambiente extracelular ou intracelular e envolve a ativação de receptores de morte (incluindo receptores diferentes dos envolvidos na apoptose extrínseca) ou de reconhecimento de patógenos e culmina na permeabilização da membrana plasmática, ocasionando um processo inflamatório no local (GALLUZZI et al., 2018).

Para avaliar a via de morte celular induzida pelas formulações utilizadas nos ensaios de viabilidade celular, foi utilizada marcação com Anexina V marcada com a sonda fluorescente ftalocianina (Anexina-V-FITC) e iodeto de propídeo (PI). A anexina possui afinidade pela fosfatidilserina, um fosfolipídeo que é translocado do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática nos estágios iniciais da apoptose. O PI, um intercalante de DNA, não consegue atravessar membranas intactas, porém consegue permear células com membranas danificadas, processo que ocorre na morte por necrose e nos estágios mais tardios da apoptose em ensaios *in vitro*, já que as células não são fagocitadas (PIETKIEWICZ et al., 2015).

A avaliação da via de morte celular induzida por OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO após 72 h, verificada por citometria de fluxo, indicou que os tratamentos com OG-ZnO-P e np-ZnO causaram uma morte induzida predominantemente por apoptose tardia em ambas as linhagens estudadas (U138MG e U138MG). A não detecção de células em apoptose inicial pode ser explicada pela escolha do tempo de tratamento, talvez tempos menores permitissem

essa observação com uma população maior de células com a membrana intacta. O tratamento com OG-COOH-P reduziu menos a viabilidade celular em ambas as linhagens e induziu morte estatisticamente maior, por apoptose tardia, apenas na linhagem U87MG (Figuras 34A e 34B).

Diversos estudos com np-ZnO têm demonstrado a sua capacidade de induzir morte celular por apoptose em diferentes linhagens celulares, incluindo câncer de mama (CHAKRABORTI et al., 2016; MOGHADDAM et al., 2017), gliomas (OSTROVSKY et al., 2009), melanoma (ALARIFI et al., 2013) e mioblastoma (CHANDRASEKARAN E PANDURANGAN, 2015). Todos os estudos, exceto o de MOGHADDAM et al. (2017) mostram uma correlação dessa via de morte celular com a geração de espécies reativas de oxigênio. A maioria dos estudos indica que também ocorre a ativação de várias proteínas envolvidas na via de morte apoptótica, bem como a indução de peroxidação lipídica e danos ao DNA (ALARIFI et al., 2013; CHANDRASEKARAN E PANDURANGAN, 2015; CHAKRABORTI et al., 2016; MOGHADDAM et al., 2017). Alguns estudos ainda indicam a redução da expressão de proteínas anti-apoptóticas (CHANDRASEKARAN PANDURANGAN, 2015; MOGHADDAM et al., 2017) e de enzimas antioxidantes (ALARIFI et al., 2013).

Em estudo conduzido por Wu et al. (2019), a co-administração de OG com no-ZnO, reduziu efeitos das nanopartículas sozinhas como a produção de ROS, despolarização mitocondrial, danos na membrana e danos metabólicos. Nos resultados obtidos no presente estudo, não foram observadas diferenças no perfil de morte induzidada entre as formulações OG-ZnO-P e np-ZnO, o que sugere que a presença de OG não impactou na indução de apoptose por np-ZnO, porém mais estudos envolvendo essas vias são necessários para confirmar tal hipótese.

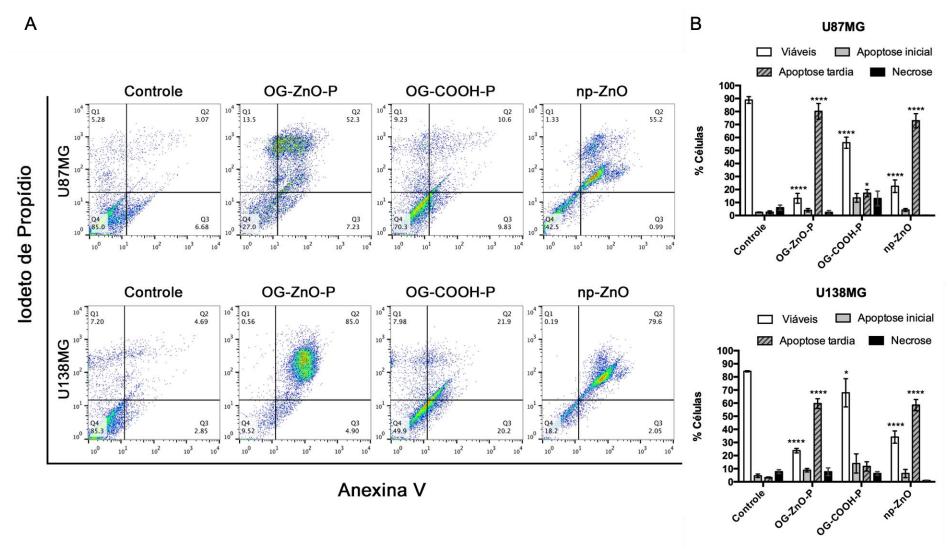


Figura 34 Avaliação da via de morte celular induzida por OG-ZnO-P, OG-COOH-P e np-ZnO nas linhagens U87MG e U138MG após 72 h de tratamento. (A) Distribuição das populações celulares de acordo com o perfil das marcações com Anexina e PI da seguinte maneira: quadrante inferior esquerdo (células viáveis), quadrante inferior direito (apoptose inicial), quadrante superior esquerdo (necrose), quadrante superior direito (apoptose tardia). (B) Representação gráfica dos perfis de morte. Os dados 10^{3} representam média SEM de três ensaios independentes com eventos cada. *p<0,05 ****p<0,0001.

Ao contrário da apoptose, onde as células são fagocitadas sem causar nenhum dano às células vizinhas, a morte celular necrótica libera sinais pró-inflamatórios no microambiente do tecido circundante (HANAHAN E WEINBERG, 2011; GALLUZZI et al., 2018). Como consequência, a via de morte por necrose pode ocasionar o recrutamento de células inflamatórias do sistema imunológico, as quais possuem uma atuação conflitante na eliminação de células tumorais, com diversos estudos mostrando que podem promover a angiogênese, a proliferação e a invasão de células cancerígenas. Além disso, as células necróticas podem liberar citocinas, espécies reativas de oxigênio, fatores de crescimento, fatores de sobrevivência, fatores pró-angiogênicos e enzimas modificadoras de matriz extracelular que facilitam a angiogênese, invasão e metástase. Desse modo, apesar de ajudar a manter a hiperproliferação associada ao câncer, a morte celular necrótica pode, em última análise, causar mais danos do que benefícios (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

6. CONCLUSÃO

A realização desse projeto propôs a síntese e a caracterização de nanofolhas de óxido de grafeno conjugadas com nanopartículas de óxido de zinco e a avaliação da atividade sinérgica (quimioterápica e fototérmica) da formulação, bem como a comparação do tratamento com os constituintes livres da formulação (oxido de grafeno carboxilado e nanoparticulas de óxido de zinco) por meio de ensaios de citotoxicidade celular causada pelas formulações em linhagens tumorais U87MG e U138MG e linhagem não tumoral HNTMC, bem como avaliação da citotoxicidade mediada por fototermia.

Espectros FT-IR e imagens de MET e MEV confirmaram a síntese do nanocompósito. Além disso, por meio de espectroscopia RAMAN e UV-Vis, foi possível observar que após etapa de carboxilação ocorre um processo de redução (aumento da proporção de domínios sp2/sp3) das nanofolhas de OG e também uma redução no tamanho das nanofolhas, observadas por MFA. As formulações OG-ZnO-P e OG-COOH-P apresentaram boa estabilidade coloidal avaliada até 180 dias de estocagem.

Espectros UV-Vis também demonstraram que a incorporação do polímero pluronic F127 não alterou as transições eletrônicas das formulações e estudos de estabilidade mostraram que a incorporação do polímero melhorou a dispersão das formulações em água deionizada e meio de cultivo celular DMEM, bem como reduziu a precipitação das mesmas quando submetidas à condições experimentais de cultivo celular.

Ensaios de viabilidade celular demonstraram que as linhagens U87MG e HNTMC foram sensíveis aos tratamentos na seguinte ordem OG-ZnO-P < OG-COOH-P < np-ZnO e a linhagem U138MG na seguinte ordem OG-COOH-P < OG-ZnO-P < np-ZnO. Todos os tratamentos se mostraram mais dose que tempo dependente. Os resultados também mostraram que a linhagem U87MG foi a mais sensível a todos os tratamentos e a linhagem HNTMC foi menos sensível aos tratamentos com OG-ZnO-P e np-ZnO que as linhagens tumorais. Nenhum aumento da citotoxicidade foi observado após fototermia.

Os tratamentos foram capazes de causar alterações morfológicas na seguinte ordem OG-COOH-P < OG-ZnO-P < np-ZnO em todas as linhagens. Imagens obtidas por MEV revelaram que o tratamento com OG-ZnO-P foi capaz de induzir alterações nos prolongamentos de adesão e rugosidade da membrana celular das linhagens tumorais.

Imagens obtidas por MET mostraram que após 3 h de tratamento com OG-ZnO-P, a formulação já consegue ser internalizada e que a internalização ocorre por meio de vesículas.

Por meio de estudos da via de morte celular, observou-se que as formulações induzem morte celular por apoptose tardia nas linhagens tumorais estudadas após 72 h de tratamento, sendo bem mais expressiva nos tratamentos com OG-ZnO-P e np-ZnO.

Em resumo, a síntese do compósito foi bem-sucedida e o mesmo demonstrou possuir uma boa estabilidade coloidal. A formulação, assim como np-ZnO, demonstrou possuir seletividade para as linhagens tumorais estudadas, tanto nos ensaios de viabilidade quanto na avaliação das alterações morfológicas e foi capaz de induzir morte por apoptose, fatos que podem ser mais bem explorados para uma melhor comparação entre os dois tratamentos. Porém o efeito sinérgico (quimioterápico e fototérmico) não foi alcançado, sendo necessários mais estudos por meio da variação dos parâmetros utilizados para tal objetivo.

7. PERSPECTIVAS

Como os resultados obtidos mostratram que a formulação OG-ZnO-P teve uma performance inferior a np-ZnO, um dos objetivos futuros seria avaliar a concentração de zinco intracelular para verificar se a presença do óxido de grafeno seria capaz de reduzir a internalização das nanopartículas de zinco presentes na formulação. Avaliar também se há alguma interferência na produção de espécies reativas de oxigênio, já que é o principal mecanismo de morte celular proposto para essas nanopartículas.

Para a aplicação de um tratamento antineoplásico o mesmo deve ser eficaz e seletivo contra células tumorais e ao mesmo tempo não deve apresentar efeitos adversos sobressalentes. Tendo em vista que os estudos aqui apresentados demonstraram que as formulações OG-ZnO-P e np-ZnO tiveram uma certa seletividade para as linhagens tumorais estudadas, seria interessante também avaliar os efeitos tóxicos, como alterações hematológicas e histopatológicas, de cada formulação e assim comparar os riscos e benefícios de cada uma.

Outra perspectiva proposta seria avaliar os efeitos fototérmicos em diferentes tempos de incubação e de irradiação do laser para as linhagens testadas, bem como a realização desses estudos *in vivo*, visto que como já observado por estudos fototérmicos realizados por nosso grupo de pesquisa (SOUSA et al., 2018), os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* podem variar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDAPE K., ZADEH G., MANSOURI S. ET AL. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. Acta Neuropathol, v.129, p.829–848. 2015.

ALARIFI S., ALI D., ALKAHTANI S. Inducion of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. Int J Nanomedicine, v. 8, p. 983-993. 2013.

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION (ABTA). Glioblastoma & Anaplastic Astrocytoma. ABTA, v.1, p. 1-17. 2018.

AMIRIAN E. S., ZHO R., WRENSCH M. R., ET AL. Approaching a Scientific Consensus on the Association between Allergies and Glioma Risk: A Report from the Glioma International Case-Control Study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., v.25, n.2, p.282–290. 2016.

ANDERS C. B., CHESS J. J., WINGETT D. G., PUNNOOSE A. Serum proteins enhance dispersion stability and influence the cytotoxicity and dosimetry of ZnO nanoparticles in suspension and adherent cancer cell models, *Nanoscale Res. Lett.*, v. 10, n. 448, p. 1-22. 2015.

ARVANITIS C. D., FERRARO G., JAIN R. K. The blood-brain barrier and blood-tumor barrier in brain tumors and metastases. Nature Reviews Cancer, v. 20, n. 1, p. 26-41. 2020.

AVRAMESCU M. L.; RASMUSSEM P. E., CHÉNIER M. Influence of pH, particle size and crystal form on dissolution behaviour of engineered nanomaterials. Eviron Sci Pollut Res Int, v. 24, n. 2, p. 1553-1564. 2016.

BENKE G., TURNER M. C., FLEMING S., ET AL. Occupational solvent exposure and risk of glioma in the INTEROCC study. Br. J. Cancer, v.117, p.1246–1254. 2017.

BIAN S. W.; MUDUNKOTUWA I. A.; RUPASINGHE T. Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environmentes: Influence of pH, Ionic Strength, Size and Adsorption of Humic Acid. Lagmuir, v. 27, n. 10, p. 6059-6088. 2011.

BOLLIG-FISCHER A., MICHELHAUGH S. K., ALI-FEHMI R., MITTAL S. The molecular genomics of metastatic brain tumors. OA Molecular Oncology, v.1, n.1, p. 1-18. 2013.

BRAY F., FERLAY J., SOERJOMATARAM I. Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA CANCER J CLIN, v. 68, n. 6, p. 394-424. 2018.

CANTON I. E BATTAGLIA G. Endocytosis at the nanoscale. Chem. Soc. Rev., v. 41, p. 2718-2739, 2012.

CAO L.; KIELY J.; PIANO M. ET AL. Facile and inexpensive fabrication of zinc oxide based bio-surfaces for C-reactive protein detection. Scientific Reports, v. 8, n. 12687, p.1-9. 2018.

- CHAKRABORTI S., CHAKRABORTY S., SAHA S. PEG-functionalized zinc oxide nanoparticles induce apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species-dependent impairment of DNA damage repair enzyme NEIL2. Free Radic Biol Med, v. 103, p. 35-47. 2016.
- CHANDRASEKARAN M. E PANDURANGAN M. In Vitro Selective Anti-Proliferative Effect of Zinc Oxide Nanoparticles Against Co-Cultured C2C12 Myoblastoma Cancer and 3T3-L1 Normal Cells. Biol Trace Elem Res, v. 172, p. 148–154. 2016.
- CHAPMAN S., AZIZI L., LUO Q. E SITAS F. Has the incidence of brain cancer risen in Australia since the introuction of mobile phones 29 years ago? Cancer Epidemiol, v.42, p.199–205. 2016.
- DANAEI M.; DEHGANKHOLD S.; ATAEI F. ET AL. Impact pf Particle Size and Polydispesity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics, v. 10, n. 57, p. 1-17. 2018.
- DE LUNA L. A. V.; MORAES A. C. M.; CONSONNI C. D. P. ET AL. Comparative in vitro toxicity of a graphene oxide-silver nanocomposite a pristine counterparts toward macrophages. J Nanobiotechnol, v. 14, n. 12, p. 1-17. 2016.
- DE MELO D. D., SOUSA L. R., ALVES C. G, CORREIA I. J. Graphene family nanomaterials for application in cancer combination photothermal therapy. Biomater. Sci., v. 7, n. 9, p. 3534-3551. 2019.
- DING LI ET AL. Advances for studying clonal evolution in cancer. Cancer letters, v.340, n.2, p.212-219. 2013.
- DOLMANS D. E. J. G. J., FUKUMURA D., JAIN R. K. Photodynamic therapy for cancer. Nature Reviews Cancer, v. 3, n. 5, p. 380–387. 2003.
- ESKIIZMIR G.; BASKIN Y. E YAPICI K. Graphene-based nanomaterials in cancer treatment and diagnosis. In: . Fullerens, Graphenes And Nanotubes A Pharmaceutical Approach. Elsevier, 2018. Cap 9., p. 331-374.
- ESTELRICH J. E BUSQUETS M. A. Iron Oxide Nanoparticles in Photothermal Therapy. Molecules, v. 23, n. 1567, p.1-26. 2018.
- FRISE A. E., PAGES G., SHTEIN M. ET AL. Polymer Binding to Carbon Nanotubes in Aqueous Dispersions: Residence Time on the Nanotube Surface As Obtained by NMR Diffusometry. J. Phys. Chem. B, v. 116, p.2635–2642. 2012.
- GALLUZZI L., VITALE I., AARONSON S. A. Molecular mechanisms of cell death: recommendation of the Nomeclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ, v. 25, n. 3, p. 486-541. 2018
- GLOBOCAN 2018. Graph production: Global Cancer Observatory (http://gco.iarc.fr/). International Agency for Research Cancer 2020.

- GREAVES M. e MALEY C. C. Clonal evolution in cancer. Nature, v.481, n.7381, p. 306–313. 2012.
- GROSS M. A. ET AL. ZnO nanoparticles-graphene oxide-reduced graphene oxide thin films assembled layer-by-layer through non-electrostatic interactions. Mater. Res. Express, v. 6, n.9, p. 1-15. 2019.
- HANAHAN G. E WEINBERG R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, v. 144, p. 646-674. 2011.
- HANIF F., MUZAFFAR K., PERVEEN K. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatmennt. Asian Pac J Cancer Prev, v. 18, n.1, p. 3-9. 2017.
- HSIAO I. E HUANG Y. Effecets of sérum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles. J Nanopart Res, v. 15, n. 1829, p. 1-16. 2013.
- HU W., PENG C., LV M. ET AL. Protein Corona-Mediated Mitigation of Cytotoxicity og Graphene Oxide. ACS Nano, v. 5, n. 5, p. 3693-3700. 2011.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil, 2019. Disponível em: < https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf Acesso em: 20 de Fev. 2019.
- INTERPHONE STUDY GROUP. Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study. Int. J. Epidemiol, v.39, p.675–694. 2010.
- JAQUE D., MAESTRO L. M., DEL ROSAL B. ET AL. Nanoparticles for photothermal therapies. Nanoscale, v. 6, p. 9494–9530. 2014.
- JENA L., McERLEAN E. E McCARTHY H. Delivery across the blood-brain barrier: nanomedicine for glioblastoma multiforme. Drug. Deliv. and Transl. Res., v. 10, p. 304-318. 2020.
- JIANG J. PI J. E CAI J. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. Bioinorganic Chemistry and Applications, v. 2018, p. 1-18. 2018.
- LACHANCE D. H., YANG P., JOHNSON D. R. ET AL. Associations of high-grade glioma with glioma risk alleles and histories of allergy and smoking. Am J Epidemiol, v.174, n.5, p.574–581. 2011.
- LI D., MULLER M. B., GILJE S. ET AL. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. Nature Nanotechnology, v. 3, n. 2, p. 101-105. 2008.
- LIU G., SHEN H., MAO J. Transferrin modified graphene oxide for glioma- targeted drug delivery: in vitro and in vivo evaluations. ACS Appl. Mater. Interfaces, v. 5, p. 6909-6914. 2013.

LOMBARDO D., KISELEV M. A., CACCAMO M. Smart Nanoparticles For Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. Journal of Nanomaterials, v. 2019, p. 1-26. 2019.

LU Y.J., YANG H.-W., HUNG S.C. Improving thermal stability and efficacy of BCNU in treating glioma cells using PAA-functionalized graphene oxide. Int. J. Nanomedicine, v. 7, p. 1737–1747. 2012.

LULL M. E. E BLOCK M. L. Microglial activation and chronic neurodegeneration. Neurotherapeutics, v. 7, n. 4, p. 354-365. 2010.

MALHOTRA S. P. K. E MANDAL T. K. Biomedical Application of Zinc Oxide Nanomaterials in Cancer Treatment: A review. SCIREA Journal of Chemistry, v. 1, n. 2, p. 67-89, 2016.

MASSERINI, M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. ISRN Biochemistry, v. 2013, 18 p. 2013.

McCALLION C., BURTHEM J. RESS-UNWIN K., ET AL. Graphene in therapeutics delivery: Problems, solutions and future opportunities. European Journal of Pharmaceutics, v. 104, p. 235-250. 2016.

MELAMED J. R., EDELSTEIN R. S., DAY E. S. Elucidating the Fundamental Mechanisms of Cell Death Triggered by Photothermal Therapy. ACS Nano, v.9, n.1, p.6–11. 2015.

MELEAN G., SESTINI R., AMMANNATI F., PAPI L. Genetic insights into familial tumors of the nervous system. Am J Med Genet C Semin Med Genet, v.129, n.1, p.74-84. 2004.

MENDONÇA M. C. P., SOARES E. S, JESUS M. B. Reduced graphene oxide induces transient blood-brain barrier opening: an in vivo study. J. Nanobiotechnol., v. 13, n. 78, p. 1-13. 2015.

MEULENKAMP, E. A. Synthesis and Growth of ZnO Nanoparticles. J. Phys. Chem. B, v. 102, p. 5566-5572. 1998.

MENEZES, H.C. Preparação, caracterização e avaliação de nanoesferas poliméricas contendo o fotossensibilizadores e nano tubo de carbono ferromagnético para aplicação em Terapia Fotodinâminca e Hipertermia contra o câncer. Ribeirão Preto, 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo.

MINCHINTON A. I. E TANNOCK I. F. Drug penetration in solid tumors. Nature Reviews, v.6, p. 583-592. 2006.

MIRANDA A.; FIGUEIRAS A. R. R. Aplicações da nanotecnologia em doenças do foro neurológico: vantagens e desafios. Boletim Informativo Geum, v.5, n.4, p. 14-30, out./dez. 2014.

MIRZAEI H., DARROUDI M. Zinc oxide nanoparticles: Biological synthesis and biomedical applications. Ceramics International, v. 43, p. 907–914. 2017.

- MOGHADDAM A. B., MONIRI M., AZIZI S. Eco-Friendly Formulated Zinc Oxide Nanoparticles: Indution of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in the MCF-7 Cancer Cell Line. Genes (Basel), v. 8, n. 10, p. 1-15. 2017.
- NOWELL P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. Science, v.194, p.23–28. 1976.
- OCHEKPE, N.A.; OLORUNFEMI, P.O.; NGWULUKA, N. C. Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, Nigeria, v. 8, n. 3, p. 265-274, 2009.
- OLIVEIRA A. E. F., PEREIRA A. C., BETTIO G. B., TARLEY C. R. T. Síntese e Caracterização Estrutural da Redução Térmica e com Hidrazina do Óxido de Grafeno por Espectroscopia Raman e Espectroscopia de Infravermelho. Rev. Virtual Quim, v.11, n.3, p. 866-877. 2019.
- OSTROM Q. T., CIOFFI G., GITTLEMAN H., PATIL N. ET AL. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012–2016. Neuro Oncol, v.21, n. 5, p. 1–100. 2019.
- OSTROM Q. T., BAUCHET L., DAVIS F. G., ET AL. The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. Neuro. Oncol., v.16, p.896–913 .2014.
- OSTROVSKY S., KAZIMIRSKY G., GEDANKEN A., BRODIE C. Selective Cytotoxic Effect of ZnO Nanoparticles on Glioma Cells. Nano Res, v. 2, p. 882-890. 2009.
- PAOLILLO M., BOSELLI C., SCHINELLI S. Glioblastoma under Siege. An Overview of Current Therapeutic Strategies. Brain Sci, v. 8, n. 1, p. 1-13. 2018.
- PARENT M. -E., TURNER M., LAVOUÉ J., ET AL. Lifetime occupational exposure to metals and welding fumes, and risk of glioma: a 7-country population-based case—control study. Environ. Heal., v.16, p.90. 2017.
- PERRY A.; WESSELING P. Histologic classification of gliomas. Handbook of Clinical Neurology, v. 134, p. 71-92, 2016.
- PERRY J. L.; REUTER K. G.; LUFT J. C. Mediating Passive Tumor Accumulation through Particle Size, Tumor Type and Location. American Chemical Society, v. 17. n. 5, p. 2879-2886. 2017.
- PIETKIEWICZ S., SCHMIDT J. H., LACRIK I. N. Quantification of apoptosis and necroptosis at sibgle cell level by a combination of Imagin Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. J Immunol. Methods, v. 423, p. 99-103. 2015.
- ROBBINS. Neoplasias. In: . Patologia básica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap 5., p. 161-213.
- RUDER, A. M., YIIN J. H., WATERS M. A., ET AL. Exposure to farm crops, livestock, and farm tasks and risk of glioma. Am. J. Epidemiol., v.169, p.1479–1491. 2009.

SARKARIA J. N., HU L. S., PARNEY I. Is the blood-braisn barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. Neuro Oncol, v. 20, n. 2, p. 184-191. 2017.

SAHU A., CHOI W., LEE J. H. ET AL. Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. Biomaterials, v. 34, p. 6239-6248. 2013..

SANTOS M. S. C., GOUVEA A. L., MOURA L. D. ET AL. Nanographene oxide-methylene blue as phototherapies platform for breast tumor ablation and metastasis prevention in a syngeneic orthotopic murine model. J Nanobiotechnol, v. 16, n. 9, p 1-17. 2018

SHIM G.; KIM M. G.; PARK J. Y. ET AL. Graphene-based nanosheets for delivery of chemotherapeutics and biological drugs. Advanced Drug Delivery Reviews, v.1, n. 105, p. 205-227. 2016.

SOUTO C. R. O. E DUARTE H. C. Química da vida. Natal, RN, : EDUFRN, 2006. 372p.

STETEFELD J.; McKENNA S.; PATEL T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Biophys Ver, v. 8, p. 409–427. 2016.

SURYADEVARA R. ET AL. Tumors of the Central Nervous System: Anatomy and Interventional Considerations. In: Kesharwani P. E Gupta U. Nanotechnology-based targeted drug delivery systems for brain tumors. 1^a ed. Elsevier. 2018. Cap.1, p.1-26.

TACCOLA L., RAFFA V., RIGGIO C. Zinc oxide nanoparticles as selective killers of ploriferating cells. Int J Nanomedicine, v. 6, p. 1129-1140. 2011.

THE ROYAL SOCIETY & THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. Londres: Royal Society, 116 p. 2004.

XING WEI-KANG ET AL. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. Drug Design, Development and Therapy, v. 9, p. 3341–3348. 2015.

WAHAB R., KAUSHIK N. K., VERMA A. K. ET AL. Fabrication and growth mechanism of ZnO nanostructures and their cytotoxic effect on human brain tumor U87, cervical cancer HeLa, and normal HEK cells. J Biol Inorg Chem, v. 16, p. 431–442. 2011.

WAHAB, R. ET AL. ZnO nanoparticles induces cell death in malignant human T98G gliomas, KB and non-malignant HEK cells. J. Biomed. Nanotechnol., v. 9, p.1181–1189. 2013.

WANG H., GU W. XIAO N. ET AL. Chlorotoxin-conjugated graphene oxide for targeted delivery of an anticancer drug. Int. J. Nanomedicine, v. 9, p. 1433-1442. 2014.

WELCH D. R. E HURST D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. Cancer Res, v. 79, n.12, p.3011-3027. 2019.

WEISSLEDER, R. A clearer vision for in vivo imaging. Nature Biotechnology, v. 19, n. 4, p. 316–317. 2001.

WU B.; WU J.; LIU S. ET AL. Combined effects of graphene oxide and zinc oxide nanoparticle ob human A549 cells: Bioavailability, toxicity and mechanisms. Environ. Sci.: Nano, v. 6, n.2, p. 1-31. 2019.

YAN Y., PIAO L., KIM S. ET AL. Effect of Pluronic block copolymers on aqueous dispersions of graphene oxide. RSC Adv., v. 5, p. 40199–40204. 2015.

YANG K, ZHANG S, ZHANG G, SUN X, LEE ST, LIU Z. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. Nano Lett., v. 10, p. 3318–3323. 2010.

YANG X, WANG Y, HUANG X, ET AL. Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity. J Mater Chem., v. 21, p. 3448–3454. 2011.

ZHANG W, GUO Z, HUANG D, ET AL. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide. Biomaterials, v. 32, p. 8555-8561. 2011.

ZHANG W. Nanoparticle aggregation: principles and modeling. Adv Exp Med Biol, v. 811, p. 19-43. 2014.

ZHANG B., WANG Y., ZHAI W. Biomedical applications of the graphene-based materials. Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl, v. 61, p. 953-964. 2015.

ZHOU T., ZHOU X., XING D. Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier. Biomaterials, v. 35, p. 4185-4194. 2014.