

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

GIULIA DOS SANTOS PEDROSO FIDELIS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA TEMOZOLOMIDA
ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM LINHAGEM
CELULAR DE CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA.**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2021

GIULIA DOS SANTOS PEDROSO FIDELIS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA TEMOZOLOMIDA
ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM LINHAGEM
CELULAR DE CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F451a Fidelis, Giulia dos Santos Pedroso.

Avaliação da citotoxicidade da temozolomida associada a nanopartículas de ouro em linhagem celular de câncer de pele do tipo melanoma / Giulia dos Santos Pedroso Fidelis. - 2021.

76 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2021.

Orientação: Ricardo Andrez Machado de Ávila.

1. Temozolomida - Efeito fisiológico. 2. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico. 3. Melanoma - Tratamento. 4. Antineoplásicos. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



unesc

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pela candidata **GIULIA DOS SANTOS PEDROSO FIDELIS**, sob o título “**AValiação da Citotoxicidade da Temozolomida associada a Nanopartículas de Ouro em Linhagem Celular de Câncer de Pele do Tipo Melanoma B16F10**” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

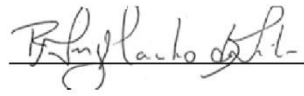
Criciúma, SC, 09 de dezembro de 2021.

Profa. Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO
Membro Interno – UNESC

Profa. Dra. STEPHANIE STRANSKY LAUAR
Membro Externo – Albert Einstein College of Medicine USA

Prof. Dr. EDUARDO ANTÔNIO FERRAZ COELHO
Membro Externo – UFMG



Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila
Orientador



Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

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

Dedico esse trabalho aos meus pais e avós que sempre me fizeram acreditar que eu era capaz de chegar até aqui, mas principalmente ao meu marido, que tem sido o meu amor e melhor amigo nos últimos 13 anos e além.

AGRADECIMENTOS

Meus primeiros agradecimentos sempre serão para minha família, pois eles foram os pilares para chegar até aqui. Em especial meu marido Filipe, amor da minha vida, que me acompanhou desde o início da minha carreira acadêmica.

As minhas melhores amigas que não me deixaram surtar (muito) até aqui (porque um pouco de surto sempre tem): Bruna, Fran, Hemelin (aqui o surto foi literário, então ok), Iri, Natiele e Monike (que estava no começo, não estava no meio, mas está no final, mas isso é história pra outra tese).

Aos amigos que fiz na UNESC, em especial ao Gustavo e a Nathalia, que sempre estiveram ali, prontos pra me ajudar em qualquer momento ou ocasião, e também pra uma boa fofquinha, rs. Aos meus colegas de laboratório, em especial Ellen, Jonathann, Maria Eduarda e Rahisa que ajudaram e muito pra que esse trabalho acontecesse, mas também a todos os outros que de alguma forma foram importantes nessa caminhada.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram realizados todos os testes de caracterização do tratamento aqui utilizado, em especial ao professor Dr. Paulo Feuser que me ajudou nesse trabalho do início ao fim. A Capes/Proex/CNPq por apoiar essa pesquisa através da concessão de bolsa de estudo.

Por fim agradeço ao meu orientador Dr. Ricardo Andrez Machado de Avila, por me dar todo o suporte necessário para chegar até aqui, e por todos os “calma Giulia” ditos nesses quase 4 anos.

Obrigada a todos!

***“...There's nothin' wrong with lovin' who you are
She said: 'Cause He made you perfect, babe
So hold your head up, girl, and you'll go far...”
Stefani Joanne Germanotta***

RESUMO

O câncer de pele do melanoma, em sua forma maligna, representa a forma mais agressiva e letal de câncer de pele. A quimioterapia é utilizada no tratamento de pacientes com melanoma estágio IV, no entanto, mesmo reduzindo o tamanho dos tumores, o seu efeito muitas vezes é apenas temporário e podem ocorrer efeitos colaterais severos. A Temozolomida (TMZ) tem sido prescrita devido à facilidade de administração, tolerabilidade e capacidade conhecida de atravessar a barreira hematoencefálica. Por outro lado, a mesma já mostrou hemotoxicidade limitadora de dose e uma rápida hidrólise, o que acaba por limitar sua eficácia antitumoral. Em outra mão, estudos recentes têm mostrado que nanopartículas de ouro (NPAu), com sua biocompatibilidade e potencial citotóxico em células tumorais, podem vir a ser combinadas com drogas quimioterápicas através de adsorção eletrostática ou ligações covalentes, podendo levar a um aprimoramento cooperativo no tratamento já existente. Com isso o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do TMZ associado a NPAu (TNPAu) em linhagem celular de câncer de pele do tipo melanoma B16F10, bem como em células saudáveis NIH3T3. Para isso, NPAu foram sintetizadas nos tamanhos de 10, 20 e 30 nm, pelo método de redução de citrato e associadas a TMZ por agitação. Em seguida foram caracterizadas por espectrofotometria ultravioleta-visível, microscopia eletrônica de transmissão, índice de polidispersão, potencial zeta e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. A seguir os efeitos citotóxicos do TMZ, NPAu e TNPAu foram avaliados através do teste de MTT, utilizando diferentes concentrações nos períodos de 24, 48 e 72 horas. A concentração inibitória e o índice de combinação (sinergia) foram calculadas logo após. Avaliou-se também a hemotoxicidade da TMZ e TNPAu através do teste de hemólise, bem como o mecanismo de morte celular por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que houve uma interação eletrostática entre TMZ e NPAu, não alterando o tamanho e a forma das NPAu. Além disso, a TNPAu foi mais citotóxica em células B16F10, mas não em células NIH3T3, do que a TMZ sozinha. O tratamento conjunto teve um efeito sinérgico e também hemocompatível. Finalmente, a TNPAu levou as células B16F10 à apoptose tardia quando comparadas ao controle. Tomados em conjunto nossos resultados mostraram que o uso da TNPAu levou a resultados melhores em relação a citotoxicidade e hemocompatibilidade em células B16F10 com concentrações mais baixas de TMZ, bem como se mostrou eficiente na indução de morte celular por apoptose quando comparado ao controle.

Palavras-chaves: antineoplásicos, melanoma, temozolomida, nanopartículas de ouro, B16F10, NIH3T3.

ABSTRACT

Melanoma skin cancer, in its malignant form, represents the most aggressive and lethal form of skin cancer. Chemotherapy is used to treat patients with stage IV melanoma, however, even reducing the size of tumors, its effect is often only temporary and severe side effects can occur. Temozolomide (TMZ) has been prescribed because of its ease of administration, tolerability and known ability to cross the blood-brain barrier. On the other hand, it has already shown dose-limiting hemotoxicity and rapid hydrolysis, which ends up limiting its antitumor efficacy. Furthermore, recent studies have shown that gold nanoparticles (GNP), with their biocompatibility and cytotoxic potential in tumor cells, can be combined with chemotherapy drugs through electrostatic adsorption or covalent bonds, which can lead to a cooperative improvement in treatment already existing. Thus, the aim of this work was to evaluate the effects of TMZ associated with GNP (TGNP) in melanoma skin cancer cell line B16F10, as well as in healthy NIH3T3 cells. For this, GNP were synthesized in sizes of 10, 20 and 30 nm, by the citrate reduction method and associated with TMZ by shaking. They were then characterized by ultraviolet-visible spectrophotometry, transmission electron microscopy, polydispersion index, zeta potential and Fourier transform infrared spectroscopy. Next, the cytotoxic effects of TMZ, GNP and TGNP were evaluated through the MTT test, using different concentrations in the periods of 24, 48 and 72 hours. The inhibitory concentration and the combination index (synergy) were calculated soon after. The hemotoxicity of TMZ and TGNP was also evaluated through the hemolysis test, as well as the mechanism of cell death by flow cytometry. The results showed that there was an electrostatic interaction between TMZ and GNP, not changing the size and shape of the GNP. Furthermore, TGNP was more cytotoxic in B16F10 cells, but not in NIH3T3 cells, than TMZ alone. The conjoint treatment had a synergistic as well as a hemocompatible effect. Finally, TGNP induced B16F10 cells to late apoptosis when compared to control. Taken together, our results showed that the use of TGNP induced to better results regarding cytotoxicity and hemocompatibility in B16F10 cells with lower concentrations of TMZ, as well as being efficient in inducing cell death by apoptosis when compared to the control.

Key words: antineoplastics, melanoma, temozolomide, gold nanoparticles, B16F10, NIH3T3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Corte histológico indicando área pigmentada (melanótica), onde as células neoplásicas produzem abundante melanina.....	20
Figura 2: Estágios do melanoma cutâneo.....	21
Figura 3: Mecanismo de ação do TMZ.....	22
Figura 4: Ciclo celular, onde a TMZ atua na fase G2.....	23
Figura 5: Propriedades importantes das nanopartículas de ouro.....	26
Figura 6: Fluxograma com todos os estágios da síntese de NPAu em tamanhos diferentes.....	30
Figura 7: Tamanho e concentrações das NPAu associadas a TMZ (TNPAu).....	35
Figura 8: Espectros de absorvância e comprimento de onda de UV-Vis de soluções de NPAu e TNPAu com diferentes tamanhos.....	38
Figura 9: Imagens de MET das soluções.....	39
Figura 10: Estrutura química da TMZ (A) e do Citrato de sódio dihidratado (B) e Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (C).....	41
Figura 11: Citotoxicidade in vitro da TMZ em diferentes concentrações em células B16F10 e NIH3T3 nos períodos de 24, 48 e 72 horas.....	43
Figura 12: Citotoxicidade in vitro das NPAu10 em diferentes concentrações em células B16F10 nos períodos de 24, 48 e 72 horas.....	44
Figura 13: Citotoxicidade in vitro das NPAu20 em diferentes concentrações em células B16F10 nos períodos de 24, 48 e 72 horas.....	45
Figura 14: Citotoxicidade in vitro das NPAu30 em diferentes concentrações em células B16F10 nos períodos de 24, 48 e 72 horas.....	46
Figura 15: Citotoxicidade in vitro das soluções de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 em diferentes concentrações em células B16F10 e NIH3T3 no período de 24 horas.....	47
Figura 16: Citotoxicidade in vitro das soluções de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 em diferentes concentrações em células B16F10 e NIH3T3 no período de 48 horas.....	48
Figura 17: Citotoxicidade in vitro das soluções de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 em diferentes concentrações em células (A) B16F10 e (B) NIH3T3 no período de 72 horas.....	49

Figura 18: Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com soluções de TMZ em diferentes concentrações	52
Figura 19: Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com soluções de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30.....	53
Figura 20: Quantificação de células B16F10 após 24 horas (A) e 72 horas (B) de exposição a TMZ, TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 por meio de análise de citometria de fluxo.....	55
Figura 21: Comparação do uso da TNPAu30 (15/19,4 µg/mL) com os tratamentos utilizados separadamente, no período de incubação de 24 horas, em células B16F10 e NIH3T3, em relação a citotoxicidade, hemólise e apoptose.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice de polidispersão e potencial zeta das soluções de NPAu e TNPAu.....	40
Tabela 2: Grupamentos químicos destacado na espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier da TMZ e TNPAu em função das bandas de absorção.....	42
Tabela 3: Valores de CI_{50} e de IC das diferentes soluções, em $\mu\text{g/mL}$, de forma livre e associados (TNPAu), em células B16F10.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

CEP – Comitê de ética em Pesquisa

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

DMSO – Dimetil sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EPR - Efeito de permeabilidade e retenção aprimorado

ERK - Quinases extracelulares reguladas por sinal, do inglês *extracellular signal-regulated kinases*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína, do inglês *Fluorescein isothiocyanate*

FTIR - espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*

IL-2 – Interleucina 2

INCA - Instituto nacional do câncer

IPd – Índice de polidispersão

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MGMT - 06-metilguanina metiltransferase

MTIC - 5-(3 dimetil-1-triazenil) imidazol-4-carboxamida

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

NF1 – Neurofibromina 1

NP - Nanopartículas

NPAu – Nanopartículas de ouro

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

RPM - Rotações por minuto

RPS - Ressonância de plasmon de superfície

TMZ – Temozolomida

TNPAu – Temozolomida associada a nanopartículas de ouro

UV – Ultravioleta

UV – Vis - Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 CÂNCER.....	18
1.2 CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA.....	19
1.3 TRATAMENTO.....	21
1.4 TEMOZOLOMIDA.....	22
1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	24
1.6 NANOPARTÍCULAS DE OURO NO TRATAMENTO DO CÂNCER.....	27
1.7 JUSTIFICATIVA.....	28
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	30
3.2 TEMOZOLOMIDA.....	31
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ASSOCIADA A TEMOZOLOMIDA.....	31
3.3.1 Espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis).....	31
3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	31
3.3.3 Índice de polidispersão e potencial zeta das soluções.....	32
3.3.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier.....	32
3.4 CULTURA DE CÉLULAS B16F10 E NIH3T3.....	32
3.5 TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA E NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	33
3.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT.....	33
3.7 TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	34
3.8 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% E ÍNDICE DE COMBINAÇÃO.....	35
3.9 TESTE DE HEMÓLISE.....	36
3.10 ENSAIO DE APOPTOSE POR CITOMETRIA.....	37
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	38
4.1.1 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	38

4.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	39
4.1.3 Índice de polidispersão e potencial zeta.....	39
4.1.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier.....	40
4.2 CITOTOXICIDADE DA TMZ/NPAu e TNPAu EM CÉLULAS B16F10 E NIH3T3...42	
4.3 DETERMINAÇÃO DA CI ₅₀ E ÍNDICE DE COMBINAÇÃO (SINERGISMO).....	50
4.4 HEMOTOXICIDADE.....	52
4.5 ANÁLISE DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE E NECROSE.....	54
5 DISCUSSÃO.....	56
6 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é uma patologia considerada capaz de provocar um crescimento celular anormal, invadindo tecidos adjacentes ou distantes, chamado de metástases (Uehara et al., 1998). Segundo o INCA (2020), o câncer é a segunda principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos. Para o Brasil, é estimado 625 mil novos casos de câncer por ano do triênio 2020-2022.

As células cancerígenas são a base da doença; elas iniciam e impulsionam a progressão do tumor, carregando as mutações oncogênicas e supressoras tumorais (Hanahan e Weinberg, 2011). À medida que estas células se tornam cada vez mais anormais, as células velhas ou danificadas sobrevivem quando devem morrer e novas células se formam quando não são necessárias (National Cancer Institute, 2015).

As células tumorais possuem ainda como característica o crescimento e a divisão celular a uma taxa anormalmente rápida, sendo também pouco diferenciadas, com membranas e morfologia anormais. Ademais, adquirem a capacidade de formar seus próprios vasos sanguíneos (angiogênese tumoral), com o intuito de melhorar sua irrigação sanguínea (Hanahan e Weinberg, 2011). Além disso, as células cancerígenas são capazes de ignorar sinais que normalmente indicam para cessar a divisão celular ou que iniciam um processo conhecido como morte celular programada, ou apoptose. Sinais estes que o corpo usa para se livrar de células desnecessárias (National Cancer Institute, 2015).

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando assim a formação de tumores. Atualmente, métodos como cirurgia, radiação, quimioterapia e imunoterapia, direcionados às células tumorais, tem sido utilizados como tratamento para o câncer. Estas formas de tratamento são eficazes em alguns casos, entretanto podem levar a danos teciduais e em células saudáveis conseqüentemente (Wang et al., 2018).

Dentre todos os tumores já descritos, o câncer de pele é o mais frequente no Brasil, correspondendo a 30% de todos os casos registrados no país (INCA, 2020). O mesmo divide-se ainda em câncer de pele do tipo não melanoma (carcinomas basocelulares e os espinocelulares), sendo o tipo mais comum e com baixa letalidade, com ocorrência de cerca de 177 mil novos casos por ano, e o câncer de pele do tipo

melanoma, sendo este mais raro e mais agressivo, registrando em torno de 8,4 mil casos anualmente (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2020).

1.2 CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA

O câncer de pele do tipo melanoma representa uma neoplasia originada nos melanócitos ou das células que se desenvolvem a partir destes. Os melanócitos surgem da crista neural e migram para seus destinos finais na pele, trato uveal, meninges e mucosa (Kozovska et al., 2016). Este tipo celular é responsável pela produção de melanina, a qual confere a pele sua pigmentação, de modo que o melanoma tende a ser mais frequente em indivíduos adultos fenotipicamente brancos. Já em pessoas de pele negra, o melanoma é mais comum em áreas claras, como plantas dos pés e palmas das mãos (INCA, 2020).

Embora o melanoma corresponda a apenas cerca de 1% de todos os tumores malignos que acometem a pele, o melanoma cutâneo maligno representa a forma mais agressiva e mortal de câncer de pele. Uma vez instalado o tumor do tipo melanoma metastático, o prognóstico tende a cair, com uma taxa média de sobrevida de aproximadamente 6 meses (Domingues et al., 2018; Leonardi et al., 2018).

Em um ambiente fisiológico normal, o crescimento de melanócitos é regulado por secreções de queratinócitos (Millet et al., 2017). Devido a mutações em genes-chave que regulam o crescimento celular, os melanócitos são incapazes de responder adequadamente às indicações reguladoras dos queratinócitos, levando a um crescimento anormal (Millet et al., 2017; Mabeta, 2020). Vários estudos demonstraram que a disseminação do melanoma é o resultado de mutações genéticas e alterações microambientais do tumor, caracterizadas pela superexpressão de proteínas capazes de favorecer a invasão tumoral e a infiltração circundante (Chiriboga et al., 2016; Leonardi et al., 2018).

O melanoma pode ainda ser classificado na população caucasiana por sua origem na pele exposta em excesso ao sol, de forma crônica ou intermitente, que se traduz em diferentes locais de origem, grau de exposição cumulativa aos raios Ultra Violeta (UV), idade ao diagnóstico, tipos de fatores oncogênicos e carga mutacional (Candido et al., 2014). De fato, os melanomas na pele cronicamente exposta ao sol geralmente aparecem em indivíduos mais velhos (> 55 anos), em áreas mais expostas ao sol, como cabeça e pescoço, bem como na região dorsal das extremidades

superiores. Os principais fatores genéticos são o proto-oncogene B-Raf (BRAF), as mutações na neurofibromina 1 (NF1) e NRAS, e geralmente estes melanomas apresentam uma alta carga mutacional relacionada à exposição aos raios UV (Bastian et al.,2014; Candido et al., 2014). Por outro lado, o melanoma associado a casos intermitentes de pele exposta ao sol ocorre em indivíduos mais jovens (<55 anos), em áreas menos expostas ao sol, como o tronco e as extremidades proximais, e geralmente estão associadas ao BRAF V600E e a uma menor carga mutacional (Bastian et al.,2014; Leonardi et al.,2018). Já foi relatado que a mutação no gene BRAF desempenha um papel significativo no desenvolvimento do melanoma levando à ativação constitutiva da via RAS/RAF/MEK/ERK. Esta via é uma cascata de transdução de sinal que participa da regulação de diversos processos, como apoptose, progressão do ciclo celular, diferenciação e proliferação celular (Roskoski, 2010; Kozovska et al., 2016).

Muitas das mutações são encontradas em associação com subconjuntos clínicos ou histopatológicos específicos de lesões, apoiando fortemente a noção de tipos biologicamente distintos de neoplasias melanocíticas (Bastian et al., 2014). A caracterização histológica (Figura 1) é a base atual do diagnóstico de neoplasia melanocítica e a definição de seu potencial maligno.

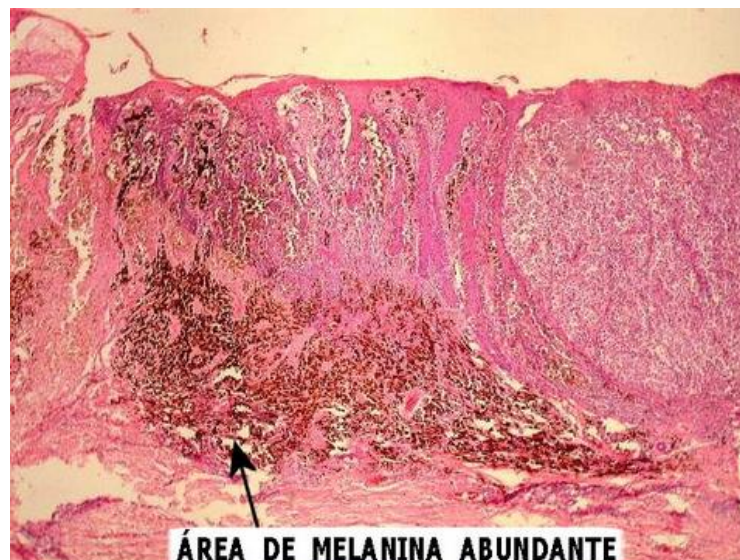


Figura 1: Corte histológico indicando área pigmentada (melanótica), onde as células neoplásicas produzem abundante melanina. Fonte: Anatpat, (2020).

Os estágios do melanoma vão de 0, onde o melanoma não se desenvolveu além da epiderme e é geralmente tratado com cirurgia até o estágio IV, quando o

mesmo já é metastático (Figura 2) (Pflugfelder et al., 2013; Skin Cancer Foundation, 2020).

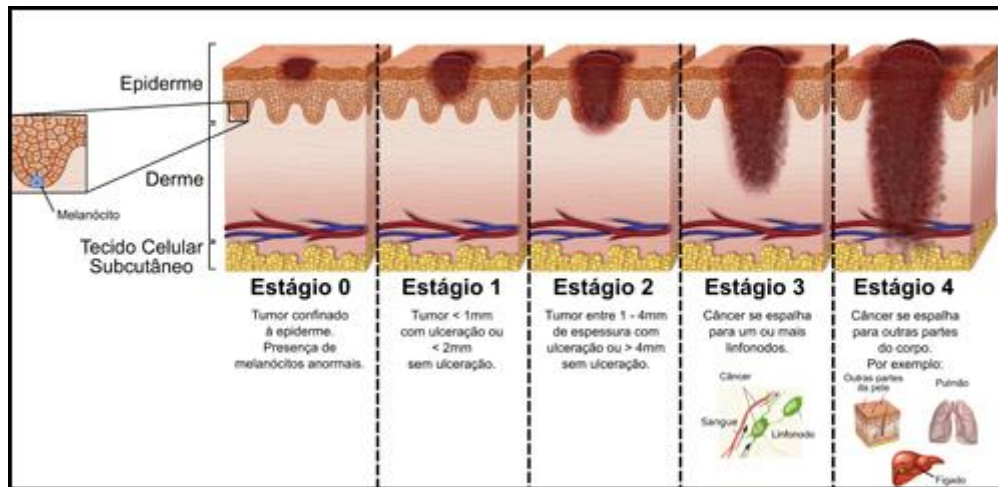


Figura 2: Estágios do melanoma cutâneo. Inicialmente há grande proliferação celular dos melanócitos devido a alterações genéticas frequentemente oriundas de exposição intermitente à radiação ultravioleta. Esse crescimento celular anormal é acentuado na epiderme (*in situ*), sofrendo aumento de tamanho radial e, por fim, vertical até atingir camadas inferiores da pele. Assim, o câncer encontra a corrente sanguínea, o sistema linfático e tecidos vizinhos, se espalhando por outras partes do corpo.

1.3 TRATAMENTO

A ressecção cirúrgica é o tratamento primário de todos os estágios do melanoma, entretanto a radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas como terapias adjuvantes conforme o estágio da doença, local do tumor, estado geral de saúde do paciente, assim como determinadas características do próprio câncer. A terapia adjuvante inclui: imunoterapia (vacinas para melanoma, interferons, IL-2), terapia de radiação, quimioterapia e bioquimioterapia (combinação de quimioterapia com terapia com citocinas) (Kozovska et al., 2016; INCA 2020).

Com a progressão da doença após o recebimento da imunoterapia, a quimioterapia é a próxima opção, dada a atual falta de terapias direcionadas para melanomas sem mutações BRAF, NRAS ou KIT (Wilson e Schuchter, 2016). A quimioterapia pode ajudar alguns pacientes com melanoma estágio IV com medicamentos como a Dacarbazina, Paclitaxel e a Temozolomida (TMZ). Esses medicamentos podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outros fármacos (American Cancer Society, 2018). No entanto, apesar de reduzir o tamanho dos tumores, o efeito da quimioterapia, muitas vezes, é apenas temporário e pode causar efeitos colaterais importantes, tais como alopecia, cefaleia, náuseas e vômitos

e mielossupressão, incluindo linfopenia e trombocitopenia, em virtude das altas dosagens administradas (Agarwala et al., 2004).

A TMZ é um agente alquilante, que atualmente é um medicamento de segunda linha para o câncer de pele do tipo melanoma. Em contraste com a Dacarbazina, pode atravessar a barreira hematoencefálica, sendo efetivo até mesmo em metástases cerebrais (Dianzani et al., 2020).

1.4 TEMOZOLOMIDA

A TMZ é um dos quimioterápicos utilizados em pacientes com melanoma metastático (Chen et al., 2019), o qual possui característica lipofílica, não sendo afetado pelo pH estomacal, mas rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal. Já no sangue e outros tecidos, ela é primeiramente hidrolisada em 5-(3 dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida (MTIC), que é rapidamente convertido em sua forma reativa, o íon metildiazônio (Stupp et al., 2009). Este íon formado pela decomposição do MTIC leva a metilação principalmente de resíduos de guanina na molécula de DNA (Zhang et al., 2012), resultando na formação de O6- e N7-metilguaninas (Clemente et al., 2018). Esta metilação em resíduos de guanina ocasiona em cortes no DNA, seguidos de apoptose, uma vez que os mecanismos de reparo celular são incapazes de se ajustar à uma base metilada (Figura 3) (Wesolowski et al., 2010).

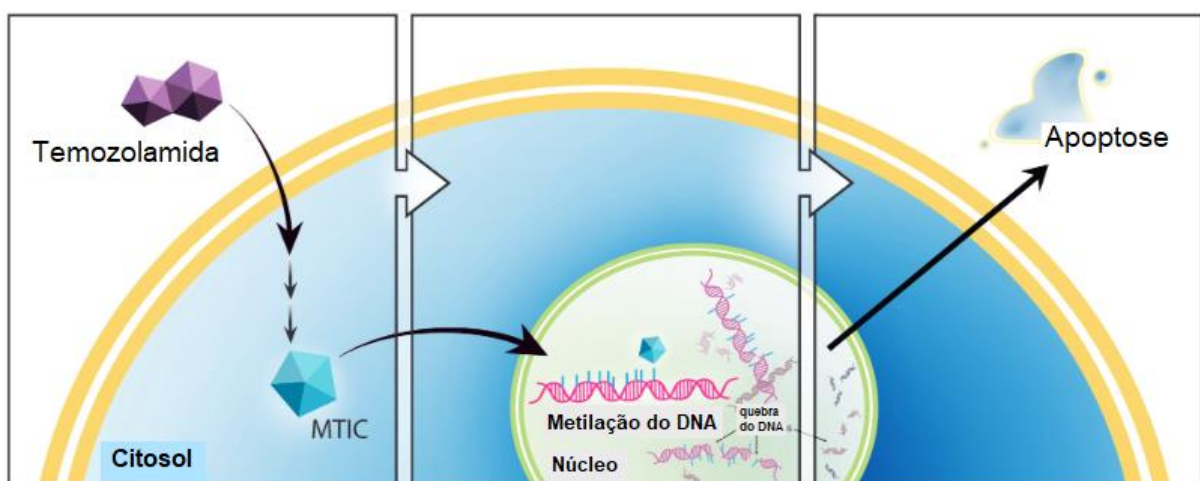


Figura 3: Mecanismo de ação da TMZ. A TMZ é convertida intracelularmente em MTIC, que metila o DNA. Os mecanismos de reparo celular não podem se ajustar, resultando em cortes de DNA e, em última instância, apoptose. Fonte: Adaptado de Wesolowski et al., 2010.

A TMZ tem sido prescrita no tratamento de melanoma metastático por ser de fácil administração, boa tolerabilidade, além de ter uma capacidade conhecida de atravessar a barreira hematoencefálica (Ryabaya et al., 2017). No tratamento com TMZ, a parada do ciclo celular ocorre na fase G₂, intervalo entre a duplicação do DNA e o início da divisão celular (Figura 4); no entanto, apenas um pequeno número de células sofre apoptose (Hirose et al., 2001; Kanzawa et al., 2004).

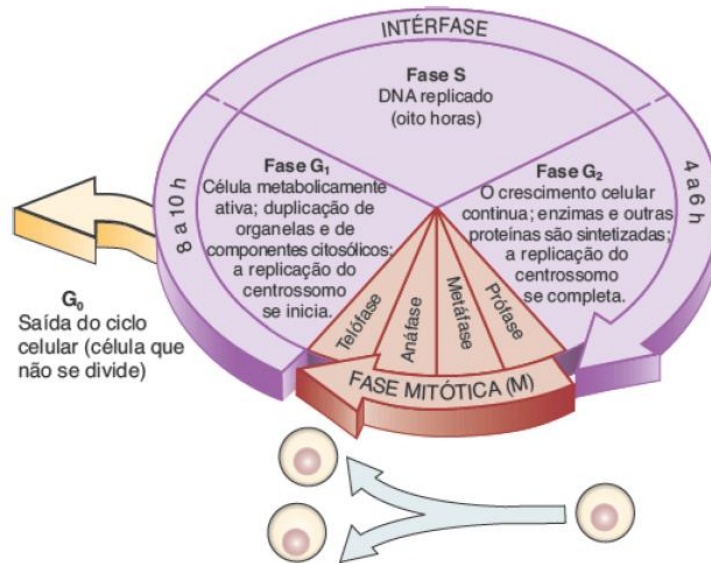


Figura 4: Ciclo celular, onde a TMZ atua na fase G₂. Fonte: Tortora e Derrickson, 2016.

Em um ensaio clínico randomizado de fase III realizado por Middleton et al. (2000), utilizando TMZ *versus* Dacarbazina em pacientes com melanoma metastático, os resultados mostraram uma sobrevida global mediana de 7,7 meses para pacientes tratados com TMZ e 6,4 meses para pacientes tratados com Dacarbazina ($p = 0,20$), e taxas de resposta semelhantes entre as duas coortes (13,5% para pacientes tratados com TMZ e 12,1% para pacientes tratados com Dacarbazina).

Entretanto, as taxas de resposta à TMZ são limitadas. Os mecanismos de resistência à TMZ, amplamente estudados, enfocam principalmente a capacidade de reparo de DNA das células cancerígenas, como o aumento da expressão da proteína de reparo de DNA O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) (Lv et al., 2016). Ademais o tratamento com TMZ demonstrou ser capaz de causar danos às células-tronco hematopoiéticas em pacientes (Quinn et al., 2009), resultando em toxicidade hematológica limitadora de dose. Além disso, a TMZ por ser pouco solúvel em condições fisiológicas está sujeita a uma rápida hidrólise que limita ainda mais sua eficácia antitumoral (Fang et al., 2015). Os efeitos induzidos pela TMZ sobre tumores,

podem ainda variar dependendo da dose e do método de entrega escolhido, assim, ainda se faz necessário mais estudos a respeito do seu uso (Sanchez-Perez et al., 2013; Mathios et al., 2016).

Até o momento, nenhuma terapia conhecida, é infalível e os pacientes que sofrem recaídas em conjunto com resistência adquirida aos inibidores, geralmente apresentam melanomas que exibem um fenótipo muito mais agressivo e invasivo (Muller et al., 2014; Arozarena e Wellbrock, 2017).

1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO

A nanotecnologia é uma ciência conduzida em escala nanométrica, sendo uma nanopartícula (NP) uma substância de 1 a 100 nanômetros aproximadamente. Um nanômetro, a escala usada para a nanotecnologia, é equivalente a um bilionésimo de metro. Para uma noção de escala, uma folha de papel tem 100.000 nanômetros de espessura (National Nanotechnology Initiative, 2019).

Nos últimos anos a nanotecnologia surgiu como uma solução potencial para muitos problemas e é considerada uma importante mudança na detecção, tratamento e até prevenção do câncer (Sivakumar et al., 2017). Nanomateriais podem ser projetados com diversas propriedades, podendo ser aplicado nas mais diversas áreas biomédicas. Estes podem atuar como um agente de contraste, bem como, direcionar o fármaco a uma célula ou tecido alvo, aumentando sua eficácia terapêutica, além de diminuir a toxicidade (Nasongkla et al. 2006; Sivakumar et al., 2017).

As propriedades intrínsecas dos compostos contidos nas NP são de grande importância, sendo elas o tamanho das partículas, a forma, a carga superficial e as características físico-químicas, pois elas influenciam muito na absorção pelas células e no potencial para efeitos biológicos subsequentes (Wright, 2016). Suas características eletrônicas, magnéticas, ópticas, mecânicas e comportamentais variam conforme o seu tamanho, podendo alterar sua condutividade e reatividade (Raghavendra et al., 2014). As NP podem ainda ser classificadas pela sua composição em: NP baseada em carbono, lipídeos, de cerâmica, de semicondutores, poliméricas e as NP metálicas.

As NP metálicas são feitas puramente dos precursores de metais, tais como Cu, Ag e Au e por isso, possuem uma ampla faixa de absorção de luz na região

visível do espectro solar eletromagnético (Dreaden et al., 2012). Possuem ainda características de ressonância de plasmon de superfície (RPS), o qual é produto do confinamento de fótons a um pequeno tamanho de partícula, e resulta em um aumento das propriedades radioativas e não radioativas das nanopartículas, possibilitando o maior número de utilizações na biologia e medicina (Huang e El-Sayed, 2010; Khan et al., 2019).

No entanto, na nanobiotecnologia, o principal desafio ainda é melhorar a eficácia do tratamento com NP e reduzir o seu nível de toxicidade (Kumar et al., 2018). Antes do seu uso generalizado, o impacto na saúde humana precisa ser totalmente compreendido. Desse modo é de extrema importância primeiramente testar as interações das NP experimentalmente e assim, modificar as nanopartículas para melhor biocompatibilidade com as células, a fim de eliminar danos à tecidos saudáveis.

Com os recentes avanços na nanotecnologia e na ciência médica, surgiram numerosas NP e nanomateriais a partir de diferentes elementos tais como ouro, prata, ferro, cobre, cobalto, platina etc., sintetizados biologicamente ou físico-quimicamente (Schröfel et al., 2014; Singh et al., 2018). Dentre as diversas NP inorgânicas, podemos citar as nanopartículas de ouro (NPAu). As NPAu são sintetizadas a partir da redução do ácido tetracloroáurico (Turkevich, 1951) e possuem importantes propriedades como funcionalização de superfície, fluorescência, diferentes formas e tamanhos, biocompatibilidade (Figura 5). Além disso, com as NPAu é possível realizar a manipulação dessas propriedades, abrindo muitas possibilidades para explorar os efeitos destas como agentes terapêuticos e de diagnóstico (Tao et al., 2015; Singh et al., 2018). Devido a isso, as NPAu têm se tornado a primeira escolha para pesquisas no campo biológico e farmacêutico.

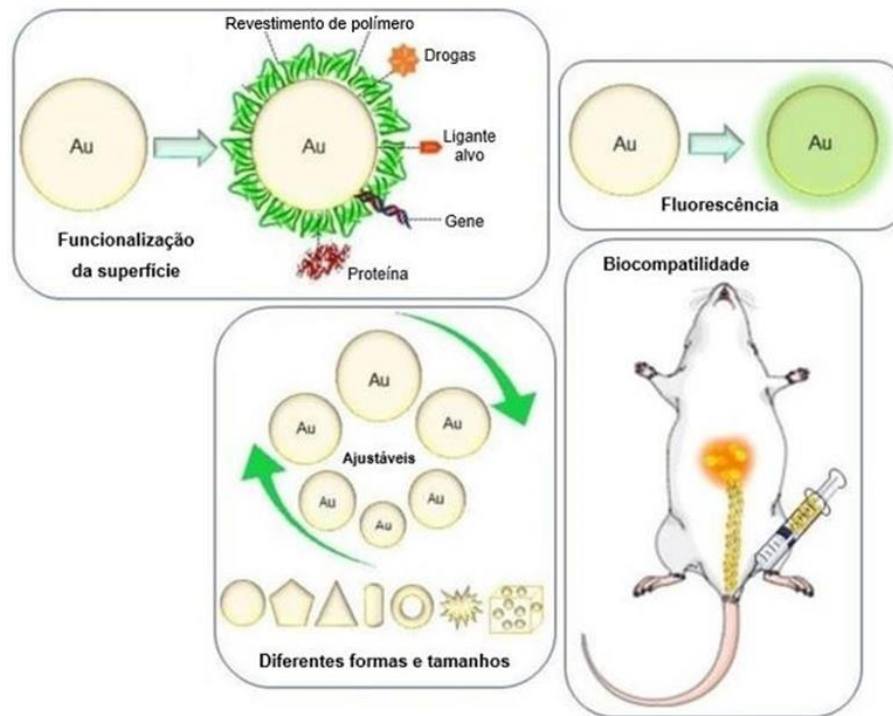


Figura 5: Propriedades importantes das nanopartículas de ouro. Fonte: Adaptado de Singh et al., 2018.

Segundo Wang et al. (2018), as NPAu podem ajudar no direcionamento de vacinas, facilitando-as a entrar nas células e desencadear a resposta imune por si mesmas. Elas também são capazes de ajudar no aumento da captação celular, melhorando a permeabilidade e a eficácia. Em uma pesquisa feita por Draz et al., (2017), os camundongos que foram imunizados com essa abordagem apresentaram uma captação 100 vezes maior em comparação aos animais que receberam tratamentos de controle sem NP.

Quanto ao seu potencial terapêutico, Muller et al. (2017), observaram que o comprometimento na produção de ATP mitocondrial, neuroinflamação e estresse oxidativo encontrado no modelo animal da Doença de Alzheimer foram prevenidos pelo tratamento utilizando NPAu de 20 nm, aplicada intraperitoneal durante 21 dias (a cada 48 horas). Já Victor et al., 2012 em sua pesquisa utilizando ultrassom pulsado terapêutico com NPAu de 25 nm em lesões musculares, mostrou efeitos benéficos no processo de cicatrização muscular, induzindo uma redução na produção de espécies reativas de oxigênio e também na expressão de moléculas pró-inflamatórias.

Quando utilizada em associação com outro medicamento, Dohnert et al., 2015, utilizando um modelo animal para tendinite, mostrou que a NPAu associada ao Diclofenaco dietilamônico apresentou efeito anti-inflamatório e aumentou a ação do medicamento quando usados com fonoforese.

Ademais, nos dias atuais, diferentes tipos de terapias contra o câncer utilizando as NPAu vem sendo pesquisadas e já existe um considerável avanço em vários destes estudos.

1.6 NANOPARTÍCULAS DE OURO NO TRATAMENTO DO CÂNCER

Considerando as aplicações anticâncer, é importante observar que as NP se acumulam nos tecidos tumorais por meio de um mecanismo passivo, conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aprimorado (EPR), sem a adição de ligantes direcionadores (Li et al., 2018). Isso se deve principalmente a vasculatura tumoral defeituosa com epitélio irregular, diminuição do nível de drenagem linfática e redução da captação do líquido intersticial, favorecendo a retenção passiva de nanopartículas nos tumores (Sztandera et al., 2019; Bai et al., 2020).

Estudos têm sido realizados utilizando as NPAu, devido suas propriedades versáteis e possíveis aplicações em química clínica, bioimagem e terapia do câncer, além de uma entrega direcionada de medicamentos constantemente caracterizada como já mencionado. As NPAu podem ser liberadas na corrente sanguínea e são capazes de se ligarem a células cancerígenas específicas que, por sua vez, auxiliam no tratamento via terapia fototérmica, permitindo a captação de imagens para a remoção cirúrgica bem-sucedida do tumor (Singh et al., 2018).

As NPAu podem ser combinadas também com drogas quimioterápicas, proteínas ou ácidos nucleicos através de adsorção eletrostática ou ligações covalentes. Essa propriedade, juntamente com sua biocompatibilidade e direcionamento superiores, torna a entrega mais promissora para direcionamento de tumores (Bai et al., 2020). Wang et al., (2011) demonstraram que a Doxorubicina quando ligada a NPAu mostrou toxicidade aumentada contra a linhagem de células de câncer de mama MCF-7/ADR. Essa toxicidade superou, em certa medida, a resistência a múltiplos medicamentos devido ao aumento da absorção do fármaco conjugado a NPAu seguido de sua liberação responsiva dentro da célula. Em outro estudo, realizado por Cheng et al., (2012), NPAu foram utilizadas na entrega direcionada de drogas de terapia fotodinâmica, tendo uma melhora significativa no transporte do medicamento para o tumor em relação à administração convencional desses medicamentos, sem toxicidade perceptível para os animais ou efeitos colaterais. Tais sistemas transportadores devem tornar-se capazes de reter uma

quantidade adequada do fármaco, superando mecanismos de resistência, melhorando a biodistribuição e impedindo a remoção rápida do fármaco do organismo (Sztandera et al., 2019).

Em relação ao seu potencial terapêutico, as NPAu sozinhas podem exibir propriedades citotóxicas contra certos tipos de linhas celulares de câncer (Della Vecchia et al., 2020), principalmente como moduladoras da angiogênese, no entanto seu uso ainda não é totalmente reconhecido e caracterizado, requerendo pesquisas adicionais (Mukherjee et al., 2005; Sztandera et al., 2019). Dessa forma, uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados pelas NPAu em modelos de câncer é de grande importância, podendo vir a aumentar seus potenciais benefícios terapêuticos.

1.7 JUSTIFICATIVA

Apesar da disponibilidade de medicamentos eficazes no mercado, os efeitos colaterais relacionados à toxicidade ainda são muitos, havendo ainda uma falta de benefícios terapêuticos em condições específicas tal como no desenvolvimento de resistência aos medicamentos (Darweesh et al., 2019). No entanto, com os recentes avanços na terapia do câncer, tem se mudado gradualmente o foco da monoterapia para a terapia combinada, com base nas interações de aprimoramento cooperativo entre dois ou mais tratamentos, o que pode resultar em importantes efeitos terapêuticos aditivos (Shen et al., 2015; Fan et al., 2017).

Em contraste com a eficácia limitada do tratamento já existente e os possíveis efeitos colaterais decorrentes da terapia, o desenvolvimento da terapia sinérgica multimodal pode abrigar os méritos coletivos dos respectivos tratamentos (TMZ e NPAu) e dar origem a uma eficácia anticâncer muito maior, evitando assim efeitos colaterais induzidos por altas doses e dando um maior conforto ao paciente. Com isso, esse trabalho visa analisar os efeitos das NPAu, devido a todas as suas propriedades relatadas até aqui, em conjunto com a TMZ, já utilizada no tratamento, porém com limitações em relação a sua dose e a resistência do organismo a mesma. Buscando dessa forma potencializar o tratamento, diminuindo a dose da TMZ utilizada, mas aumentando os benefícios ao paciente futuramente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos citotóxicos da Temozolomida associada a nanopartículas de ouro em linhagem celular de câncer de pele do tipo melanoma B16F10.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar NPAu com diferentes tamanhos associada à TMZ;
- Avaliar os efeitos citotóxicos das NPAu obtidas, em diferentes concentrações, em linhagem celular de câncer B16F10;
- Avaliar os efeitos citotóxicos da TMZ, em diferentes concentrações, em linhagem celular de câncer B16F10 e em células normais de fibroblastos NIH3T3;
- Avaliar os efeitos citotóxicos da TMZ associada a NPAu (TNPAu) em linhagem celular B16F10 e em células normais de fibroblastos NIH3T3;
- Avaliar a atividade hemolítica da TMZ e TNPAu;
- Avaliar o mecanismo de morte celular com TMZ e TNPAu em células B16F10.

3 METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

As NPAu foram sintetizadas nos tamanhos de 10, 20 e 30 nanômetros (nm), pelo método descrito por Turkevich (1951), com algumas adaptações (Della Vechia et al., 2020). A redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) ocorreu juntamente com o redutor e estabilizante citrato de sódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nuclear, SP, Brasil). Foi pipetado 35 μL de ácido tetracloroáurico (4 mM) em um balão volumétrico de 100 mL, completando-o com água ultrapura (Milli-Q) e aquecendo-o até 90 °C (até a ebulição) em um balão de fundo redondo (125 mL) de 3 bocas, sob agitação magnética à 700 rpm.

O controle dimensional das NPAu foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor, para cada NPAu, como mostra a Figura 6.

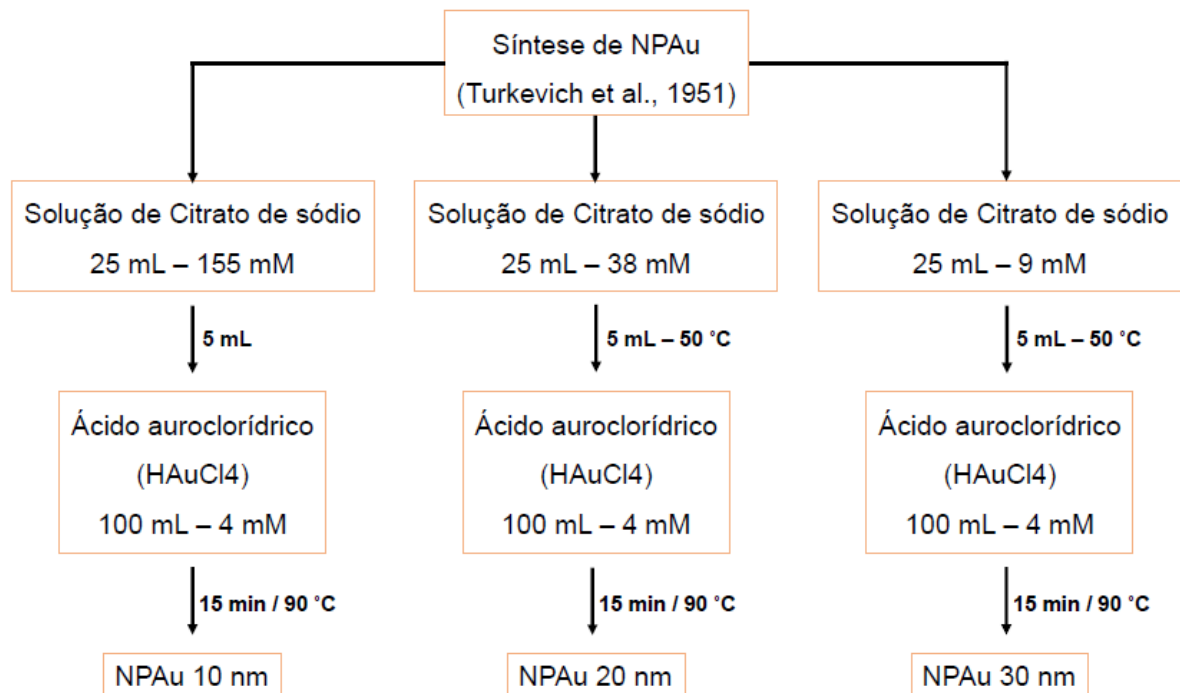


Figura 6: Fluxograma com todos os estágios da síntese de NPAu em tamanhos diferentes. Fonte: adaptado de Della Vechia et al., 2020.

Ao final foi obtido uma coloração diferente para cada tamanho de NPAu. As soluções de NPAu então foram deixadas esfriando em temperatura ambiente e armazenadas em tubos revestidos com papel alumínio.

3.2 TEMOZOLOMIDA

Foi utilizado TMZ ($C_6H_6N_6O_2$) - Sigma Aldrich, com peso molecular de 194,15 g/mol, dissolvida em DMSO (10 mg/mL).

Para os grupos onde há a associação de NPAu com a TMZ (TNPAu), as mesmas foram adicionadas uma à outra, juntamente com DMEM, conforme as concentrações que iriam ser utilizadas e combinadas por agitação.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ASSOCIADA A TEMOZOLOMIDA

3.3.1 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Pela análise qualitativa do espectro na faixa do ultravioleta-visível (UV-Vis) pode-se ter uma estimativa do tamanho médio das partículas. Com isso, após as sínteses, as soluções de TMZ e TNPAu foram caracterizadas utilizando a técnica de espectroscopia (UV-Vis), pelo monitoramento da banda de RPS, usando um espectrofotômetro modelo UV-1800, difração de raios-x, através do equipamento de LAB-X, modelo XDR-6000 (Shimadzu). A caracterização somente das NPAu já foi realizada e publicada anteriormente por nosso grupo de pesquisa por Della Vechia et al., (2020).

As medições da banda de RPS, foram realizadas a temperatura ambiente no espectrofotômetro usando uma cubeta de quartzo de 1 cm de diâmetro, contendo alíquotas de 2 mL com cada uma das soluções.

3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise de microscopia de transmissão eletrônica (MET) foi realizada adicionando as soluções de TNPAu sobre um *grid* de cobre revestido de carbono (300 mesh). As amostras foram analisadas após secagem por 48 horas à temperatura ambiente. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, em colaboração com o professor Dr. Paulo Emilio Feuser e o professor Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo.

3.3.3 Índice de polidispersão e potencial zeta das partículas

O índice de polidispersão (IPd) e o potencial zeta das NPAu e TNPAu obtidas neste trabalho foram analisados pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering-DLS). As leituras das amostras foram feitas no equipamento Zetasizer Nano S, da Malvern Instruments. As amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:10 e adicionadas em uma cubeta para posterior análise. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os valores finais foram expressos pela média e o desvio padrão.

3.3.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

Foram analisadas amostras de TMZ e de soluções de TNPAu para avaliar possíveis interações entre a TMZ e NPAu. Assim, foi possível detectar as principais bandas de absorção referentes aos grupos funcionais de cada um dos componentes puros e avaliar qualitativamente o processo de modificação das TNPAu, pela detecção das bandas obtidas. As amostras foram preparadas utilizando pastilha de brometo de potássio (KBr) e analisadas com resolução de 4 cm^{-1} , 32 varreduras em um intervalo de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, no espectrômetro IR Prestige-21 da marca Shimadzu, alocado no Laboratório de Controle de Processo da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.4 CULTURA DE CÉLULAS B16F10 E NIH3T3

Devido ao seu potencial invasivo, as células de melanoma têm sido amplamente utilizadas para estudar mecanismos gerais de invasão de células cancerígenas (Arozarena e Wellbrock, 2017). A linhagem celular utilizada para avaliar os efeitos da TMZ. NPAu e TNPAu foi a de células de câncer de pele do tipo melanoma murino B16F10. Para a comparação com células normais, foi utilizada uma linhagem de Fibroblastos (NIH3T3).

Ambas as células foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 cm^2 , com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (10 U.L./mL) e 10% de soro fetal bovino (meio completo). Para o crescimento e adesão celular, as mesmas foram mantidas em uma incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO_2 a $37\text{ }^\circ\text{C}$, com trocas de meio realizadas em

dias alternados, podendo haver adaptações, até se obter uma confluência de células suficiente (80%) para o desenvolvimento dos experimentos.

3.5 TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA E NANOPARTÍCULAS DE OURO

Ao obter a confluência necessária, as células foram tripsinizadas e colocadas em uma câmara Neubauer para contagem no microscópio. Após a contagem, as células foram adicionadas em placas de 96 poços com uma concentração final 1×10^4 células/poço e as mesmas foram incubadas por 24 horas, a fim de proporcionar a aderência das células.

Decorrido o período de incubação, o DMEM foi removido e 100 μ L dos tratamentos a seguir foram adicionados nas concentrações abaixo, diluídas em DMEM e incubadas por 24, 48 e 72 horas.

- **NPAu10** - 35, 25, 15, 10 e 5 μ g/mL de NPAu de 10 nm;
- **NPAu20** - 35, 25, 15, 10 e 5 μ g/mL de NPAu de 20 nm;
- **NPAu30** - 35, 25, 15, 10 e 5 μ g/mL de NPAu de 30 nm;
- **TMZ** - 35, 24,2, 19,4, 14,5, 9,7 e 4,8 μ g/mL de TMZ.

As concentrações de TMZ aqui escolhidas, são as mesmas utilizadas na literatura com diferentes protocolos, em trabalhos relacionados ao câncer de pele do tipo melanoma (Ryabaya et al., 2017; Clemente et al., 2018; Lim et al., 2019; Cseh et al., 2019).

Após o período de incubação os tratamentos foram removidos e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de {(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan} (MTT). Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração usada.

3.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR MTT

Esse método visa avaliar a citotoxicidade, pela redução do MTT que em sua forma oxidada é solúvel em água e possui uma coloração amarela. Ao ser reduzido, o MTT se transforma em cristais de formazan, um sal de coloração roxa e

insolúvel em água. Essa reação de redução ocorre pelas desidrogenases mitocondriais das células, fazendo com que a viabilidade celular seja diretamente proporcional à produção de formazan (Mosmann, 1983).

Após a incubação das células com TMZ e NPAu10, NPAu20 e NPAu30 por 24, 48 e 72 horas, foi preparada uma solução de 0,5 mg/mL de MTT diluído em PBS. O DMEM contendo os tratamentos foi retirado dos poços e 100 µL da solução de MTT foi adicionado em cada poço e incubado por 3 horas (5% de CO₂ a 37°C) para permitir a formação dos cristais de formazan. Em seguida, foi retirada a solução de MTT e adicionado 150 µL/poço de álcool isopropílico, a fim de solubilizar os cristais de formazan.

Por fim, absorvância foi lida em um leitor de placas, em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram apresentados como porcentagem de mortalidade celular, onde o grupo controle mimetiza 100% das células mortas.

3.7 TRATAMENTO COM TMZ ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO

A partir dos resultados obtidos até aqui, as concentrações de NPAu a serem associadas à TMZ foram escolhidas, sob o critério de não causarem mais do que 50% de mortalidade em células normais, sendo então utilizadas a partir de então apenas as concentrações de 10 e 15 µg/mL de NPAu. Em relação as concentrações de TMZ, foram escolhidas as de 19,4, 14,5 e 9,7 µg/mL, onde o critério para escolha dessas foi o de serem concentrações mais baixas que as utilizadas atualmente na literatura, mas que ainda causassem morte em células B16F10.

A associação das mesmas foi então adicionada as células já plaqueadas e aderidas a placa, nas concentrações mostradas na Figura 7, onde TNPAu é a associação da TMZ com a NPAu, conforme o tamanho da NP sintetizada. A incubação com o tratamento foi realizada seguindo o período de 24, 48 e 72 horas como realizado na primeira etapa (NPAu e TMZ livres). Após esse período o teste de MTT foi realizado novamente seguindo o mesmo protocolo.

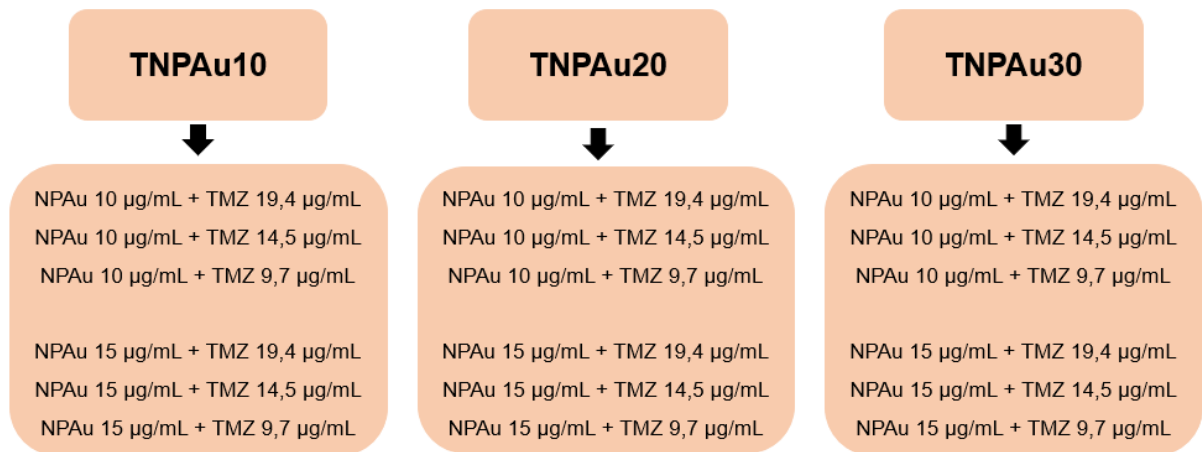


Figura 7: Tamanho e concentrações das NPAu associadas a TMZ (TNPAu). TNPAu10: TMZ associada a NPAu de 10 nm; TNPAu20: TMZ associada a NPAu de 20 nm; TNPAu30: TMZ associada a NPAu de 30 nm. Fonte: a autora.

3.8 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% E ÍNDICE DE COMBINAÇÃO

A concentração inibitória (CI_{50}) foi determinada usando o software Graphprism 8.0. Para analisar se houve efeito citotóxico sinérgico, aditivo ou antagonico, também foi calculado o Índice de Combinação (IC) de acordo com Chou e Talalay (1984), através da seguinte equação:

$$IC = \frac{TMZc}{TMZ} * \frac{NPAuc}{NPAu}$$

Onde:

TMZc = representa o valor da CI_{50} da TMZ combinada;

NPAuc = representa o valor da CI_{50} da NPAu combinada;

TMZ = representa o valor da CI_{50} da TMZ livre;

NPAu = representa o valor da CI_{50} da NPAu livre.

A interpretação dos valores encontrados, se deu da seguinte forma:

- $IC < 1$, representa efeito sinérgico, o que indica que a TMZ combinada as NPAu reforçam a ação uma da outra;
- $IC = 1$, representa aditivo; o que indica que a TMZ combinada as NPAu produzem um efeito final quantitativamente igual à soma dos efeitos produzidos por elas individualmente;

- $C > 1$, representa antagonismo, o que indica que a TMZ combinada as NP Au reduzem e/ou neutralizam a ação uma da outra.

3.9 TESTE DE HEMÓLISE

O ensaio de hemólise foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Feuser et al. (Feuser et al. 2015). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Criciúma, Brasil). Os glóbulos vermelhos humanos (eritrócitos) foram obtidos de três doadores saudáveis. O sangue foi coletado em tubos contendo 3,2% de citrato de sódio.

Quatro mililitros de sangue total foram adicionados a 8 mL de uma solução salina estéril, e os eritrócitos foram isolados do soro por centrifugação a $1500 \times g$ por 10 min e lavados três vezes com a solução salina. Após a lavagem final, os eritrócitos foram diluídos em tubo Eppendorf em 2 mL de solução salina e, em seguida, 40 μL da diluição foram adicionados a 960 μL de soro fisiológico em novo tubo. Os eritrócitos foram incubados com os tratamentos (TMZ, TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30) nas mesmas concentrações utilizadas para o teste de MTT, a 37°C sob condições de agitação (100 rpm) por 60 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 5 min, e 100 μL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços, e a absorbância foi medida a 540 nm (SpectraMax M3). Como controles positivo e negativo, 40 μL da suspensão de eritrócitos foram incubados com 960 μL de água destilada e solução salina, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos por meio de porcentagem da hemólise, obtidos a partir da equação abaixo:

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} \times 100$$

Onde:

- D_t = absorbância amostra teste;
- D_{nc} = absorbância controle negativo;
- D_{pc} = absorbância controle positivo.

O teste de hemólise apenas nas NPau foi realizado e publicado anteriormente por nosso grupo de pesquisa por Della Vechia et al., (2020).

3.10 ENSAIO DE APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A TMZ é um agente alquilante que induz apoptose por meio de quebras de fita de DNA (Lim et al.,2019). A apoptose celular foi mensurada por citometria de fluxo (FACSVerse) usando o kit de detecção de apoptose de anexina V-fluoresceína isotiocianato (FITC) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Após tratamento com TMZ e TNPAu por 24 e 72 horas, as células foram suspensas no tampão de ligação fornecido e depois coradas com anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio (PI) por 20 minutos no escuro, à temperatura ambiente, seguindo o protocolo do fabricante. As intensidades fluorescentes das células foram detectadas por citometria de fluxo (BD Biosciences), e as populações de anexina V+/PI- e anexina V+/PI + foram consideradas indicadores de células apoptóticas.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados em triplicata. Os dados foram expressos em porcentagem e analisados estatisticamente pelo software Prisma 8.0. A análise estatística foi feita por Anova de duas vias seguida pelo teste de Tukey. Para determinação da CI_{50} , foi realizado a log de cada concentração também no software Prisma 8.0.

4 RESULTADOS

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

4.1.1 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros de absorbância e comprimento de onda das NPAu e da TNPAu foram analisados através da espectrofotometria UV-Vis. Como mostra a figura 8, as NPAu e as TNPAu, apresentaram picos de comprimento de onda similares, conforme a NPAu utilizada, nos valores de 519 nm, 523 nm e 536 nm, respectivamente.

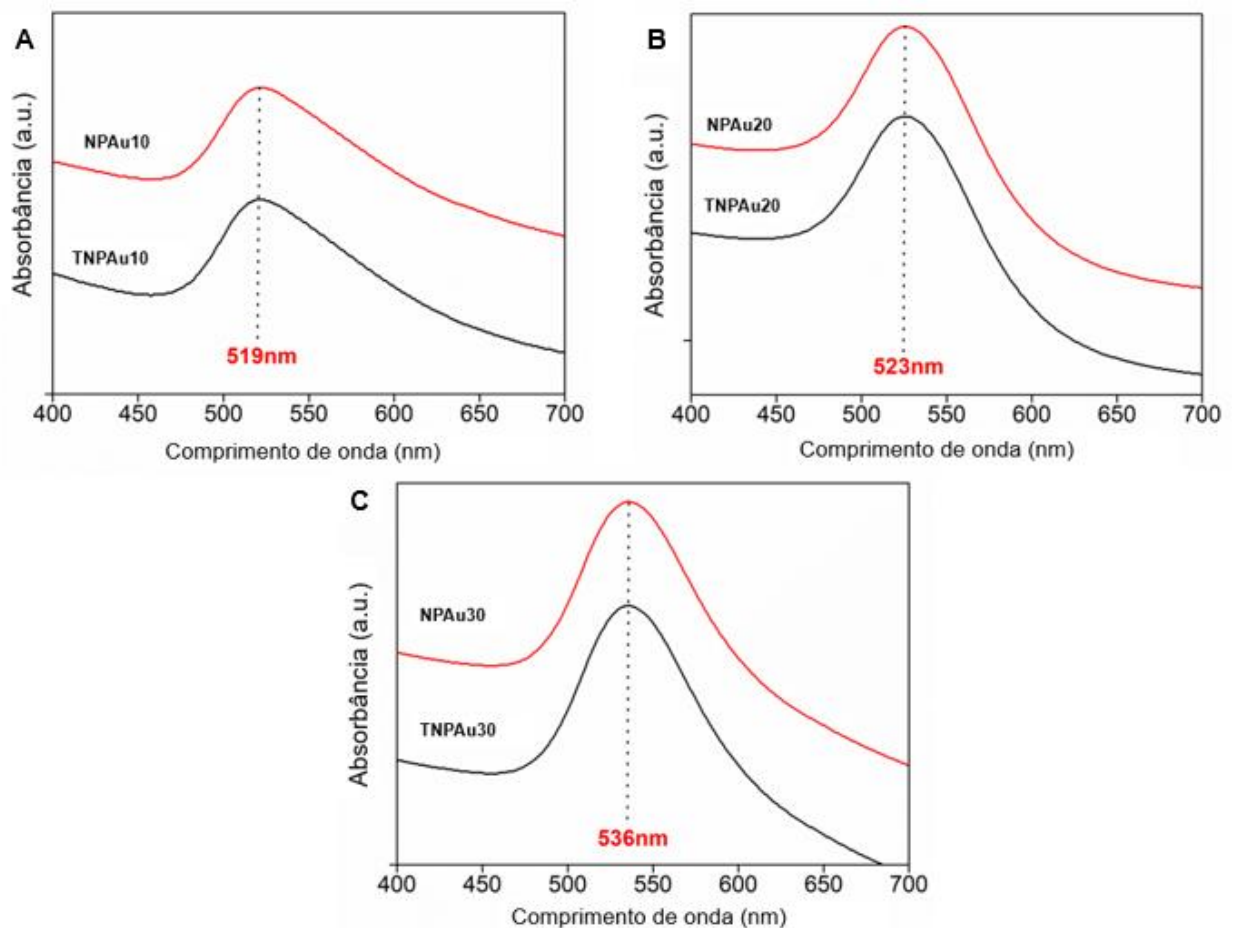


Figura 8: Espectros de absorbância e comprimento de onda de UV-Vis de soluções de NPAu e TNPAu com diferentes tamanhos. (A): NPAu10 e TNPAu10; (B): NPAu20 e TNPAu20; (C): NPAu30 e TNPAu30.

4.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A determinação da morfologia das TNPAu foi realizada através da microscopia eletrônica de transmissão. Como pode ser visto na Figura 9A, a TNPAu10 apresentou formato esférico. Contudo a TNPAu20 (Figura 9B) e a TNPAu30 (Figura 9C) apresentaram formato semiesférico.

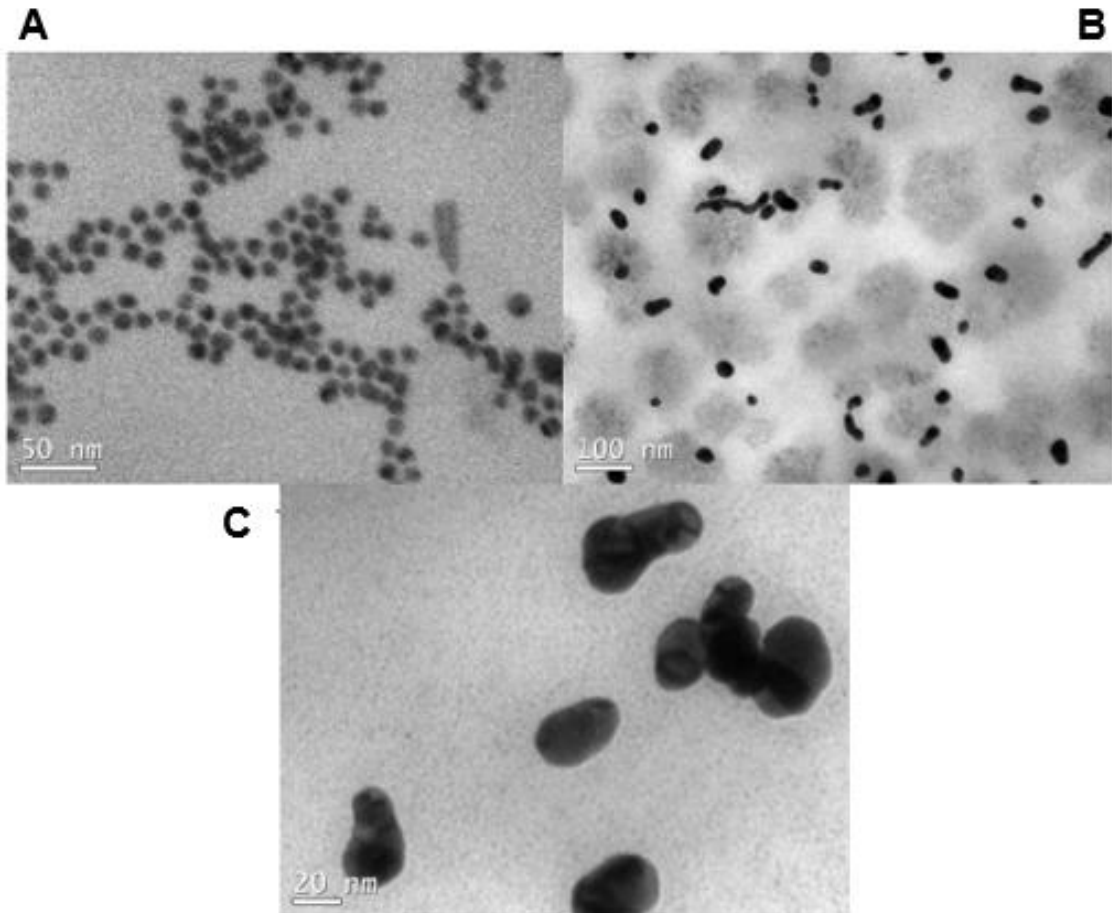


Figura 9: Imagens de MET das soluções. TNPAu10 (A) com escala de 50 nm, TNPAu20 (B) com escala de 100 nm e TNPAu30 (C) com escala de 20 nm.

4.1.3 Índice de polidispersão e potencial zeta

Conforme observado na Tabela 1, foi avaliado o índice de polidispersão (IPd) e o potencial zeta das soluções de NPAu e TNPAu. As NPAu10 apresentaram IPd $>0,2$ e potencial zeta de -37 mV (± 4). As NPAu20 apresentaram IPd $>0,2$ e potencial zeta de -27 mV (± 3). As NPAu30 apresentaram IPd $>0,3$ e potencial zeta de -20 mV (± 5).

Em relação as soluções de TNPAu, as TNPAu10 apresentaram $IP_d > 0,3$ e potencial zeta de $-17 \text{ mV} (\pm 4)$. As TNPAu20 apresentaram $IP_d > 0,3$ e potencial zeta de $-20 \text{ mV} (\pm 2)$. As TNPAu30 apresentaram $IP_d > 0,3$ e potencial zeta de $-13 \text{ mV} (\pm 4)$.

Amostras	IP_d	Potencial Zeta (mV)
NPAu10	< 0.2	$- 37 \pm 4^*$
NPAu20	< 0.2	$- 27 \pm 3$
NPAu30	< 0.3	-20 ± 5
TNPAu10	< 0.3	$- 17 \pm 4^*$
TNPAu20	< 0.3	$- 20 \pm 2$
TNPAu30	< 0.3	$- 13 \pm 4$

Tabela 1: Índice de polidispersão e potencial zeta das soluções de NPAu e TNPAu. \pm Desvio padrão médio de $n = 6$.

4.1.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para observar a ligação de íons citrato com os NPAu e verificar se houve algum tipo de ligação/interação entre as moléculas de NPAu e TMZ (TNPAu). As estruturas químicas da TMZ e do citrato de sódio utilizado na síntese de NPAu (A) e os picos característicos (B) associados às estruturas das moléculas foram observados conforme mostra a Figura 10 e mais detalhadamente na Tabela 2.

A FTIR para TMZ apresentou bandas mais significativas nos números de onda de 3375 cm^{-1} (N-H), 1450 cm^{-1} (C-C), 1250 cm^{-1} (C-N) e 965 cm^{-1} (C-H). Em relação as TNPAu, todas as soluções (TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30) mostraram picos mais significativos nos números de onda de 3450 cm^{-1} (O-H), 1586 cm^{-1} (C=O) e 1350 cm^{-1} (COO⁻). Não houve semelhanças entre o FTIR da TMZ e das amostras de TNPAu.

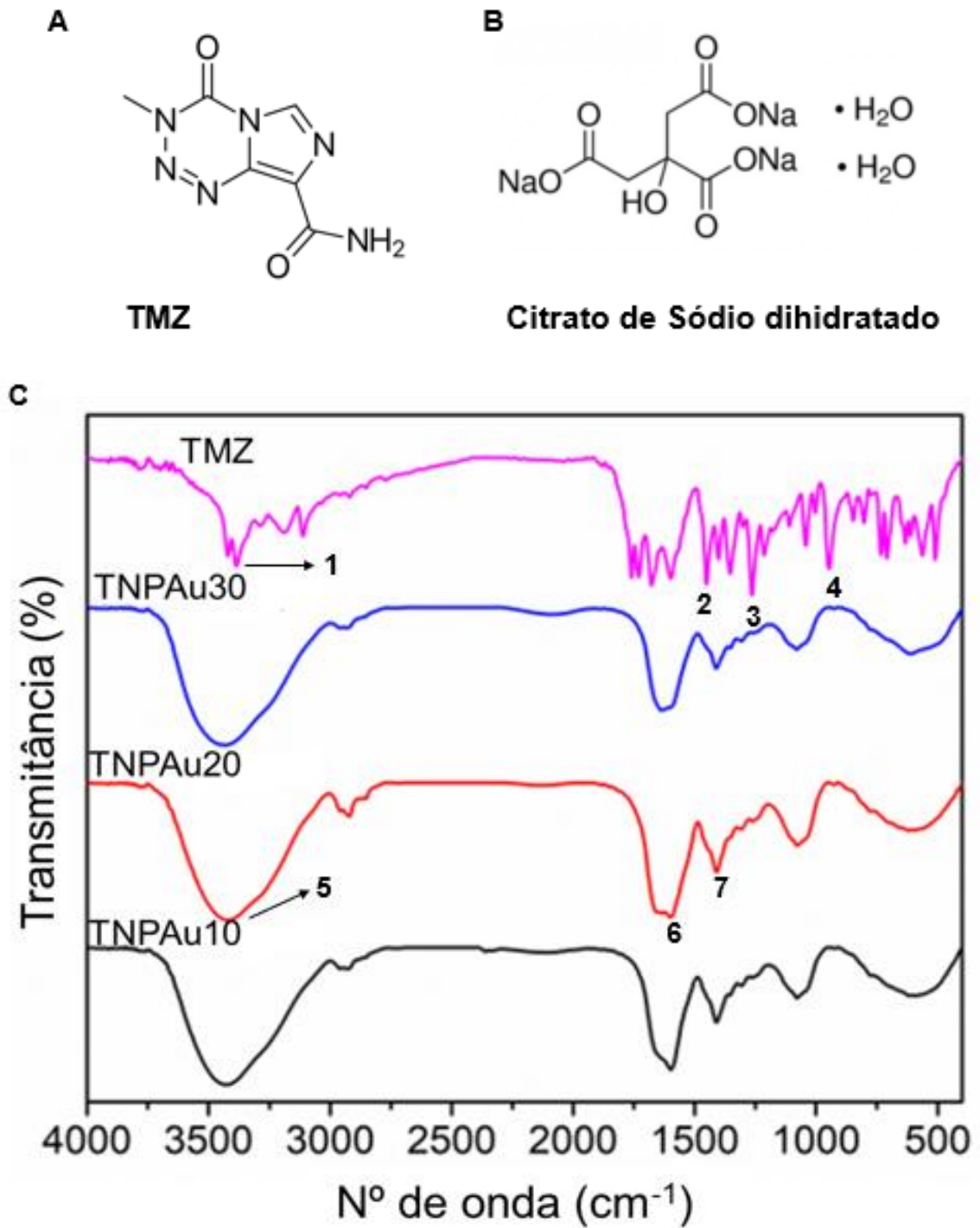


Figura 10: Estrutura química da TMZ (A) e do Citrato de sódio dihidratado (B) e Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (C): Em soluções de TMZ (rosa), TNPAu10 (preto), TNPAu20 (vermelho) e TNPAu30 (azul).

Número do pico	Solução	nº de onda (cm ⁻¹)	Grupamento característico
1	TMZ	3375	N-H
2	TMZ	1450	C-C
3	TMZ	1250	C-N
4	TMZ	965	C-H
5	TNPAu	3450	O-H
6	TNPAu	1586	C=O
7	TNPAu	1395	COO ⁻

Tabela 2: Grupamentos químicos destacados na espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier da TMZ e TNPAu em função das bandas de absorção.

4.2 CITOTOXICIDADE DA TMZ/NPAu e TNPAu EM CÉLULAS B16F10 E NIH3T3

Células de câncer de pele do tipo melanoma B16F10 foram expostas à TMZ em diferentes concentrações no período de 24, 48 e 72 horas. Como pode ser visto na Figura 11A, não houve diferença significativa entre os períodos de tempo de incubação com a TMZ. Em relação as diferentes concentrações, apenas a concentração de 35 µg/mL (48 h e 72 h) e 24,2 µg/mL (24 h e 48 h) apresentaram mortalidade acima de 25%.

As mesmas concentrações de TMZ foram também adicionadas às células NIH3T3 (fibroblastos) no período de 24, 48 e 72 horas. Em relação ao período de incubação com o quimioterápico, não houve diferença significativa. Em relação as concentrações, nenhuma concentração levou a uma mortalidade celular acima de 25% (Figura 11B). Apenas a concentração de 35 µg/mL mostrou uma pequena mortalidade nas células NIH3T3.

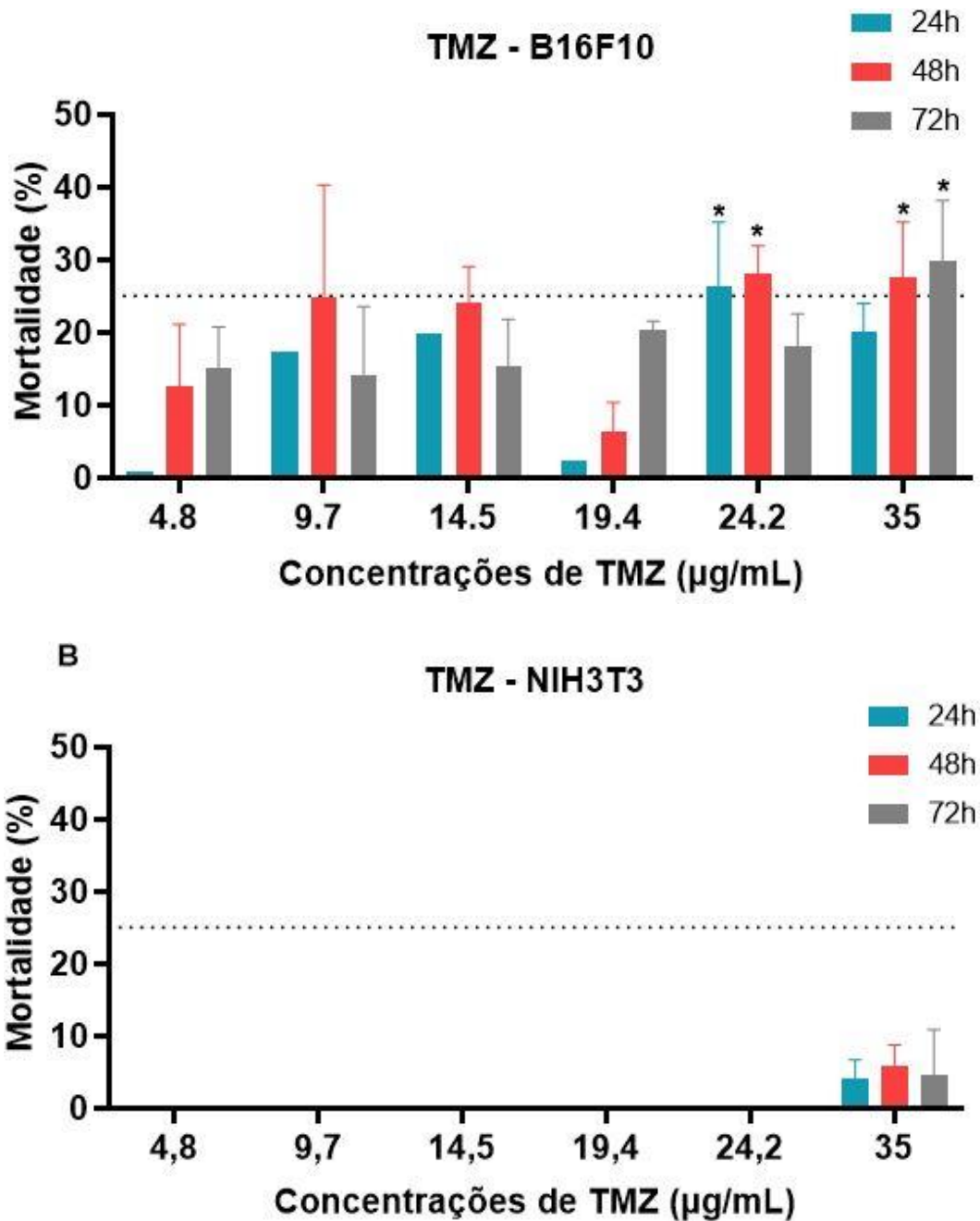


Figura 11: Citotoxicidade in vitro da TMZ em diferentes concentrações em células B16F10 (A) e (B) NIH3T3 nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Diferenças significativas ($p > 0.0001$) acima de 25% de mortalidade são apresentadas com *, quando comparado ao controle (CT); Anova de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

As células B16F10 foram expostas então as NPAu10, em diferentes concentrações no período de 24, 48 e 72 horas. Como pode ser visto na Figura 12, não houve diferença significativa entre os períodos de tempo de incubação com as NPAu10. Quanto as concentrações, as células tratadas com concentrações de 10 µg/mL (72 h), 15 µg/mL (24 e 72 h) e 25 µg/mL (24, 48 e 72 h) apresentaram

mortalidade acima de 25%. Já as células tratadas com a concentração de 35 µg/mL mostraram mortalidade acima de 50% em todos os períodos de incubação.

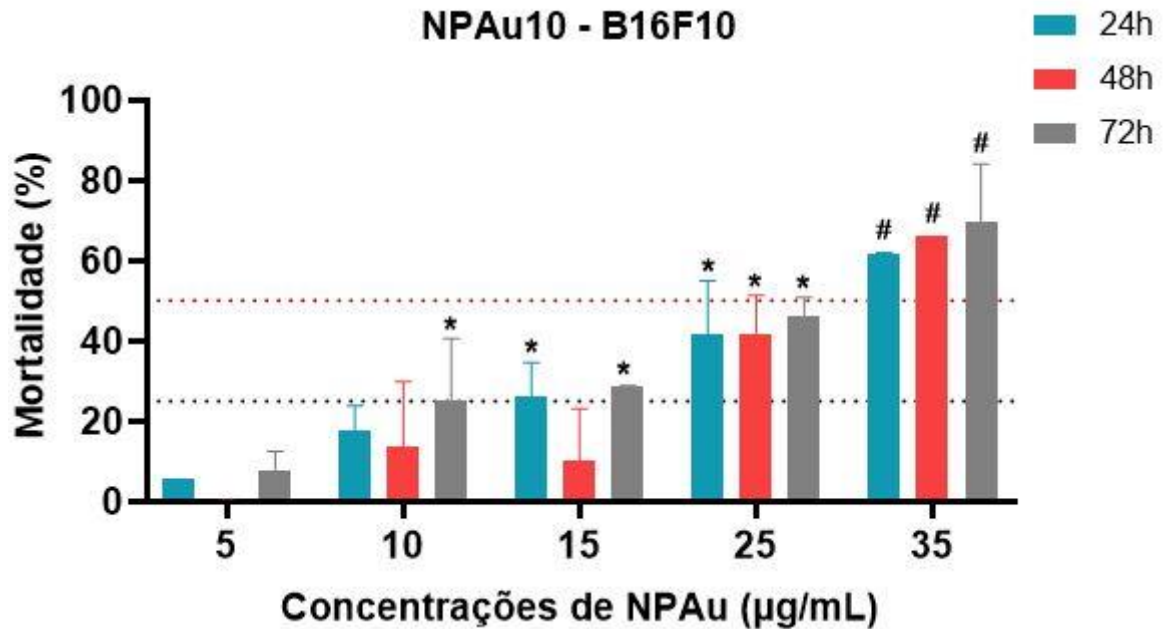


Figura 12: Citotoxicidade in vitro das NPAu10 em diferentes concentrações em células B16F10 nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Diferenças significativas acima de 25% ($p = >0.0001$) de mortalidade são apresentadas com *, diferenças significativas acima de 50% ($p = 0,0038$) de mortalidade são apresentadas com #, quando comparado ao controle (CT); Anova de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

Em seguida as células B16F10 foram expostas a NPAu20, incubadas também nos períodos de 24, 48 e 72 horas (Figura 13). Em relação ao período de incubação, houve diferença significativa de 24 horas para 48 horas ($p = 0.01$) e de 48 horas para 72 horas ($p = 0.0009$). Quanto as concentrações, as células que foram expostas a 5 µg/mL (24 h), 15 µg/mL (72 h), 25 µg/mL (24 e 72 h) e 35 µg/mL (24 e 48 h) de NPAu20 apresentaram mortalidade acima de 25%. Células expostas a 35 µg de NPAu20 por um período de 72 horas apresentaram mortalidade acima de 50%.

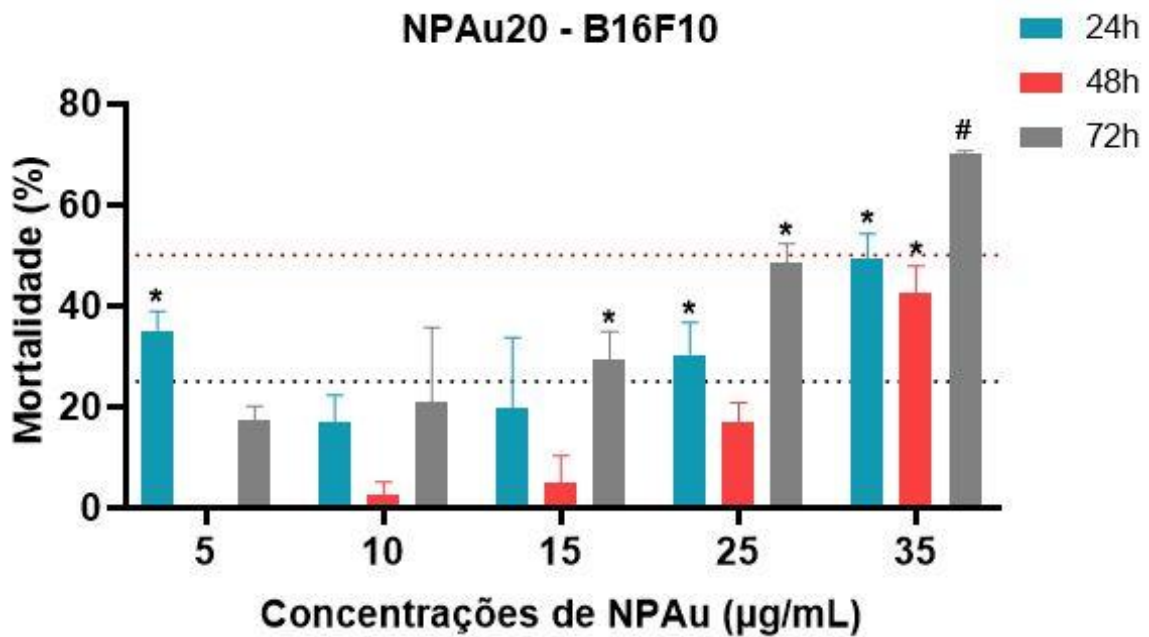


Figura 13: Citotoxicidade in vitro das NPAu20 em diferentes concentrações em células B16F10 nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Diferenças significativas acima de 25% ($p= 0.0006$; 0.0002 ; 0.0007 ; 0.0027 respectivamente) de mortalidade são apresentadas com *, diferenças significativas acima de 50% ($p= 0.0027$) de mortalidade são apresentadas com #, quando comparado ao controle (CT); Anova de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

NPAu30 foram adicionadas a células B16F10 também, sendo incubadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas (Figura 14). Em relação ao período de incubação das NPAu30, houve diferença significativa de 24 horas para 48 horas ($p= 0.007$) e de 48 horas para 72 horas ($p= 0.01$). Quanto as concentrações de NPAu30 utilizadas, células B16F10 apresentaram mortalidade acima de 25% quanto expostas as concentrações de 15 µg/mL (24 h) e 25 µg/mL (24 e 48 h). Quando expostas as concentrações de 25 µg/mL (72 h) e de 35 µg/mL (24, 48 e 72 h) de NPAu30, as células B16F10 apresentaram mortalidade acima de 50%.

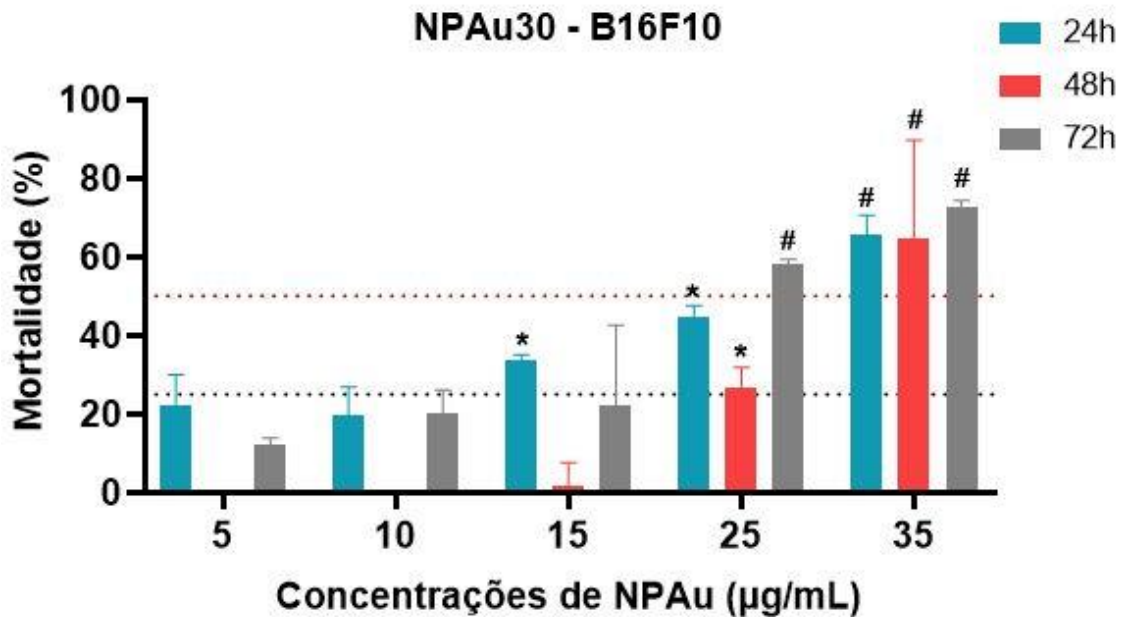


Figura 14: Citotoxicidade in vitro das NPAu30 em diferentes concentrações em células B16F10 nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Diferenças significativas acima de 25% ($p= 0.0006$; 0.0013 respectivamente) de mortalidade são apresentadas com *, diferenças significativas acima de 50% ($p= 0.0013$; 0.0086 respectivamente) de mortalidade são apresentadas com #, quando comparado ao controle (CT); Anova de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

Após definidas as concentrações a serem utilizadas para cada associação, as células B16F10 (Figura 15A) e NIH3T3 (Figura 15B) foram expostas, por um período de 24 horas, a TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30. Em relação ao tamanho das TNPAu, em células B16F10 houve uma diferença significativa ($p= 0.03$) entre a TNPAu10 e a TNPAu30, onde a TNPAu30 apresentou maior mortalidade em B16F10. Em células NIH3T3 houve diferença significativa entre TNPAu10 e TNPAu20 ($p= 0,002$) e entre TNPAu10 e TNPAu30 ($p= 0,0006$), onde a TNPAu10 levou a uma maior mortalidade de células NIH3T3.

Em relação as concentrações testadas, todas mostraram diferença significativa quando comparadas ao controle (Figura 15A e Figura15B). As células B16F10 expostas as concentrações de 10/19 µg/mL (TNPAu30), 10/14 µg/mL (TNPAu20), 10,9,7 µg/mL (TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30) 15/19,4 µg/mL (TNPAu10 e TNPAu20), 15/14,5 µg/mL (TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30) e 15/9,7 µg/mL (TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30) apresentaram mortalidade acima de 25%. Já a concentração de 15/19 µg/mL (TNPAu30) levou a uma mortalidade acima de 50%. Em células NIH3T3, apenas a concentração de 10/19,4 µg/mL (TNPAu10) levou a uma mortalidade acima de 25%.

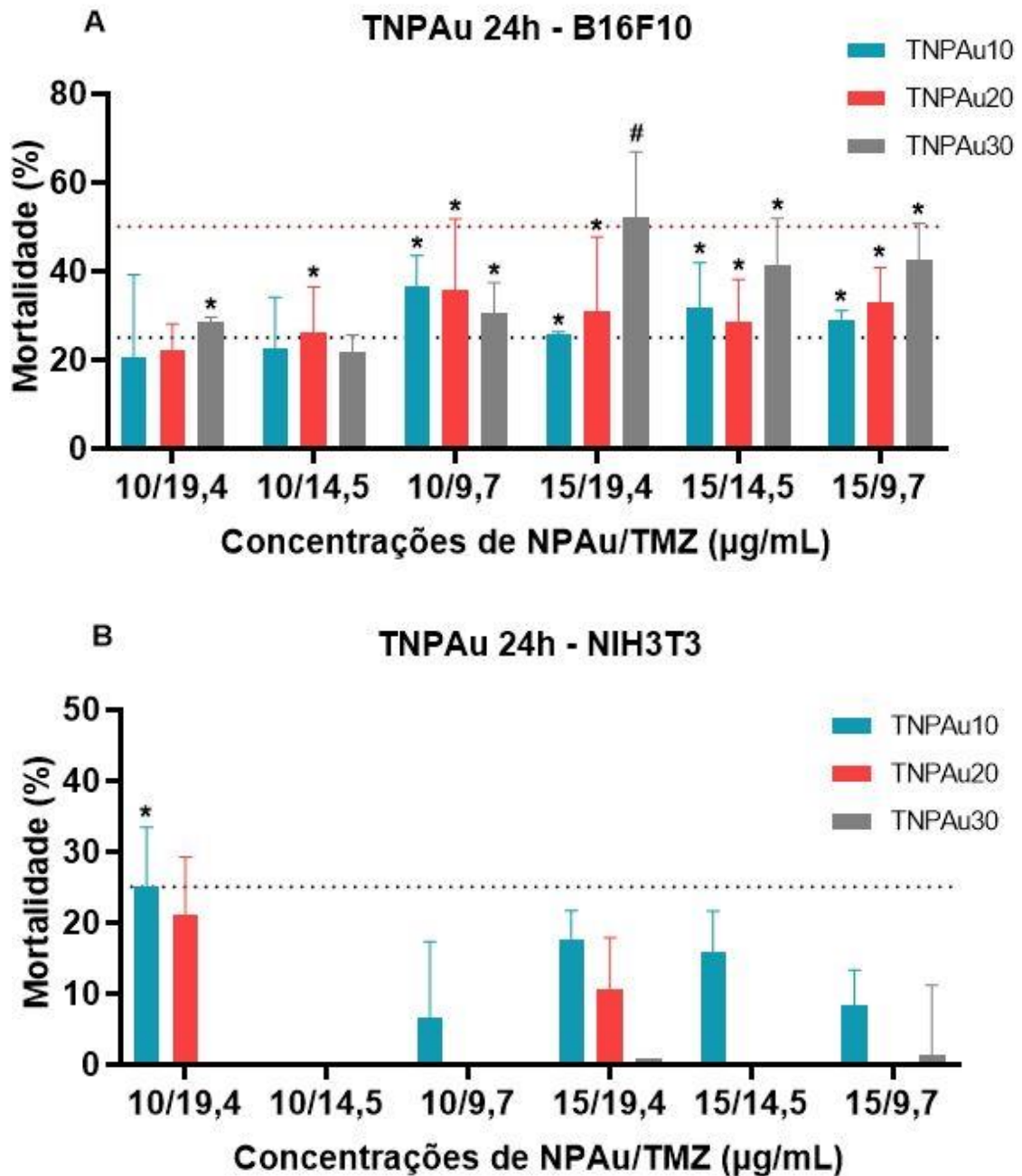


Figura 15: Citotoxicidade in vitro das soluções de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 em diferentes concentrações em células (A) B16F10 e (B) NIH3T3 no período de 24 horas. Diferenças significativas acima de 25% ($p = <0.0001$) de mortalidade são apresentadas com *, diferenças significativas acima de 50% ($p = 0.0011$) de mortalidade são apresentadas com #, quando comparado ao controle (CT); Anova de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

As mesmas combinações foram testadas em células B16F10 (Figura 16A) e em células NIH3T3 (Figura 16B) em um período de incubação de 48 horas. Quanto ao tamanho das TNPAu, em células B16F10 não houve diferença significativa entre elas. Já em células NIH3T3 houve diferença significativa entre TNPAu10 e TNPAu20 ($p = <0.0001$), onde a TNPAu10 levou a uma maior mortalidade de células NIH3T3.

Quanto as concentrações testadas, em células B16F10 e NIH3T3, todas as concentrações apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle. Em B16F10, quando expostas a TNPAu10, todas as concentrações levaram a uma mortalidade acima de 25%. Quando expostas a TNPAu20 e TNPAu30 apenas as concentrações de 10/19,4, 15/19,4, 15/14,5 e 15/9,7 $\mu\text{g/mL}$ levaram as células B16F10 a uma mortalidade acima de 25%. Já em NIH3T3 (Figura 16B), nenhuma das concentrações testadas levou a mortalidade acima de 25%.

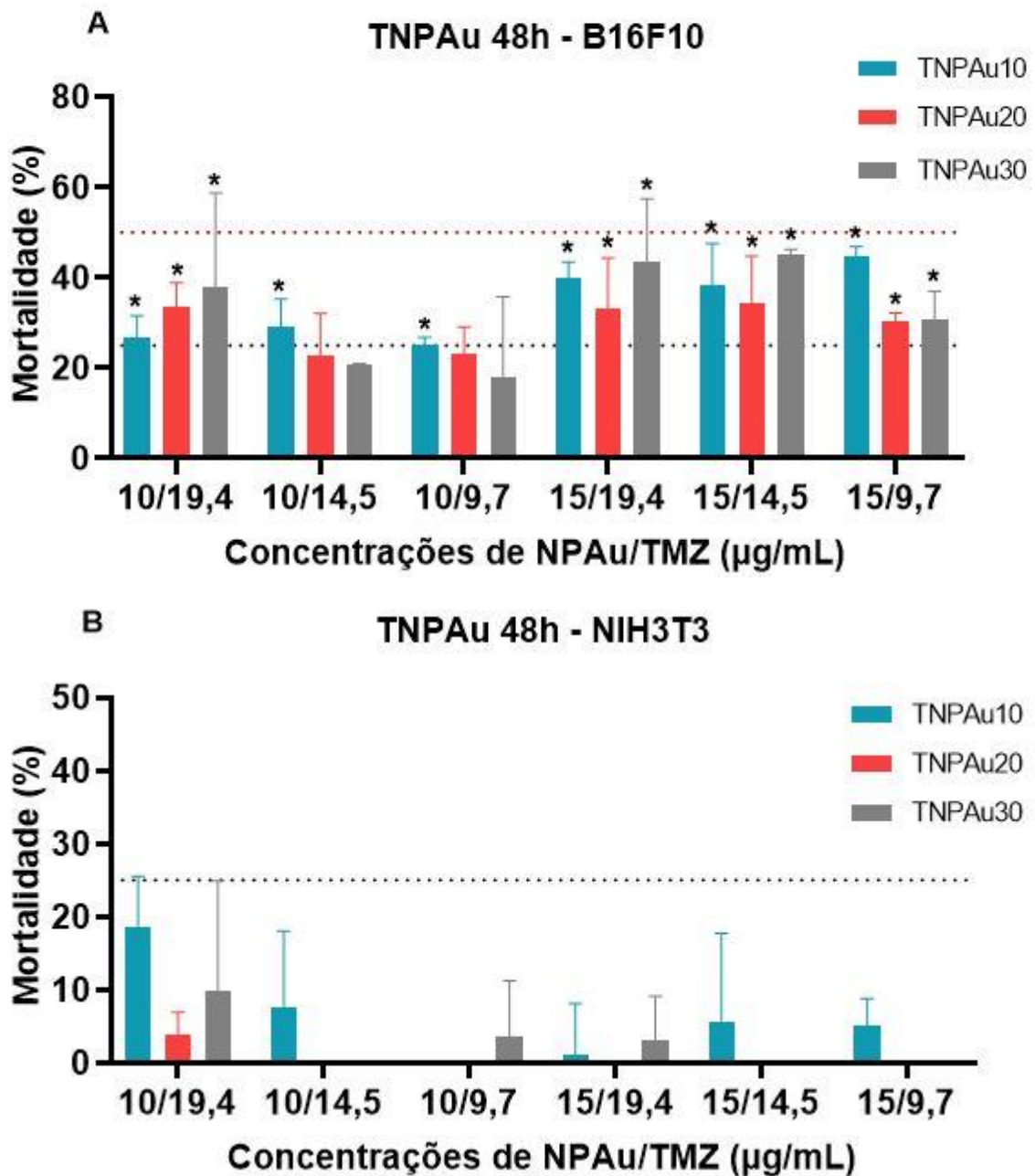
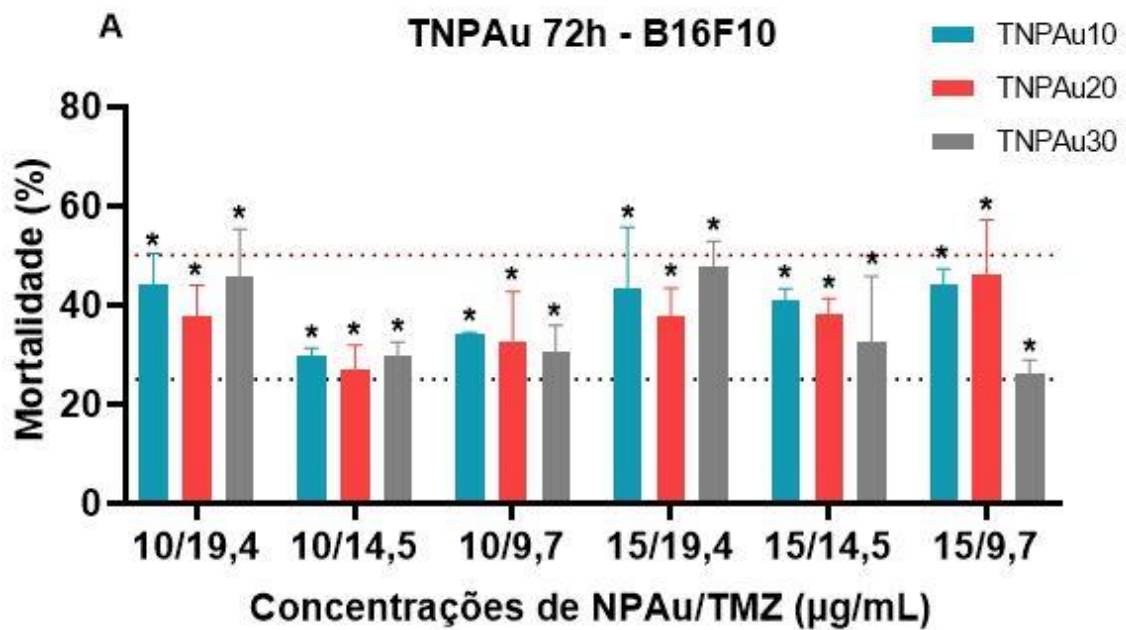


Figura 16: Citotoxicidade in vitro das soluções de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 em diferentes concentrações em células (A) B16F10 e (B) NIH3T3 no período de 48 horas. Diferenças significativas acima de 25% ($p = <0.0001$) de mortalidade são apresentadas com *, quando comparado ao controle (CT); Anova de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

O período de 72 horas de incubação das TNPAu com células B16F10 (Figura 17A) e NIH3T3 (Figura 17B) foi de mesmo modo testado. Quanto ao tamanho das TNPAu, em células B16F10 não houve diferença significativa entre elas. Já em NIH3T3 houve diferença significativa entre a TNPAu10 e TNPAu30 ($p= 0.01$), onde a TNPAu10 levou a uma maior mortalidade de células NIH3T3.

Em relação as concentrações, em células B16F10 e NIH3T3, todas as concentrações apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle. Nas células B16F10, todas as concentrações de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 levaram a uma mortalidade das células acima de 25%. Em contrapartida apenas a concentração 15/9,7 $\mu\text{L/mL}$ (TNPAu10) levou a uma mortalidade superior a 25% em células NIH3T3.



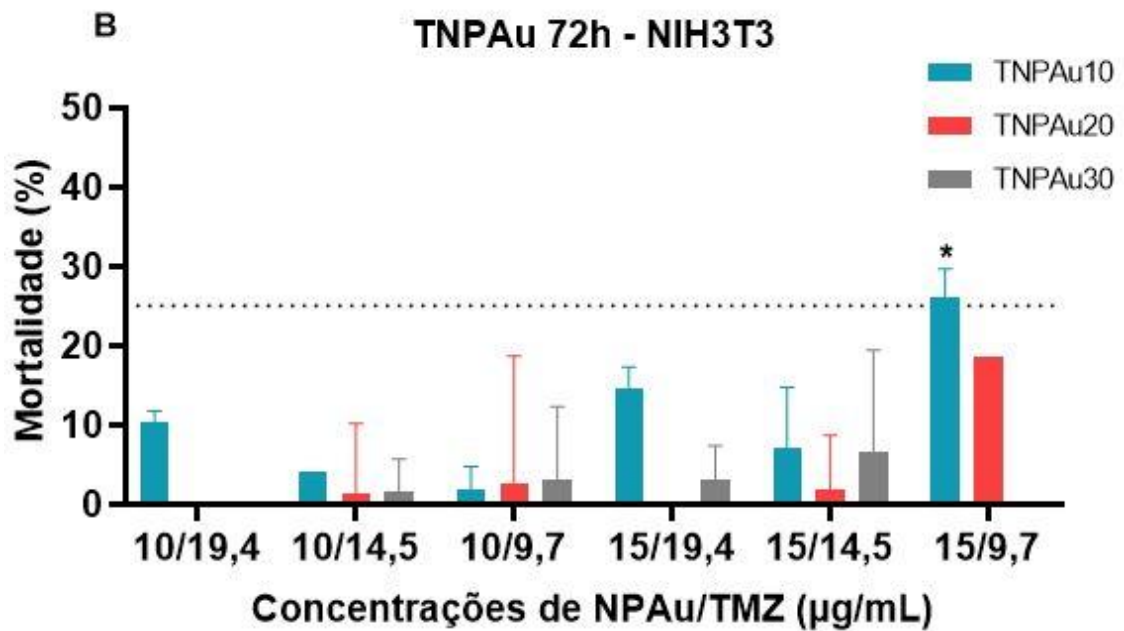


Figura 17: Citotoxicidade in vitro das soluções de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 em diferentes concentrações em células (A) B16F10 e (B) NIH3T3 no período de 72 horas. Diferenças significativas acima de 25% ($p = <0.0001$) de mortalidade são apresentadas com *, quando comparado ao controle (CT); Anova de duas vias seguida pelo teste de Tukey.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CI_{50} E ÍNDICE DE COMBINAÇÃO (SINERGISMO)

Para confirmar em quais concentrações ocorreu 50% de mortalidade celular, realizou-se a CI_{50} de cada solução utilizada, bem como o IC dessas soluções para analisar se houve efeitos citotóxicos sinérgicos, aditivos ou antagonísticos. Como pode ser visto na Tabela 3, o TMZ sozinho apresentou valores de CI_{50} de 276,5, 676,8 e 241,9 µg/mL para os períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas respectivamente. Em relação as NPAu, a NPAu10 apresentou valores de CI_{50} de 28,1, 28,2 e 24 µg/mL, a NPAu20 valores de CI_{50} de 116,8, 38,4 e 23,6 µg/mL e a NPAu30 valores de CI_{50} de 25,5, 30,9 e 22,4 µg/mL para os períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas respectivamente.

Na análise de CI_{50} das soluções combinadas, a solução TNPAu10* apresentou valores de CI_{50} de 6,1, >100 e 33,1 µg/mL (TMZ) e 27,4, 3,8 e 5,9 µg/mL (NPAu) e TNPAu10** apresentou valores de CI_{50} de 0,2, 3,9 e 0,3 µg/mL (TMZ) e 36, 21,7 e 20 µg/mL (NPAu) para os períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas respectivamente. Quanto ao IC, exceto o da TNPAu10* (48 h), que apresentou IC de 1,95, mostrando um efeito antagonista, todos os outros valores de IC de TNPAu10* e

TNPAu10** apresentaram valores $<1,0$, indicando que houve um efeito sinérgico na associação. A solução de TNPAu20* apresentou valores de CI_{50} de 5,3, 49,7 e >100 $\mu\text{g/mL}$ (TMZ) e 25,2, 3,9 e 4,9 $\mu\text{g/mL}$ (NPAu) e TNPAu20** apresentou valores de CI_{50} de 0,1, >100 e 6,8 $\mu\text{g/mL}$ (TMZ) e 32,9, 7,4 e 21,8 $\mu\text{g/mL}$ (NPAu) para os períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas respectivamente. Quanto ao IC, todos os períodos de incubação para TNPAu20* e TNPAu20** apresentaram $IC >1,0$ mostrando assim efeito sinérgico da associação. Por fim, a solução de TNPAu30* apresentou valores de CI_{50} de 0,3, 29 e 27,8 $\mu\text{g/mL}$ (TMZ) e 25,6, 3,4 e 5,3 $\mu\text{g/mL}$ (NPAu) e TNPAu30** apresentou valores de CI_{50} de 21,6, 23,7 e 21,6 $\mu\text{g/mL}$ (TMZ) e 12, 9,9 e 8,7 $\mu\text{g/mL}$ (NPAu) para os períodos de incubação de 24, 48 e 72 horas respectivamente. Quanto ao IC, em todos os períodos de incubação, a TNPAu30* e a TNPAu30** apresentou $IC <1,0$, mostrando que houve efeito sinérgico nas associações de TMZ e NPAu.

Solução	24 h		48 h		72 h		24 h	48 h	72 h
	CI_{50}		CI_{50}		CI_{50}		IC	IC	IC
	TMZ	NPAu	TMZ	NPAu	TMZ	NPAu			
TMZ	276,5	x	676,8		241,9		NA	NA	NA
NPAu10	x	28,1	x	28,2	x	24,0	NA	NA	NA
NPAu20	x	116,8	x	38,4	x	23,6	NA	NA	NA
NPAu30	x	25,5	x	30,9	x	22,4	NA	NA	NA
TNPAu10*	6,1	27,4	>100	3,8	33,1	5,9	0,0214	1,9503	0,0339
TNPAu10**	0,2	36,0	3,9	21,7	0,3	20,0	0,0008	0,0044	0,001
TNPAu20*	5,3	25,2	49,7	3,9	>100	4,9	0,0041	0,0075	0,3775
TNPAu20**	0,1	32,9	>100	7,4	6,8	21,8	0,0001	0,2796	0,0258
TNPAu30*	0,3	25,6	29,0	3,4	27,8	5,3	0,0011	0,0048	0,0274
TNPAu30**	21,6	12,0	23,7	9,9	21,6	8,7	0,0369	0,0112	0,0348

Tabela 3 - Valores de CI_{50} e de IC das diferentes soluções, em $\mu\text{g/mL}$, de forma livre e associados (TNPAu), em células B16F10. CI_{50} = Concentração inibitória de 50%; IC = índice de combinação; NA = não analisado. *Solução contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de NPAu e diferentes concentrações de TMZ; ** Solução contendo 15 $\mu\text{g/mL}$ de NPAu e diferentes concentrações de TMZ.

4.4 HEMOTOXICIDADE

A hemotoxicidade da TMZ foi avaliada pelo ensaio de hemólise. Eritrócitos humanos foram tratados com TMZ em diferentes concentrações como mostrado na Figura 18. Nenhuma das concentrações utilizadas causaram dano hemolítico, visto que, a razão hemolítica encontrada está dentro da faixa de menos de 5%, razão hemolítica essa, segura para biomateriais de acordo com a ISO/TR 7406.

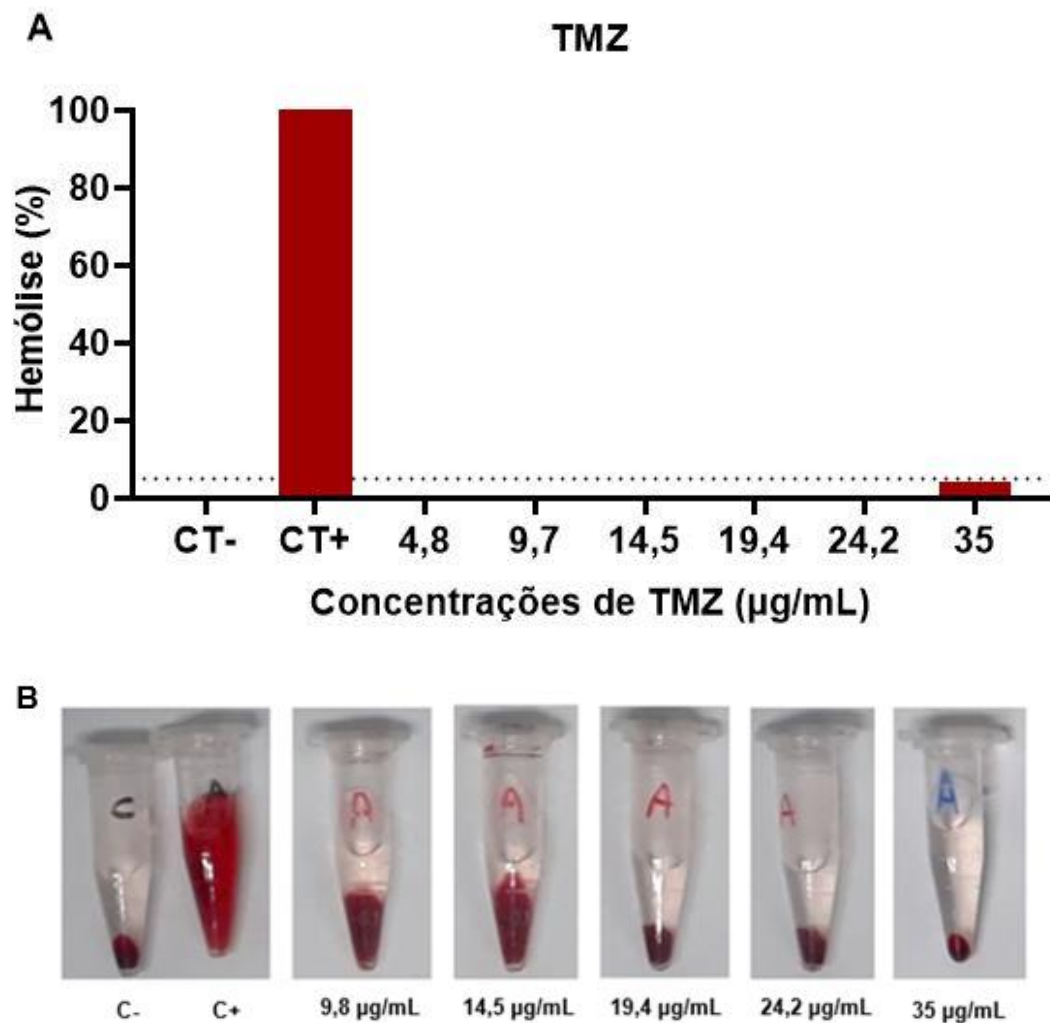


Figura 18: Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com soluções de TMZ em diferentes concentrações. (A) Porcentagem de hemólise em relação as concentrações utilizadas e (B) amostras analisadas após o uso de TMZ. Os dados representam a média \pm DP (n = 3). C-: controle negativo; C+: controle positivo.

Avaliou-se então a hemotoxicidade da TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 em diferentes concentrações como mostrado na Figura 19. Nenhuma das concentrações utilizadas na associação de NPAu ao TMZ apresentou atividade hemolítica,

mostrando assim uma possível hemocompatibilidade da associação de NP Au com a TMZ.

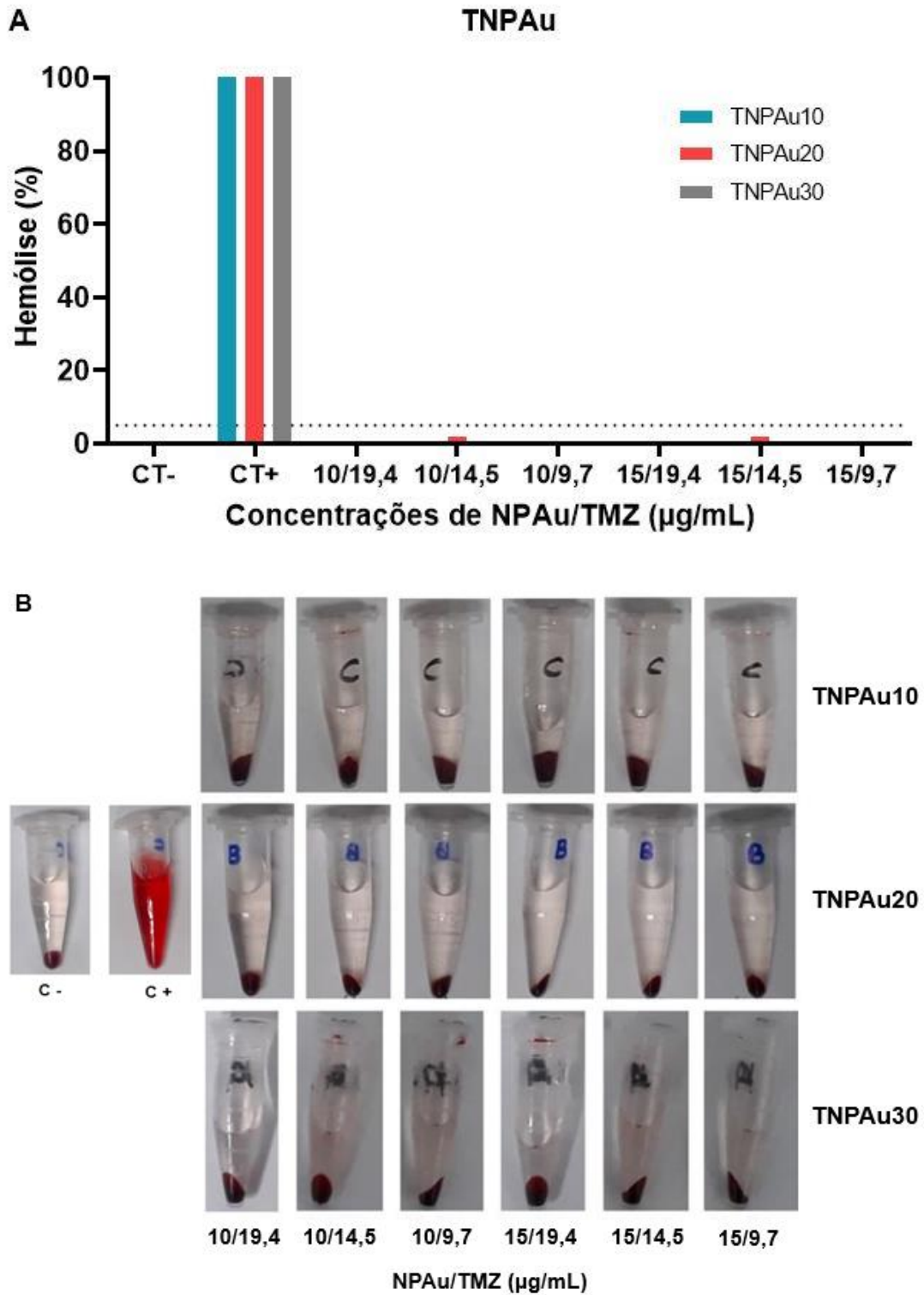


Figura 19: Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos após incubação com soluções de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 em diferentes concentrações (NPAu/TMZ em µg/mL). (A) Porcentagem de hemólise em relação as concentrações utilizadas e (B) amostras analisadas após o uso de TMZ. Os dados representam a média \pm DP (n = 3). C-: controle negativo; C+: controle positivo.

4.5 ANÁLISE DE MORTE CELULAR POR APOPTOSE E NECROSE

A análise de morte celular, por meio de apoptose e/ou apoptose tardia e/ou necrose, foi realizada através da avaliação da porcentagem de células expostas a TMZ e a TNPAu, por meio da avaliação do teste de Anexina V/PI, após exposição pelo período de 24 e 72 horas.

Para o período de exposição de 24 horas (Figura 20A) a TMZ na concentração de 19,4 µg/mL apresentou subpopulações de 26,36% de células viáveis, <1% de apoptose precoce, 68,89% de apoptose tardia e 4,03 de necrose. Para as soluções de TNPAu foi utilizada a concentração de 19,4 µg/mL (TMZ) + 10 µg/mL (NPAu). A solução de TNPAu10 apresentou subpopulações de 68,69% de células viáveis, 3,16% de apoptose precoce, 27,76% de apoptose tardia e <1% de necrose. A solução de TNPAu20 apresentou subpopulações de 49,69% de células viáveis, 4,07 de apoptose precoce, 44,84% de apoptose tardia e <1% de necrose. A solução de TNPAu30 por fim, apresentou subpopulações de 40,15% de células viáveis, 3,32 de apoptose precoce, 55,73% de apoptose tardia e <1% de necrose.

Já para o período de exposição de 72 horas (Figura 20B) a TMZ na concentração de 19,4 µg/mL apresentou subpopulações de 61% de células viáveis, 4,42% de apoptose precoce, 33,05% de apoptose tardia e 1,53% de necrose. Para as soluções de TNPAu foi utilizada a concentração de 19,4 µg/mL (TMZ) + 10 µg/mL (NPAu). A solução de TNPAu10 apresentou subpopulações de 57,02% de células viáveis, 3,97% de apoptose precoce, 37,68% de apoptose tardia e 1,33% de necrose. A solução de TNPAu20 apresentou subpopulações de 60,94% de células viáveis, 4,33% de apoptose precoce, 32,6% de apoptose tardia e 2,13% de necrose. Por fim a TNPAu30 apresentou subpopulações de 66,36% de células viáveis, 4,23% de apoptose precoce, 26,3% de apoptose tardia e 3,11% de necrose.

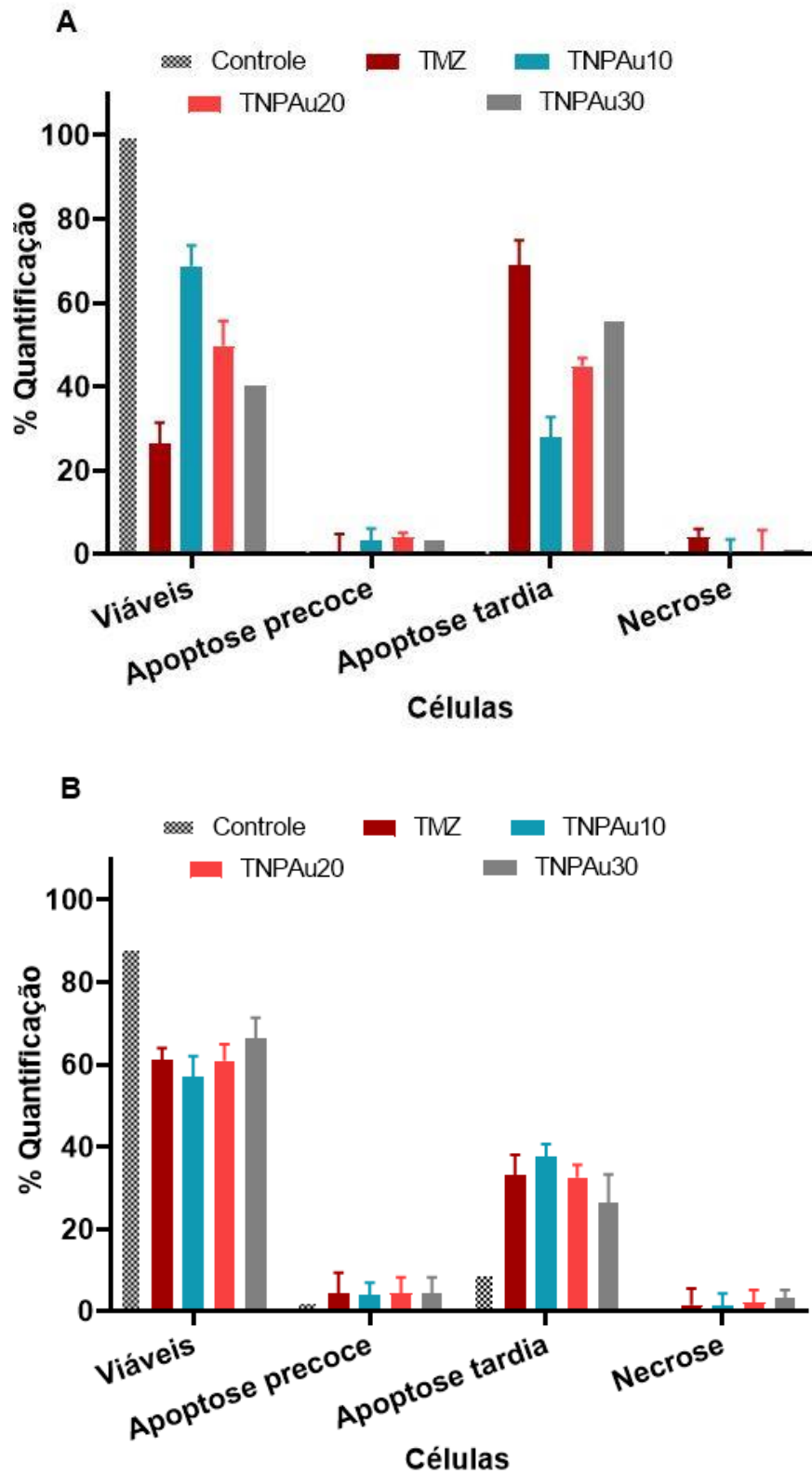


Figura 20: Quantificação de células B16F10 após 24 horas (A) e 72 horas (B) de exposição a TMZ, TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 por meio de análise de citometria de fluxo. Teste ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

5 DISCUSSÃO

O melanoma é a forma mais grave de câncer de pele, responsável pela maioria das mortes relacionadas a este. A incidência de melanoma teve um aumento drástico nos últimos anos em relação a outras malignidades. Isso se deve principalmente a baixa taxa de resposta às modalidades de tratamento existentes, muitas vezes por uma resposta incompleta dos agentes quimioterápicos e à resistência característica das células do melanoma (Mishra et al., 2018).

A remoção cirúrgica do tumor e do tecido saudável circundante é o tratamento primário para o melanoma localizado. Em algumas situações, os tumores metastáticos também podem ser removidos cirurgicamente, porém o tratamento cirúrgico no contexto de doença metastática não se destina a ser curativo e também exigirá outras opções de tratamento, sendo as terapias medicamentosas a próxima linha de defesa (Davis et al., 2019).

A TMZ tem sido estudada como tratamento do melanoma, substituindo a Dacarbazina, por sua conveniência de administração oral e devido a sua conversão em MTIC espontaneamente em pH fisiológico em todos os tecidos (Mishra et al., 2018). Ademais, a TMZ pode adentrar o sistema nervoso central, sendo uma característica importante devido ao fato de o melanoma metastático atingir o cérebro em até 75% dos pacientes (Bhatia et al. 2009; Nicholas et al. 2013).

Apesar disso, o tratamento quimioterapêutico do melanoma tem sua eficácia limitada devido à resistência que este adquire. Além disso, estes fármacos levam a morte concomitante de células saudáveis do corpo, acarretando em efeitos colaterais tóxicos devido as altas doses utilizadas (Mishra et al., 2018). Levando isso em consideração, a busca por alternativas adjuvantes capaz de minimizar tais efeitos se faz necessária.

Assim, o possível efeito terapêutico das NPAu vem sendo estudado tanto em sua forma livre quanto em associação a fármacos já utilizados, visando efeito sinérgico e aditivo no tratamento dos pacientes. Devido à sua capacidade de se acumular seletivamente no tecido tumoral (EPR), as NPAu podem servir também como detectores de células cancerosas (Huang et al., 2007). Essas características podem vir a maximizar a eficácia do fármaco e minimizar os efeitos colaterais, tipicamente associados ao uso de quimioterápicos no tratamento do câncer, por meio da redução da toxicidade sistêmica (Orza et al., 2013). No entanto ainda se faz

necessário estudos que abordem e se aprofundem mais na análise das características específicas destas NP quando associadas ao TMZ. A avaliação das propriedades físico-químicas das NPAu e da interação das soluções de TNPAu foram realizadas através espectrofotometria UV-Vis, MET, IPd, potencial zeta e FTIR.

De acordo com Pereira et al. (2013), o espectro de absorção da UV-Vis é característico para cada espécie química, sendo possível através disso a identificação desta. Como visto no trabalho de Della Vechia et al. 2020, os picos nos espectros de absorção do UV-Vis tiveram seu máximo nos mesmos comprimentos de onda dos encontrados no nosso trabalho. Quando a TMZ foi associada as NPAu utilizadas, formando a TNPAu, os picos máximos de absorção das TNPAu não se alteraram, mostrando desse modo que não houve ligação entre o TMZ e as NPAu e as propriedades físicas e químicas do NPAu mantiveram-se as mesmas e indicando que o TMZ está apenas associado as NPAu provavelmente estabilizando a molécula. Quanto a TMZ, segundo Orza et al. 2013, a TMZ tem um pico máximo de absorção na faixa de 350 nm, região correspondente ao UV e não tem absorção na região do Vis. Assim não foi vista seu pico de absorção nesta faixa.

Em seu trabalho de 2020, González-López et al. utilizou NPAu funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG) e cisplatina (quimioterápico alquilante), onde o espectro de UV-Vis mostrou um pico para NPAu em 519 nm e para NPAu+PEG+Cisplatina em 525 nm. Os espectros para NPAu em 519 nm foi o mesmo dos nossos achados para NPAu10 livre e TNPAu10. Já no caso deles o espectro para NPAu+PEG+Cisplatina com pico máximo em 525 nm indicou um arraste no pico máximo e assim que ocorreu uma ligação entre estes compostos com a NPAu deles. Ademais, Wang et al. (2021) utilizando NPAu conjugadas com TMZ funcionalizadas com anti-EphA3 para direcionamento no glioblastoma, também avaliou o espectro na faixa do UV-Vis da sua NPAu, bem como da associação apenas de NPAu com TMZ, mostrando uma ressonância plasmônica de superfície típica a 519 nm para sua NPAu, bem como uma de 521 nm para NPAu+TMZ, o que, corrobora com nossos resultados.

Para confirmar diretamente a funcionalização, bem como o tamanho e formato das TNPAu, utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão. O formato esférico (TNPAu10) e semiesférico (TNPAu20 e TNPAu30) é encontrado respectivamente em NPAu de 10 nm e NPAu de 20 e 30 nm, como já pode ser visto em outros trabalhos (Della Vechia et al., 2020; Dos Santos Haupenthal et al., 2020),

mostrando que a adição da TMZ não alterou o formato das NPAu utilizadas para cada uma das soluções.

Ainda se tratando da análise das propriedades físico-químicas da TNPAu, analisamos o IPd, o qual fornece informações sobre a homogeneidade das soluções (Nemen e Lemos-Senna, 2011). A caracterização da polidispersidade é essencial em aplicações de nanopartículas, pois há certa dificuldade em controlar a uniformidade de toda a amostra com a química de conjugação de superfície e, muitas vezes, pode ocorrer agregação de partículas (Clayton et al., 2016). Todas as soluções apresentaram IPd <0.3, o que indica assim a formação de sistemas monodispersos (Nemen e Senna, 2011).

Somado a isso, os valores do potencial zeta também foram mensurados, onde a magnitude do potencial zeta dá uma indicação da estabilidade potencial dos sistemas coloidais (Elbially et al., 2019). NPAu10, NPAu20 e NPAu30 apresentaram potencial zeta com carga superficial altamente negativa, o que confirma a presença de grupos carboxilato carregados negativamente na sua superfície devido à absorção de citrato em suas superfícies (Wang et al., 2016; Della Vechia et al., 2020). No entanto após a adição de TMZ, esses valores tiveram um aumento significativo em TNPAu10 e TNPAu30. TNPAu20 também apresentou aumento no potencial zeta, porém este foi em menor escala quando comparado aos outros. Esse resultado sugere que uma fração de cargas negativas podem ter sido neutralizadas devido à interação eletrostática entre NPAu e TMZ, onde o citrato pode ter sido trocado parcialmente pelo TMZ (Elbially et al., 2019; Wang et al., 2021). Elbially et al. (2019) em sua pesquisa utilizando NPAu magnéticas carregadas com Doxorrubicina, medicamento este também usado para o tratamento de câncer, obteve valores de potencial zeta das NPAu magnéticas de $-31,1 \pm 2,5$ mV seguido de $-25,9 \pm 2,4$ para NPAu magnéticas carregadas com Doxorrubicina, mostrando também uma redução no seu valor após a adição do quimioterápico, assim como nos nossos resultados. Esses fatos somados sugerem que houve, em ambos os casos, uma interação eletrostática entre fármaco e nanopartícula.

Ademais, a FTIR foi realizada para confirmar se houve a formação de NPAu por íons citrato, bem como uma ligação/interação entre a TMZ e as NPAu. A ausência de semelhança entre as bandas de TMZ e TNPAu sugere que fortes interações eletrostáticas, como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals ou outras ligações mecânicas ou de halogênio, podem estar ocorrendo entre as moléculas de

TMZ e as NPAu. Nossos resultados corroboram com os achados de Orza et al. (2013) em seu trabalho utilizando TMZ acoplada a NPAu tratadas com L-aspartato em células-tronco cancerosas derivadas de glioma maligno, onde também se observou essa interação.

Após os testes para a caracterização físico-química de TNPAu, o segundo passo então foi avaliar a citotoxicidade da TMZ, NPAu e TNPAu em células de câncer de pele do tipo melanoma (B16F10), bem como em células saudáveis (NIH3T3). A TMZ, mesmo na concentração mais alta utilizada nesse estudo (35 µg/mL), não apresentou mais de 30% de citotoxicidade nas células B16F10, sendo essa porcentagem em um tempo de incubação de 72 horas. Corroborando com esses achados, estudos utilizando a TMZ em uma concentração de 25 µM (4,8 µg/mL) por 72 horas (Cseh et al., 2019) e 100 µM (19,4 µg/mL) por 48 horas (Ryabaya et al., 2017) sugerem certa ineficiência no tratamento apenas com TMZ. Tal ineficiência só seria melhorada com uma concentração superior à aqui utilizada, o que poderia acarretar em uma citotoxicidade também para as células saudáveis. Vale ressaltar que, em relação as concentrações aqui utilizadas, nenhuma apresentou citotoxicidade significativa em células NIH3T3, em nenhum dos períodos de incubação.

Em seguida avaliou-se a citotoxicidade das NPAu10, NPAu20 e NPAu30 em células B16F10. A avaliação em células NIH3T3 já havia sido realizada anteriormente por nosso grupo de pesquisa. Nesse estudo, realizado por Della Vechia et al. (2020) observou-se que, em um período de incubação de 24 horas, as NPAu 30 mostraram maior citotoxicidade para células NIH3T3 do que as outras NPAu. As NPAu20 não exerceram qualquer efeito citotóxico nas células NIH3T3 em nenhuma das concentrações testadas (35, 17,5, 8,75, 4,4 e 2,2 µg/mL), e as NPAu10 foram apenas citotóxicos em concentrações mais altas.

Nos resultados aqui presentes, as NPAu10 mostraram efeito citotóxico, sendo esse de mais de 25% de mortalidade nas células, em quase todas as concentrações testadas (exceto 5 µg/mL), em todos os períodos de incubação. Seguindo a isso, as NPAu20 mostraram efeito citotóxico significativo maior em períodos de incubação de 24 e 72 horas, nas concentrações de 15, 25 e 35 µg/mL (>25% de mortalidade). Por fim, as NPAu30 apresentaram efeitos citotóxicos (>25% de mortalidade) nas células B16F10 nas concentrações acima de 15 µg/mL em quase todos os períodos de incubação testados. Tomados em conjunto, os resultados sugerem que todas as NPAu testadas apresentaram efeito citotóxico nas células

B16F10, sendo os períodos de incubação de 24 e 72 horas os que mostraram maior citotoxicidade, esta ainda dependente da concentração utilizada. Babaei et al. (2021) mostrou que NPAu (17 nm) em uma concentração de apenas 0.5 µg/mL suprimiram a viabilidade das células de glioblastoma humano (U-87 e U-251) de maneira dependente do tempo (72 horas) em comparação com as células não tratadas. Além disso, quando avaliada as imagens microscópicas observou-se que as células expostas a NPAu apresentavam alterações morfológicas como não uniformidade e polimorfismo, com núcleos danificados e membrana citoplasmática distorcida. Da mesma forma, neste meio de tratamento com NPAu foram encontradas células suspensas e mortas, enquanto que as células do grupo controle revelaram estrutura celular intacta. Ademais, utilizando a linhagem celular Hela (câncer cervical) Della Vechia et al. (2020) mostraram que NPAu de 20 e 30 nm apresentam maior efeito citotóxico nas células, em todas as concentrações testadas, do que NPAu de 10 nm.

Esses resultados evidenciam o fato de que, a citotoxicidade da NPAu nas diferentes linhagens celulares é um tanto variável e essa variabilidade se deve ao tipo de linhagem celular, tamanho de partícula, carga superficial, concentrações utilizadas, tempo de exposição e revestimento de partículas (Rafiei et al., 2015). Usar nanopartículas de ouro como moléculas terapêuticas por si só é uma estratégia potencial para o tratamento do câncer (Sztandera et al., 2019). No entanto, uma vez que os mecanismos de citotoxicidade das NPAu não são totalmente reconhecidos e caracterizados, seu uso como terapêutica anticâncer por si só requer mais pesquisas.

Com isso, buscando um tratamento sinérgico multimodal, após a análise de citotoxicidade celular utilizando diferentes concentrações da TMZ e de NPAu separadamente, o próximo passo foi a escolha das melhores concentrações de cada um para serem utilizadas em conjunto. Para as concentrações da TMZ, buscamos as concentrações mais baixas, mas que ainda apresentassem algum efeito citotóxico em B16F10. Já para as NPAu, buscamos as concentrações que não causassem mais de 50% de mortalidade em células NIH3T3. Somado a esses resultados, calculamos a concentração inibitória, ou seja, qual a concentração necessária para atingir 50% da toxicidade, bem como o índice de combinação, para saber se a união de TMZ e NPAu (TNPAu) apresentou atividade aditiva, sinérgica ou antagônica.

Os resultados foram apresentados comparando os achados em B16F10 e em NIH3T3, conforme o período de incubação da TNPAu. Em relação as células NIH3T3, a solução de TNPAu em geral não apresentou citotoxicidade significativa,

mostrando assim que, independentemente do tempo de incubação, tamanho da NPAu utilizada e concentração total das soluções, a TNPAu não causa a morte significativa de células saudáveis. Já em relação a ação da TNPAu em células B16F10, tanto na utilização de TNPAu10, TNPAu20 e TNPAu30 houve citotoxicidade acima de 25% em praticamente todas as concentrações, sendo em alguns casos superior a 40%, conforme o período de incubação. Corroborando com esses resultados, o índice de combinação demonstrou que houve sinergia entre a TMZ e NPAu, ou seja, um tratamento reforçou a ação do outro. No entanto, a TNPAu10* no período de incubação de 48 horas, apresentou efeito antagonista, reforçando a importância da análise em diversos cenários. Ademais a concentração inibitória (50%) em todas as soluções de TNPAu se mostrou extremamente menor do que quando comparado com a utilização apenas da TMZ sozinha ou em sua maioria menor do que quando utilizando as NPAu sozinhas. Isso não só confirma, como reforça o efeito sinérgico da TNPAu.

Ademais aos nossos achados, Wang et al. (2021) também publicou um trabalho utilizando a combinação de TMZ com NPAu, onde a mesma foi funcionalizada com um anticorpo anti-EphA3 (anti-EphA3-TMZ-NPAu) na terapia direcionada ao glioblastoma, em linhagem celular C6 por um período de 48 horas. A citotoxicidade de TMZ-NPAu (32 nm) e anti-EphA3-TMZ-NPAu (46 nm) teve um efeito maior do que TMZ sozinho ($p < 0,01$). Esses resultados podem ser explicados, principalmente pelo fato de que as NPAu podem aumentar a captação celular do fármaco segundo Orza et al. (2013).

Outro estudo utilizando NPAu em conjunto com quimioterápicos é o de Brown et al. (2010) utilizando a Oxaplatina. As NPAu foram utilizadas livres e também funcionalizadas com uma monocamada de polietilenoglicol tiolado (PEG) coberta com um grupo carboxilato. Quanto ao diâmetro, as NPAu livres possuíam entre 21-29 nm e as NPAu PEGuiladas ligadas a Oxaliplatina entre 30-40 nm. O estudo foi realizado utilizando linhagem celular de câncer epitelial pulmonar A549 e linhagem de câncer de cólon HCT116, HCT15, HT29 e RKO. As NPAu ligadas a Oxaplatina demonstraram um efeito citotóxico igual ou significativamente melhor do que a Oxaliplatina sozinha em todas as linhas celulares testadas. Além disso, as NPAu ligadas a Oxaplatina apresentaram uma capacidade incomum de penetrar no núcleo nas células de câncer de pulmão (Brown et al., 2010).

É importante ressaltar que, tanto nos resultados acima citados, como nos resultados obtidos nesse trabalho, o uso de um quimioterápico associado com as NPAu, fez com que uma dose menor do fármaco obtivesse resultados melhores do que quando este foi utilizado sozinho em uma concentração superior. As altas doses de quimioterápicos utilizadas atualmente são responsáveis por vários efeitos adversos, dentre eles a toxicidade hematológica, sendo esse um dos principais motivos para a suspensão imediata do tratamento (Ouyang et al., 2013). Levando isso em consideração, a etapa seguinte deste trabalho foi a análise da hemotoxicidade do TMZ bem como do TNPAu. A avaliação das NPAu sozinhas não se fez necessária neste trabalho, uma vez que já haviam sido analisadas por nosso grupo (Della Vechia et al., 2020).

Em relação as NPAu, o estudo de Della Vechia et al. (2020) mostrou que todas as NPAu utilizadas (10, 20 e 30 nm) causaram danos hemolíticos nas concentrações mais altas (35 e 28 µg/mL). Já nas concentrações de 15 e 20 µg/mL, apenas as NPAu de 10 e 30 nm indicaram efeito hemolítico. Por fim as NPAu de 20 nm não causaram nenhum dano aos eritrócitos humanos nas concentrações de 15 e 20 µg/mL. Em concentrações menores (10 e 5 µg/mL) nenhuma das NPAu causaram danos. Estas toxicidades causadas por NPAu e por quimioterápicos podem diminuir a produção de glóbulos vermelhos (causando anemia), glóbulos brancos (neutropenia ou granulocitopenia) e plaquetas (trombocitopenia), que podem ser fatais para um paciente (Ouyang et al., 2013). No presente estudo a TMZ, nas concentrações testadas, apresentou apenas uma pequena citotoxicidade na concentração de 35 µg/mL, não sendo esta significativa (<5%). Ademais, as outras concentrações não se mostraram citotóxicas, bem como o uso das soluções de TNPAu também não apresentaram danos aos eritrócitos humanos. Isso se deve ao fato de que, tanto as concentrações de TMZ quanto as de NPAu utilizadas em conjunto, foram mais baixas do que as que normalmente causariam danos, corroborando assim com os resultados anteriores em relação aos benefícios do tratamento combinado.

Finalmente, para avaliar o padrão de morte celular, a coloração de células com FITC-Anexina V (fluorescência verde) e iodeto de propídio (fluorescência vermelha) com análise bivariada foi realizada. Esta avaliação permite distinguir entre células intactas (FITC e iodeto de propídio negativo), apoptótica precoce (FITC positivo, iodeto de propídio negativo), e células apoptóticas ou necróticas tardias (FITC e iodeto de propídio positivo) (Orza et al., 2013). Sendo assim, o padrão de

morte celular foi analisado em células B16F10 após a exposição a TMZ e a TNPAu, no período de 24 e 72 horas.

O TMZ sozinho na concentração de 19,4 µg/mL apresentou menor número de células viáveis quando comparado a células B16F10 expostas ao TNPAu no período de 24 horas. No entanto quando o período de incubação foi de 72 horas, a porcentagem de células viáveis após exposição ao TMZ e TNPAu foi significativamente semelhante. Em ambos os períodos apenas uma pequena porcentagem (<5%) de células apresentou padrão celular de apoptose precoce (em fase inicial) ou de necrose. No entanto, quando expostas a TMZ, as células apresentaram uma porcentagem maior no padrão de apoptose tardia (em fase final) quando comparado as TNPAu no período de 24 horas. Já no período de incubação de 72 horas, as células expostas a TNPAu10 apresentaram padrão de apoptose tardia um pouco maior quando comparado a exposição ao TMZ. As TNPAu20 e TNPAu30 também apresentaram porcentagem acima de 25% de células em padrão apoptótico, neste período de incubação. Tomados em conjunto esses resultados mostram que tanto o TMZ sozinho quando as TNPAu aqui utilizadas são capazes de levar ao processo de apoptose celular das células B16F10.

Em estudo realizado por Orza et al. (2013), utilizando células-tronco derivadas de glioma, o total de células apoptóticas foi maior quando estas foram expostas a TMZ acoplada a NPAu tratadas com L-aspartato (82,7%) do que quando expostas apenas a a NPAu tratadas com L-aspartato (10,7%) ou apenas a TMZ (41,9%). Isto se deve ao fato aqui já citado de que, cada linhagem celular pode responder de forma diferente ao mesmo tratamento, o que torna as pesquisas em torno disso cada vez mais necessárias e relevantes.

Os resultados até aqui apresentados sugerem ainda que, as combinações de TNPAu podem produzir outras alterações celulares, mas que se assemelham a características apoptóticas. Isso pode explicar o fato de o uso de TNPAu levar a altas taxas de citotoxicidade (Figuras 15,16 e 17), sem apresentarem resultados semelhantes na análise do padrão apoptótico. No entanto mais estudos são necessários para elucidar esse mecanismo.

6 CONCLUSÃO

Células cancerígenas são estruturas biológicas muito complexas que apresentam uma variedade de características, que vão desde o crescimento acelerado de um tumor ou processo de metástase até a resistência e eliminação de drogas quimioterápicas da membrana celular. Embora os mecanismos exatos pelos quais as células cancerígenas apresentem tais características precisem ser mais explorados, a combinação de avanços na oncologia e nanotecnologia oferece a oportunidade de impactar significativamente nos diagnósticos e em terapêuticas futuras.

Neste trabalho foi possível concluir que o uso da TMZ associada a NP Au levou a resultados melhores, principalmente no período de 24 horas, em relação a citotoxicidade, hemocompatibilidade e indução à apoptose em células B16F10, quando comparado ao uso dos tratamentos separadamente, como mostra a Figura 21. Ademais após a combinação, pôde-se utilizar uma menor concentração de TMZ (19,4 µg/mL), a qual, no entanto levou a maior citotoxicidade do que quando utilizada sozinha em maior concentração (35 µg/mL).

Citotoxicidade	B16F10	NIH3T3	Hemólise	Apoptose B16F10
TNPAu30 15/19,4 µg/mL → 24 h	→ 52,1%	17,7%	Não	Sim
TMZ 19,4 µg/mL → 24 h	→ 20,2%	0%	Não	Sim
NPAu30 15 µg/mL → 24 h	→ 22,3%	>20% <small>Della Vecchia et al., 2020</small>	Sim	x

Figura 21: Comparação do uso da TNPAu30 (15/19,4 µg/mL) com os tratamentos utilizados separadamente, no período de incubação de 24 horas, em células B16F10 e NIH3T3, em relação a citotoxicidade, hemólise e apoptose. Fonte: a autora.

Isto se faz importante, uma vez que altas doses de TMZ levam a diversos efeitos colaterais, que muitas vezes levam à interrupção do tratamento. Porém, para explorar plenamente o potencial terapêutico da TMZ associada a NP Au, se faz

necessário mais estudos, tanto em modelos celulares mais simples, cultivados in vitro, quanto em modelos animais mais complexos.

REFERÊNCIAS

Agarwala SS, Kirkwood JM, Gore M, Dreno B, Thatcher N, Czarnetski B et al. Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol*. 2004 Jun 1;22(11):2101-7.

American Cancer Society. Treatment of Melanoma Skin Cancer, by Stage (2018). Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/by-stage.html>> Acesso em 28 fev. 2020.

ANATPAT - Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem: Melanoma maligno Lam. A. 91. Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP). Campinas, São Paulo, 2020.

Arozarena I, Wellbrock C. Targeting invasive properties of melanoma cells. *FEBS J*. 2017 Jul;284(14):2148-2162.

Babaei A, Mousavi SM, Ghasemi M, Pirbonyeh N, Soleimani M, Moattari A. Gold nanoparticles show potential in vitro antiviral and anticancer activity. *Life Sci*. 2021 May 26;119652.

Bai X, Wang Y, Song Z, Feng Y, Chen Y, Zhang D, Feng L. The Basic Properties of Gold Nanoparticles and their Applications in Tumor Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 3;21(7).

Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:239-71.

Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)*. 2009 May;23(6):488-96.

Brown SD, Nativo P, Smith JA, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B, Flint DJ, Plumb JA, Graham D, Wheate NJ. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug

Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *J Am Chem Soc.* 2010 Apr 7; 132(13): 4678–4684.

Candido S, Rapisarda V, Marconi A, Malaponte G, Bevelacqua V, Gangemi P, Scalisi A, McCubrey JA, Maestro R, Spandidos DA, Fenga C, Libra M. Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure.

Chang X, Zhu W, Zhang H, Lian S. Sensitization of melanoma cells to temozolomide by overexpression of microRNA 203 through direct targeting of glutaminase-mediated glutamine metabolism. *Clin Exp Dermatol.* 2017 Aug;42(6):614-621.

Chen YS, Liu F, Luo YH, Fan Y, Xu FG, Li P, Zhou B, Pan XY, Wang CC, Cui L. EDNRB isoform 3 confers Temozolomide resistance in A375 melanoma cells by modulating membrane potential, reactive oxygen species and mitochondrial Ca²⁺. *Cancer Manag Res.* 2019 Aug 5;11:7353-7367.

Cheng Y, C Samia A, Meyers JD, Panagopoulos I, Fei B, Burda C. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *J Am Chem Soc.* 2008 Aug 13;130(32):10643-7.

Chiriboga L, Meehan S, Osman I, Glick M, de la Cruz G, Howell BS, Friedman-Jiménez G, Schneider RJ, Jamal S. Endothelin-1 in the tumor microenvironment correlates with melanoma invasion. *Melanoma Res.* 2016 Jun;26(3):236-44.

Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; 22:27-55.

Clayton KN, Salameh JW, Wereley ST, Kinzer-Ursem TL. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics.* 2016 Sep 21;10(5):054107.

Clemente N, Ferrara B, Gigliotti CL, Boggio E, Capucchio MT, Biasibetti E, Schiffer D, Mellai M, Annovazzi L, Cangemi L, Muntoni E, Miglio G, Dianzani U, Battaglia L, Dianzani C. Solid Lipid Nanoparticles Carrying Temozolomide for Melanoma

Treatment. Preliminary In Vitro and In Vivo Studies. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 24;19(2). pii: E255.

Cseh AM, Fabian Z, Quintana-Cabrera R, Szabo A, Eros K, Soriano ME, Gallyas F, Scorrano L, Sumegi B. PARP Inhibitor PJ34 Protects Mitochondria and Induces DNA-Damage Mediated Apoptosis in Combination With Cisplatin or Temozolomide in B16F10 Melanoma Cells. *Front Physiol.* 2019 May 7;10:538.

Darweesh RS, Ayoub NM2, Nazzal S. Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications. *Int J Nanomedicine.* 2019 Sep 19;14:7643-7663.

Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(11):1366-1379.

Della Vecchia IC, Steiner BT, Freitas ML, Fidelis GSP, Galvani NC, Ronchi JM, Possato JC, Fagundes MI, Rigo FK, Feuser PE, de Araújo PHH, Machado-de-Ávila RA. Comparative cytotoxic effect of citrate-capped gold nanoparticles with different sizes on noncancerous and cancerous cell lines. *J Nanopart Res.* 2020; 22(133): 1-11.

Dianzani C, Monge C, Miglio G, Serpe L, Martina K, Cangemi L, et al. Nanoemulsions as Delivery Systems for Poly-Chemotherapy Aiming at Melanoma Treatment. *Cancers (Basel).* 2020 May 9;12(5):1198.

Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther.* 2018 Jun 7;7:35-49.

Dohnert MB, Ferreira GK, Silveira PCL, Zanoni ET, Dohnert LH, Souza CT, Paula MM. Inflammatory Cytokines Content in Achilles Tendinopathy After Phonophoresis Treatment Combined With Gold Nanoparticles and Diclophenac Diethylammonium in Rats. *Inflammation.* 2015;38(3):1044-9.

Dos Santos Haupenthal DP, Zortea D, Zaccaron RP, de Bem Silveira G, Corrêa MEAB, Mendes C, de Roch Casagrande L, Duarte MB, Pinho RA, Feuser PE, Machado-de-

Ávila RA, Silveira PCL. Effects of phonophoresis with diclofenac linked gold nanoparticles in model of traumatic muscle injury. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020 May;110: 110681.

Draz MS, Wang YJ, Chen FF, Xu Y, Shafiee H. Electrically Oscillating Plasmonic Nanoparticles for Enhanced DNA Vaccination against Hepatitis C Virus. *Adv Funct Mater*. 2017 Feb 3;27(5).

Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012 Apr 7;41(7):2740-79.

Elbially NS, Fathy MM, Khalil WM. Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Int J Pharm*. 2015 Jul 25;490(1-2):190-9.

Fan W, Yung B, Huang P, Chen X. Nanotechnology for Multimodal Synergistic Cancer Therapy. *Chem Rev*. 2017 Nov 22;117(22):13566-13638.

Fang C, Wang K, Stephen ZR, Mu Q, Kievit FM, Chiu DT, Press OW, Zhang M. Temozolomide nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Apr 1;7(12):6674-82.

Feuser PE, Bubniak LS, Silva MCS, Viegas AC, Fernandes AC, Ricci-Junior E, Nele M, Tedesco AC, Sayer C, Araújo PHH. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly (methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. *Eur Polym J*. 2015 Jul; 68: 355-65.

González-López MA, Gutiérrez-Cárdenas EM, Sánchez-Cruz C, Hernández-Paz JF, Pérez I, Olivares-Trejo JJ, Hernández-González O. Reducing the effective dose of cisplatin using gold nanoparticles as carriers. *Cancer Nanotechnology*. 2020 Mar 30; 11(4):1-15.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Harris CD. Análise Química Quantitativa: Fundamentos da Espectrofotometria. 6ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p. 398-423.

Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2001 Mar 1;61(5):1957-63.

Huang X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J Adv Res.* 2010; 1: 13-28.

Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine (Lond).* 2007 Oct;2(5):681-93.

Hwangbo H, Choi EO, Kim MY, Kwon DH, Ji SY, Lee H, Hong SH, Kim GY, Hwang HJ, Hong SH, Choi YH. Suppression of tumor growth and metastasis by ethanol extract of *Angelica dahurica* Radix in murine melanoma B16F10 cells. *Biosci Trends.* 2020 Mar 16;14(1):23-34.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2020.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Tipos de Câncer. Rio de Janeiro, 2020.

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

Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian J Chem.* 2019; 12 (7): 908-931.

Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma.* 2016;63(4):510-7.

Kumar HK, Venkatesh N, Bhowmik H, Kuila A. Metallic Nanoparticle: A Review. *Biomed J Sci & Tech Res*. 2018; 4 (2): 3765-75.

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

Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2018 Apr;52(4):1071-1080.

Li H, Jin H, Wan W, Wu C, Wei L. Cancer nanomedicine: mechanisms, obstacles and strategies. *Nanomedicine (Lond)*. 2018 Jul;13(13):1639-1656.

Lim HN, Baek SB, Jung HJ. Bee Venom and Its Peptide Component Melittin Suppress Growth and Migration of Melanoma Cells via Inhibition of PI3K/AKT/mTOR and MAPK Pathways. *Molecules*. 2019 Mar 7;24(5).

Lv JF, Hu L, Zhuo W, Zhang CM, Zhou HH, Fan L. Epigenetic alternations and cancer chemotherapy response. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Apr;77(4):673-84.

Mabeta P. Paradigms of vascularization in melanoma: Clinical significance and potential for therapeutic targeting. *Biomed Pharmacother*. 2020 Apr 22;127:110135.

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

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(1):158-66.

Millet A, Martin AR, Ronco C, Rocchi S, Benhida R. Metastatic Melanoma: Insights into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. *Med Res Rev.* 2017 Jan;37(1):98-148.

Mishra H, Mishra PK, Ekielski A, Jaggi M, Iqbal Z, Talegaonkar S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 Dec;144(12):2283-2302.

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

Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, Atala A, Mukhopadhyay D, Soker S. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin Cancer Res.* 2005 May 1;11(9):3530-4.

Muller AP, Ferreira GK, Pires AJ, Silveira GB, Souza DL, Brandolfi JA, Souza CT, Paula MM, Silveira PCL. Gold Nanoparticles Prevent Cognitive Deficits, Oxidative Stress and Inflammation in a Rat Model of Sporadic Dementia of Alzheimer's Type. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017 Aug 1;77: 476-483.

Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, Kong X, Possik PA, Cornelissen-Steijger PD, Geukes Foppen MH, Kemper K, Goding CR, McDermott U, Blank C, Haanen J, Graeber TG, Ribas A, Lo RS, Peeper DS. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun.* 2014 Dec 15;5: 5712.

Nasongkla N, Bey E, Ren J, Ai H, Khemtong C, Guthi JS, Chin SF, Sherry AD, Boothman DA, Gao J. Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett.* 2006 Nov;6(11):2427-30.

National Cancer Institute. What is Cancer: Differences between Cancer Cells and Normal Cells. United States of America, 2015.

National Nanotechnology Initiative (USA). What is nanotechnology? United States National Nanotechnology Initiative: 2019.

Nemen D, Lemos-Senna E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. *Quim. Nova*. 2011; 34(3): 408-13.

Nicholas S, Mathios D, Jackson C, Lim M. Metastatic melanoma to the brain: surgery and radiation is still the standard of care. *Curr Treat Options Oncol*. 2013 Jun;14(2):264-79.

Orza A, Sorițău O, Tomuleasa C, Olenic L, Florea A, Pana O, Bratu I, Pall E, Florian S, Casciano D, Biris AS. Reversing chemoresistance of malignant glioma stem cells using gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:689-702.

Ouyang Z, Peng D, Dhakal DP. Risk factors for hematological toxicity of chemotherapy for bone and soft tissue sarcoma. *Oncol Lett*. 2013 May;5(5):1736-1740.

Pereira FKP, Faccio MT, Santo JAM, Almeida CLA, Araújo MLM, Silva RO, Araujo FTS. Construção de curva de calibração por padrão externo para determinação de teor de cobre em água potável da cidade Brejo do Cruz – Paraíba por Espectro fotometria de Absorção Molecular. In: Congresso Norte - Nordeste de Química, 5, 2013, Natal. Anais eletrônicos... Natal: Universidade Federal de Rio Grande do Norte – UFPN, 2013. Disponível em: <<http://annq.org/eventos/upload/1361700670.pdf>>. Acesso em: 17 Jul. 2017.

Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T et al. Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013 Aug;11 Suppl 6:1-116, 1-126.

Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN, Gururangan S, Friedman AH, Bigner DD, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE 2nd, Walker A, Friedman HS. Phase II trial of temozolomide plus o6-benzylguanine in adults with

recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1262-7.

Rafiei S, Rezatofghi SE, Ardakani MR, Rastegarzadeh S. Gold Nanoparticles Impair Foot-and-Mouth Disease Virus Replication. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2016 Jan;15(1):34-40.

Raghavendra R, Arunachalam K, Annamalai SK, Arunachalam AM. Diagnostics and therapeutic application of gold nanoparticles. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014; 6 (2): 74-87.

Roskoski R Jr. RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Aug 27;399(3):313-7.

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

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

Schröfel A, Kratošová G, Šafařík I, Šafaříková M, Raška I, Šor LM. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - a review. *Acta Biomater*. 2014 Oct;10(10):4023-42.

Shen B, Zhao K, Ma S, Yuan D, Bai Y. Topotecan-loaded mesoporous silica nanoparticles for reversing multi-drug resistance by synergetic chemoradiotherapy. *Chem Asian J*. 2015 Feb;10(2):344-8.

Singh P, Pandit S, Mokkalapati VRSS, Garg A, Ravikumar V, Mijakovic I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 6;19(7).

Sivakumar AS, Krishnaraj C, Sheet S, Rampa DR, Kang DR, Belal SA, Kumar A, Hwang IH, Yun SI, Lee YS, Shim KS. Interaction of silver and gold nanoparticles in mammalian cancer: as real topical bullet for wound healing- A comparative study. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017 Aug;53(7):632-645.

Skin Cancer Foundation. The stages of melanoma. Disponível em: <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/the-stages-of-melanoma>. Acesso em maio de 2020.

Sociedade Brasileira de Dermatologia (Brasil). Câncer de pele. Disponível em: < <https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/> > Acesso em dezembro de 2020.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):459-66.

Sztandera K, Gorzkiewicz M, Klajnert-Maculewicz B. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. *Mol Pharm*. 2019 Jan 7;16(1):1-23.

Tao Y, Li M, Ren J, Qu X. Metal nanoclusters: novel probes for diagnostic and therapeutic applications. *Chem Soc Rev*. 2015 Dec 7;44(23):8636-63.

Tortora GJ, Derrickson B. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. 14ª Ed. Rio de Janeiro: GEN; 2016.

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

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

Victor EG, Silveira PCL, Possato JC, Rosa GL, Munari UB, Souza CT, Pinho RA, Silva L, Streck EL, Paula MM. Pulsed Ultrasound Associated With Gold Nanoparticle Gel Reduces Oxidative Stress Parameters and Expression of Pro-Inflammatory Molecules in an Animal Model of Muscle Injury. *J Nanobiotechnology*. 2012 Mar 12;10:11.

Wang F, Wang YC, Dou S, Xiong MH, Sun TM, Wang J. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. *ACS Nano*. 2011 May 24;5(5):3679-92.

Wang L, Tang S, Yu Y, Lv Y, Wang A, Yan X, Li N, Sha C, Sun K, Li Y. Intranasal Delivery of Temozolomide-Conjugated Gold Nanoparticles Functionalized with Anti-EphA3 for Glioblastoma Targeting. *Mol Pharm*. 2021 Mar 1;18(3):915-927.

Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Jun;22(12):3855-3864.

Wang W, Ding X, Xu Q, Wang J, Wang L, Lou X. Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2016 Dec 1; 148:541-48.

Wesolowski JR, Rajdev P, Mukherji SK. Temozolomide (Temodar). *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010 Sep;31(8):1383-4.

Wilson MA, Schuchter LM. Chemotherapy for Melanoma. *Cancer Treat Res*. 2016; 167: 209-29.

Wright PFA. Potential risks and benefits of nanotechnology: perceptions of risk in sunscreens. *Med J Aust*. 2016; 204 (10): 369-370.

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

