



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AÇÃO FOTODINÂMICA ENTRE A RADIAÇÃO INFRAVERMELHA-A E A  
TEMOZOLOMIDA EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

*Marcelo Augusto Germani Marinho*

**Rio Grande, RS, Brasil**

**2018**

**AÇÃO FOTODINÂMICA ENTRE A RADIAÇÃO INFRAVERMELHA-A E A  
TEMOZOLOMIDA EM LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

**POR**

**Marcelo Augusto Germani Marinho**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Horn**

**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira**

*Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele.*

*(Buda)*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus! Essa divindade responsável pelo dom da vida. Obrigado meu Deus por nunca desistir de mim, por me dar forças e tranquilidade para seguir em frente. Agradeço a ti pela vida iluminada que me cedestes e pelas pessoas que colocastes em meu caminho nessa jornada!

Aos meus pais, Marcio e Laize, agradeço por todo apoio que vocês sempre me deram, não deixando eu desistir nunca do meu sonho. Agradeço pela educação que vocês me deram, assim como o amor que faz a nossa família o que é hoje, amo vocês.

À minha irmã, Tamara, agradeço por sempre estar ao meu lado em todas as decisões da vida, por comemorar cada conquista e pelo respeito e confiança que temos um com o outro, te amo! Agradeço também ao meu cunhado, Frederico, pela amizade e por fazer parte de mais uma conquista, comemorado sempre da melhor forma!

Às minhas mães de coração, Vó e Dinda, agradeço simplesmente por tudo! Sem vocês eu não chegaria onde cheguei! Mesmo distante vocês foram/são fundamentais para que eu nunca desistisse, meu amor por vocês é eterno!

À minha orientadora Ana Paula Horn, agradeço pela confiança e oportunidade de trabalhar e exercer nossa linda profissão com muito amor e dedicação. Obrigado pela orientadora incrível que tu és, além da amizade, carinho e respeito com seus alunos, isso não tem preço! Obrigado por fazer parte da minha formação, minha mãe científica!

À minha Co-orientadora Daza Filgueira, agradeço por embarcar nessa aventura conosco! Desde a graduação tenho uma admiração imensa por ti e pelo teu trabalho. Obrigado por ser minha mentora e me fazer seguir em frente quando estávamos quase desistindo! Agradeço também pela oportunidade de trabalhar com uma equipe espetacular!

À professora Ana Paula Votto, agradeço pela parceria que fizemos neste trabalho! Obrigado por me aceitar de braços abertos no laboratório e no grupo da cultura, eu tenho uma imensa gratidão por isso. Agradeço também pela amizade que criamos durante esses anos, te admiro muito!

Ao meu grande amigo Magno Marques, obrigado por fazer parte da minha vida! Maguinho, obrigado pela ajuda e por não medir esforços quando precisei. Te agradeço também pela confiança que depositastes em mim nos teus experimentos, foi uma experiência inesquecível! Obrigado por ser meu amigo, conselheiro e parceiro do cafezinho, esses pequenos momentos são os que tornam a vida mais alegre! Estarás sempre no meu coração!

À Camila Vian, nossa caçula do laboratório! Agradeço pela amizade e confiança que criamos nesses últimos anos! Eu tenho tamanha admiração pelo teu esforço, desempenho e motivação com a vida científica! Obrigado por tornar nossas vidas mais alegres, tu és um ser humano incrível, de alma e coração!

À Aline Lettnin, agradeço pela amizade, carinho e respeito que temos um com o outro! Tu foste fundamental na execução desse trabalho, obrigado pelos conselhos, (muitos) questionamentos e pelo sorriso contagiante que alegra nossos dias no laboratório. Nossos dias de experimentos nunca serão esquecidos! Obrigado por tudo!

Às minhas eternas amigas, Ayane e Jéssica! Migas, já se passaram dois anos da nossa formatura, cada um seguiu seu caminho, novas vidas e novas amizades! Mas eu jamais esquecerei de vocês, aqueles 4 anos foram os mais valiosos da minha vida, obrigado por fazerem parte dela. Amo muito vocês!

Ao meu irmão de coração, Henrique! Obrigado por fazer parte da minha vida, eu te admiro muito e sei que terás um futuro gigante! A distância não vai ser responsável por acabar com nossa amizade, fica aqui um pequeno gesto de agradecimento por esses anos de companheirismo! Sabes que aqui em Rio Grande sempre terás um amigo de braços abertos para te receber a qualquer momento, quando precisares!

Às minhas amigas Nicole Medeiros e Caroline Falcão, agradeço pela amizade e por tornar nossos longos dias de FURG mais prazerosos! Cada cafezinho era um mar de conversas, choros, risos e emoções, isso não tem preço! Obrigado por fazerem parte dessa jornada!

Aos amigos Francielly, Mariana, Estela, Gisele, Eduardo, Thaynã, Daniel e Alessandra, agradeço por estarem todos os dias no laboratório fazendo com que o nosso trabalho se torne prazeroso e divertido! Obrigado pelo carinho, pelas descontrações e por toda ajuda. Essa equipe é sensacional, agradeço pela amizade que tenho com vocês, poucos sabem o valor disso!

Ao Matheus, agradeço pela amizade e por fazer parte desses dois anos, me acompanhando e ajudando no que foi preciso! Obrigado por ser meu amigo em todos os momentos, esse pedaço das nossas vidas que construímos juntos jamais será esquecido, só levarei de ti as lembranças boas. Sabes que aqui no Sul tu tens uma família de braços abertos para te receber quando for preciso! Tu estarás sempre em meu coração!

À Patrícia Ramos, agradeço pela amizade maravilhosa que construímos! Miga sua louca, tu és sensacional, te admiro muito! Obrigado pelas conversas, pelos conselhos e sugestões! Sabes que de mim tu sempre terás um bom chimarrão e uma conversa pra lá de boa.

Ao Marcio Oliveira, agradeço pela amizade, confiança e por todo o apoio técnico! Obrigado por fazer parte do nosso dia-a-dia no laboratório, com certeza tu és o melhor técnico do ICB. Te agradeço também pelas conversas e conselhos, és um grande amigo que ganhei nesses anos de cultura!

Agradeço à Inês, nossa querida recepcionista do bloco 2 do ICB. Obrigado pelo carinho e pelo sorriso com que nos recebe todos os dias! Fica aqui o meu reconhecimento e carinho que tenho por ti, muito obrigado!

Um agradecimento especial a todos os professores do PPG em Ciências Fisiológicas, vocês são fundamentais para a nossa formação, nos mostrando como devemos exercer nossa profissão com ética e respeito e também como não seguir o caminho oposto!

Agradeço a CAPES, pelo consentimento da bolsa de estudos.

## Resumo

Os tumores cerebrais são considerados as neoplasias malignas mais agressivas que se desenvolvem no sistema nervoso central (SNC), acometendo aproximadamente 5,26 em cada 100.000 indivíduos na população mundial. Dentre eles, o glioblastoma é o mais comum e o que apresenta o maior grau de malignidade, representando cerca de 54% dos tumores malignos desenvolvidos no SNC. Os tratamentos para os tumores cerebrais tornam-se difíceis por dois principais fatores: a entrega de fármacos ao SNC, a qual é dificultada em razão da presença da barreira hematoencefálica (BHE) e o fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR), caracterizado principalmente pela expressão de proteínas que realizam o efluxo dos quimioterápicos para fora da célula. A radioterapia é um tratamento adjuvante utilizado junto à administração da Temozolomida (TMZ), o principal quimioterápico utilizado no tratamento do glioblastoma. Contudo, por ser uma radiação ionizante, seus efeitos acabam danificando células e tecidos saudáveis adjacentes à região do tumor, gerando acentuados efeitos colaterais. Dentre as muitas terapias para o câncer, destacamos aqui a terapia fotodinâmica (TFD), uma combinação entre radiação e um fotossensibilizador capaz de absorver a radiação e gerar danos às células tumorais. A radiação infravermelha próxima (RI-A) é uma fonte de radiação eletromagnética não-ionizante, com reconhecidos efeitos biológicos descritos na literatura, destacando-se seus efeitos antioxidantes, neuroprotetores e antitumorais. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da interação entre a TMZ e a RI-A na linhagem de glioblastoma C6. Como metodologias, avaliamos os efeitos da TMZ (10, 50, 100, 250, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ ), da RI-A (2; 3,5; 4,5 e 6  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) e da interação entre TMZ e RI-A, através do ensaio de viabilidade celular por exclusão com azul de tripan. Para seguir os experimentos, escolhemos a interação entre 10  $\mu\text{M}$  de TMZ e 4.5  $\text{J}/\text{cm}^2$  de RI-A. A partir dessas condições, avaliamos a citotoxicidade pelo ensaio de apoptose/necrose, a proliferação celular através da análise de índice mitótico, os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como o processo de migração celular e a atividade da glicoproteína-P. Como resultados de viabilidade celular, a TMZ apresentou efeito significativo a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$  e a RI-A sozinha não apresentou resultados significativos nas doses testadas. A morte celular, principalmente por apoptose, seguida de necrose, a diminuição na proliferação celular, um aumento nos níveis intracelulares de ERO, uma diminuição no processo de migração celular e uma menor atividade da glicoproteína-P foram observados apenas quando houve a interação entre a TMZ e a RI-A. Nossos resultados sugerem que há uma interação entre a TMZ e a RI-A, o que nos leva a acreditar que, futuramente, essa interação possa servir como uma estratégia antitumoral e utilizada como uma TFD.

**Palavras-chave:** Diodo emissor de luz, espécies reativas de oxigênio, glicoproteína-P, glioma, radiação infravermelha próxima, terapia fotodinâmica.

## Abstract

Brain tumors are considered the most aggressive malignant neoplasms developing in the central nervous system (CNS), affecting approximately 5,26 in every 100.000 individuals in the world population. Among them, glioblastoma is the most common and the one with the highest degree of malignancy, representing about 54% of the malignant tumors developed in the CNS. Treatments for brain tumors become difficult due to two main factors: drug delivery to the CNS, which is impaired by the presence of the blood-brain barrier (BBB), and the multidrug resistance (MDR) phenomenon, characterized mainly by the expression of proteins that carry out the efflux of the chemotherapeutics out of the cell. Radiotherapy is an adjuvant treatment used together with the administration of Temozolomide (TMZ), the main chemotherapeutic agent used to treat glioblastoma. However, because it is an ionizing radiation, its effects end up damaging healthy cells and tissues adjacent to the tumor region, generating marked side effects. Among many therapies for cancer, we highlight here photodynamic therapy (PDT), a combination of radiation and a photosensitizer capable of absorbing radiation and generate damage to tumor cells. The near-infrared radiation (IR-A) is a source of non-ionizing electromagnetic radiation with recognized biological effects described in the literature, highlighting its antioxidant, neuroprotective and antitumor effects. In view of the above, the objective of the present study was to evaluate the effects of the interaction between TMZ and IR-A on the C6 glioblastoma line. As a method, we evaluated the effects of TMZ (10, 50, 100, 250, 500 and 1000  $\mu\text{M}$ ), IR-A (2; 3.5; 4.5 and 6  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) and the interaction between TMZ and cell viability by trypan blue exclusion. To perform further experiments, we chose the interaction between 10  $\mu\text{M}$  TMZ and 4.5  $\text{J}/\text{cm}^2$  of IR-A. From this, we evaluated cytotoxicity by the apoptosis / necrosis assay, cell proliferation through mitotic index analysis, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), as well as cell migration process and P-glycoprotein activity. As a result of cellular viability, TMZ had a significant effect from 100  $\mu\text{M}$  and IR-A alone did not present significant results at the doses chosen. Cell death mainly due to apoptosis, followed by necrosis, decrease in cellular proliferation, increases in intracellular levels of ROS, decrease in the cellular migration process and lower activity of P-glycoprotein were observed only when there was interaction between TMZ and IR-A. Our results suggest that there is an interaction between TMZ and IR-A, which leads us to believe that, in the future, this interaction may serve as an antitumor strategy for PDT application.

**Keywords:** Light emitting diode, reactive oxygen species, glioma, P-glycoprotein, near-infrared radiation, photodynamic therapy

## Lista de abreviaturas

ABC – *ATP-binding cassette*  
AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida  
AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina  
ATP – Adenosina trifosfato  
BHE – Barreira hematoencefálica  
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's medium*  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
ERO – Espécie reativa de oxigênio  
FDA – *Food and Drug Administration*  
FS – Fotossensibilizador  
HIV – Vírus da imunodeficiência humana  
IDH – Isocitrato desidrogenase  
INCA – Instituto nacional do câncer  
LED – Diodo emissor de luz  
MDR – Resistência a múltiplas drogas  
MeA – Metilação na adenina  
MeG – Metilação na guanina  
MGMT – Metilguanina-DNA metiltransferase  
NAD – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
OMS – Organização mundial da saúde  
PBS – Tampão salino fosfato  
P-gp – Glicoproteína P  
Rho – Rhodamina 123  
RI – Radiação infravermelha  
SNC – Sistema nervoso central  
TFD – Terapia fotodinâmica  
TMZ – Temozolomida  
VP – Verapamil



## Lista de figuras e tabelas

|   |    |
|---|----|
| FIGURA A – Células do sistema nervoso central.....                        | 11 |
| FIGURA B – Classificação dos gliomas.....                                 | 12 |
| FIGURA C – Constituição da barreira hematoencefálica.....                 | 16 |
| FIGURA D – Arquitetura molecular dos transportadores ABC.....             | 17 |
| FIGURA E – Estrutura química da temozolomida.....                         | 18 |
| FIGURA F – Mecanismo de ação da temozolomida.....                         | 19 |
| FIGURA G – Espectro eletromagnético.....                                  | 21 |
| FIGURA H – Características da luz de baixo nível energético.....          | 22 |
| FIGURA I – Mecanismo de ação da radiação infravermelha.....               | 25 |
| TABELA 1 – Graus de astrocitomas e suas características histológicas..... | 13 |

## **Figuras do Manuscrito**

|  |    |
|--|----|
| FIGURE 1 – Cell viability after treatments with TMZ or IR-A.....         | 42 |
| FIGURE 2 – Cell viability after combined treatments of TMZ and IR-A..... | 44 |
| FIGURE 3 – Apoptosis and necrosis.....                                   | 45 |
| FIGURE 4 – Mitotic index.....  | 46 |
| FIGURE 5 – Intracellular ROS levels.....                                 | 47 |
| FIGURE 6 – Cell migration.....   | 48 |
| FIGURE 7 – P-glycoprotein activity.....                                  | 50 |

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| Resumo.....   | 3         |
| Abstract.....   | 4         |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>10</b> |
| 1.1. O Câncer.....  | 10        |
| 1.2. Os Gliomas.....  | 11        |
| 1.2.1. Dados epidemiológicos.....   | 14        |
| 1.2.2. Padrão atual de terapias e os obstáculos do tratamento.....              | 15        |
| 1.3. A Temozolomida.....  | 18        |
| 1.4. A Radiação infravermelha.....  | 20        |
| 1.4.1. Terapias com a RI-A e o câncer.....                                      | 21        |
| 1.4.2. Efeitos biológicos e o mecanismo de ação da RI-A.....                    | 25        |
| 1.5. Terapia fotodinâmica.....  | 27        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>30</b> |
| 2.1. Objetivo geral.....  | 30        |
| 2.2. Objetivos específicos.....   | 30        |
| <b>3. MANUSCRITO.....</b>   | <b>31</b> |
| 3.1. Abstract.....  | 33        |
| 3.2. Introduction.....  | 34        |
| 3.3. Materials and Methods.....   | 37        |
| 3.3.1. Experimental model and cell culture.....                                 | 37        |
| 3.3.2. Infrared lamp characteristics.....                                       | 37        |
| 3.3.3. Exposure of cells to IR-A.....   | 37        |
| 3.3.4. Treatment with TMZ.....  | 38        |
| 3.3.5. Exposure of the cells to the IR-A with TMZ (combined assay).....         | 38        |
| 3.3.6. Cell viability assay.....  | 38        |
| 3.3.7. Apoptosis and necrosis assay.....  | 39        |
| 3.3.8. Mitotic index.....   | 39        |
| 3.3.9. Determination of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels..... | 40        |
| 3.3.10. Cell migration assay.....   | 40        |
| 3.3.11. P-glycoprotein activity analysis.....                                   | 41        |
| 3.3.12. Statistical analyses.....   | 41        |
| 3.4. Theory.....  | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.5. Results</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>3.5.1. Cell viability after treatments with TMZ and IR-A</b> ..... | <b>42</b> |
| <b>3.5.2. Cell death from apoptosis or necrosis</b> .....             | <b>45</b> |
| <b>3.5.3. Mitotic index</b> .....                                     | <b>46</b> |
| <b>3.5.4. ROS levels measurement</b> .....                            | <b>46</b> |
| <b>3.5.5. Cell migration analyses</b> .....                           | <b>47</b> |
| <b>3.5.6. P-glycoprotein activity</b> .....                           | <b>49</b> |
| <b>3.6. Discussion</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>3.7. Bibliographic references</b> .....                            | <b>57</b> |
| <b>4. DISCUSSÃO GERAL</b> .....                                       | <b>63</b> |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                                  | <b>73</b> |
| <b>6. PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>74</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFIA GERAL</b> .....                                    | <b>75</b> |

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. O câncer**

Nas últimas décadas, o câncer vem se destacando como um dos principais problemas de saúde pública, além de ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo todo. As neoplasias são caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células e, na prática, são denominadas de tumores. Entretanto, elas podem ser classificadas em neoplasias benignas, as quais apresentam o crescimento celular de forma organizado, lento, com limites bem definidos e sem quadros de metástase, ou malignas, apresentando um alto grau de autonomia, invasão tecidual, mitoses anormais e numerosas, massas pouco delimitadas e metástase frequente (ABC do câncer - INCA 2011).

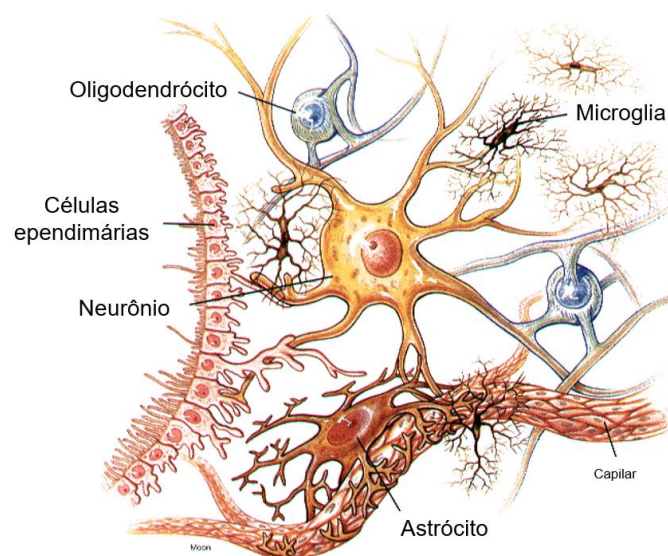
O câncer pode ser considerado um conjunto de mais de 100 neoplasias malignas, o qual é caracterizado pelo acúmulo de mutações e alterações genéticas nas células ao longo do tempo, tendo como consequência o surgimento de desordens em redes bioquímicas e em vias de sinalização celular (LEVITZKI; KLEIN, 2010). Essa doença pode atingir qualquer parte do organismo, iniciando com uma proliferação rápida e desordenada de células que se expandem para tecidos e órgãos, tornando-os incapazes de realizar suas funções (FLOOR et al., 2012).

De acordo com Hanahan e Weinberg (2000), existem seis principais aspectos que ocasionam a desregulação fisiológica celular, caracterizando a malignidade dos diversos tipos de cânceres, são eles: persistência da sinalização proliferativa, insensibilidade aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, angiogênese, potencial replicativo ilimitado e a alta capacidade de invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Além desses, alguns anos mais tarde, os autores adicionaram mais dois aspectos que complementaram as características mencionadas anteriormente, a capacidade de reprogramação do metabolismo energético e a evasão à resposta imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

São muitos os fatores que levam ao desenvolvimento dessas neoplasias malignas, onde cerca de 80% dos casos são decorrentes de fatores exógenos e cerca de 20% de fatores endógenos. Os fatores exógenos incluem hábitos e estilos de vida não-saudáveis como tabagismo, alcoolismo, alimentação inapropriada, sedentarismo e também a exposição à fatores ambientais, como radiação, poluentes e carcinógenos químicos. Por outro lado, os fatores endógenos estão relacionados às características genéticas pré-determinadas, hereditariedade e o estado imunológico do organismo (INCA 2017) [acessado em agosto de 2017].

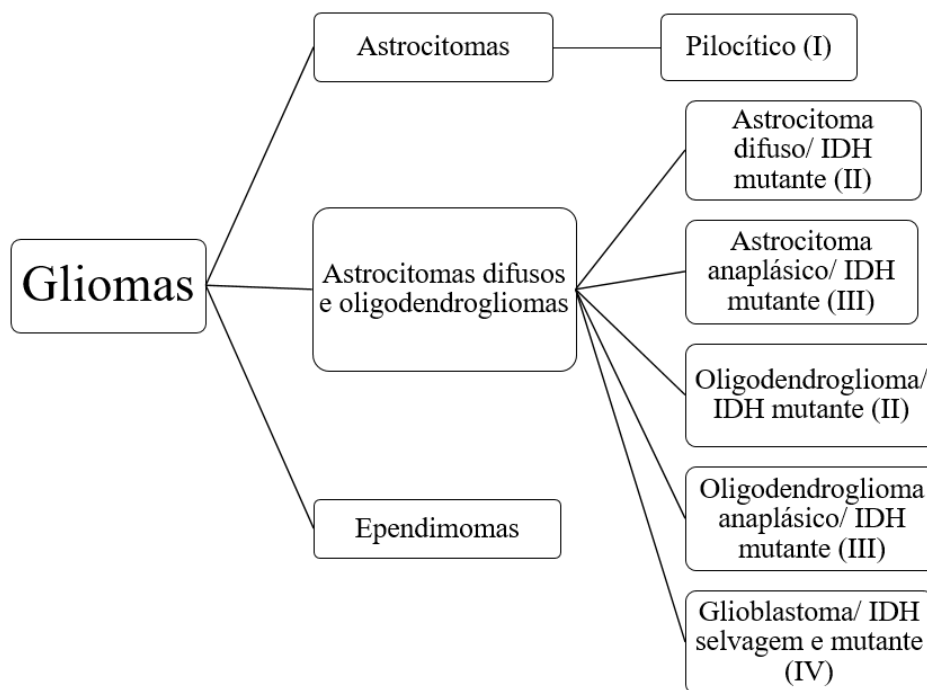
## 1.2. Os gliomas

O sistema nervoso central (SNC) dos vertebrados é constituído por dois grupos celulares, os neurônios e as células da glia (neuroglia). As células da glia são responsáveis por garantir proteção, sustentabilidade, nutrição e sobrevivência dos neurônios, e são classificadas em astrócitos, oligodendrócitos, células ependimárias e as células da microglia (**Figura A**) (RADOGNA et al., 2009). Uma das principais funções dos astrócitos é a de neuroproteção e preservação da sobrevivência dos neurônios. Sendo assim, qualquer disfunção destas células afeta diretamente na viabilidade neuronal (TAKUMA; BABA; MATSUDA, 2004).



**Figura A:** Células do sistema nervoso central: neurônio e células da glia. Retirado de <http://www.celldiagram.net>

As neoplasias de células gliais são chamadas de gliomas. São tumores malignos, considerados os tumores primários mais comuns no cérebro, constituindo aproximadamente 80% dos tumores que se desenvolvem no SNC (DOLECEK et al., 2012). Dependendo do tipo de célula glial que o tumor se desenvolve, podem ser classificados em astrocitomas, oligodendrogliomas ou ependimomas (POLLARD et al., 2009). Segundo a organização mundial da saúde (OMS), há uma série de critérios histológicos e moleculares para a identificação dos diferentes graus de classificação entre os gliomas, sendo que dentre os parâmetros moleculares, as mutações relacionadas à enzima isocitrato desidrogenase (IDH) são as mais relevantes (**Figura B**) (DOLECEK et al., 2012; LOUIS et al., 2016).



**Figura B:** Classificação dos gliomas de acordo com o tipo celular que o tumor se origina e os graus de divisão dos astrocitomas e oligodendrogliomas, destacando seu grau de malignidade (I, II, III ou IV), segundo a OMS (IDH – enzima isocitrato desidrogenase).

As características histológicas para a identificação da malignidade dos astrocitomas, foco do nosso trabalho, incluem a atipia nuclear, quadros de mitose, proliferação microvascular e necrose. O quadro menos agressivo é o grau I, onde não há ocorrência de lesões distintas; o grau II é caracterizado pela presença de apenas um parâmetro de classificação; o grau III é representado pela presença de duas lesões e o grau IV, considerado o mais grave, apresenta critérios de 3 a 4 variáveis, sendo o tipo de glioma mais agressivo e com pior prognóstico (**Tabela 1**) (KARSY et al., 2012).

| <b>Grau</b> | <b>Classificação segundo OMS</b> | <b>Característica Histológica</b>   |
|-------------|----------------------------------|---|
| <b>I</b>    | Astrocitoma pilocítico           | Sem lesões distintas  |
| <b>II</b>   | Astrocitoma difuso               | Geralmente atipia nuclear   |
| <b>III</b>  | Astrocitoma anaplásico           | Geralmente atipia nuclear e atividade mitótica                              |
| <b>IV</b>   | Glioblastoma                     | Geralmente atipia nuclear, mitose, proliferação microvascular e/ou necrose. |

**Tabela 1:** Graus de astrocitoma e suas principais características histológicas. Adaptado de (LOUIS et al., 2007).

O astrocitoma de grau IV é o glioblastoma, representando aproximadamente 54% dos astrocitomas malignos. O glioblastoma ainda pode ser dividido em dois subtipos, sendo estes glioblastomas IDH-selvagem ou IDH-mutante. Os tumores selvagens para a IDH são considerados tumores primários, sem identificação de células precursoras e apresentam uma proporção de 90% dentre os glioblastomas. Já os tumores mutantes para a IDH podem ser considerados tumores secundários, ou seja, apresentam células tumorais precursoras ao seu desenvolvimento, como o astrocitoma difuso ou o anaplásico, com uma proporção de 10% dentre os glioblastomas (LOUIS et al., 2016; OHGAKI; KLEIHUES, 2013).



### **1.2.1. Dados Epidemiológicos**

Segundo a OMS, aproximadamente 14 milhões de pessoas desenvolvem algum tipo de câncer todos os anos, e essa média deve aumentar para 21 milhões de pessoas até o ano de 2030. A cada ano, 8,8 milhões de pessoas em todo o mundo morrem em decorrência do câncer, sendo que essa enfermidade mata duas vezes e meia mais do que HIV/AIDS, tuberculose e malária juntas (OMS 2017) [acessado em agosto de 2017].

Os tumores cerebrais malignos estão entre os mais agressivos tipos de câncer, e essa classificação é dada pelos reflexos diretos na qualidade de vida, nas funções cognitivas do organismo e no prognóstico limitado da doença (PORTER et al., 2010). Estes tumores apresentam uma incidência de 5,26 por 100.000 indivíduos na população mundial, com aproximadamente 17.000 novos casos sendo diagnosticados por ano (OMURO, 2013).

O glioblastoma é o mais incidente entre os tumores malignos do SNC, sendo altamente invasivo, resistente à radiação e à quimioterapia e apresentando um prognóstico extremamente desfavorável (BRYUKHOVETSKIY et al., 2015). Estudos revelam que as taxas de incidência do glioblastoma em homens são maiores do que em mulheres, apresentando uma relação de 1,26 para 1, respectivamente. Além disso, as taxas de ocorrência destes tumores em crianças e neonatos é cerca de 1,1 a 3,6 em 100.000 crianças, com uma proporção de 3,3 crianças do sexo masculino para 1 criança do sexo feminino (MAHVASH et al., 2011; URBAŃSKA et al., 2014).

Segundo o instituto nacional do câncer (INCA), no Brasil, foram estimados cerca de 5.440 novos casos de neoplasias do SNC para homens e cerca de 4.830 para mulheres. Esses valores representam aproximadamente 5,5 novos casos a cada 100.000 homens e aproximadamente 4,68 novos casos a cada 100.000 mulheres (INCA 2017) [acessado em agosto de 2017].

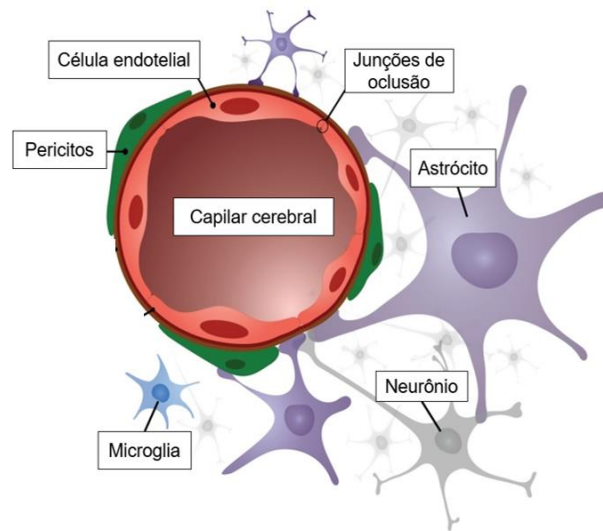
Ao contrário da maioria dos outros tipos de câncer, onde a metástase é a principal causa de morte, quadros de metástase de glioblastoma raramente ocorrem fora do SNC, sendo assim, a

principal causa de morte em pacientes com glioblastoma está relacionada com as altas taxas de invasão do tumor dentro do parênquima cerebral (HAMILTON et al., 2014; LUN et al., 2011). Todavia, uma vez iniciado esse processo pelo sangue ou líquido cefalorraquidiano, os principais órgãos-alvo são o baço, pulmão, linfonodos, fígado, pâncreas, ossos e intestino delgado (BIRBILIS et al., 2010; HAMILTON et al., 2014; ROBERT; WASTIE, 2008).

### **1.2.2. Padrão atual de terapias e os obstáculos do tratamento**

O padrão atual de tratamento para pacientes diagnosticados com glioblastoma inclui ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia e estima-se uma sobrevida média de menos de um ano após o diagnóstico da doença (BEIER et al., 2012). O tratamento de tumores cerebrais malignos continua sendo um dos maiores desafios para os oncologistas (ZIEGLER et al., 2008), devido a diversos fatores que impedem a eficácia do tratamento, como a estrutura complexa do cérebro, a natureza heterogênea e invasiva dos tumores, a dificuldade em identificar as margens do tumor, a acumulação insuficiente de fármacos no local da doença e a alta resistência aos quimioterápicos e à radioterapia (CHENG et al., 2014).

Além disso, as terapias para os tumores cerebrais tornam-se difíceis, pelo fato da doença se desenvolver no SNC, o qual é protegido pela barreira hematoencefálica (BHE) (**Figura C**) (SMIRNOVA et al., 2014). A BHE é constituída por uma monocamada de células endoteliais ligadas aos pericitos e aos astrócitos (LESNIAK; BREM, 2004) e tem como função limitar o transporte livre de moléculas da corrente sanguínea para o parênquima cerebral (THÖLE et al., 2002). Assim, apenas moléculas lipofílicas, eletricamente neutras e com um tamanho entre 400-600 Da conseguem difundir passivamente através da BHE e atingir o parênquima cerebral (CHENG et al., 2014).

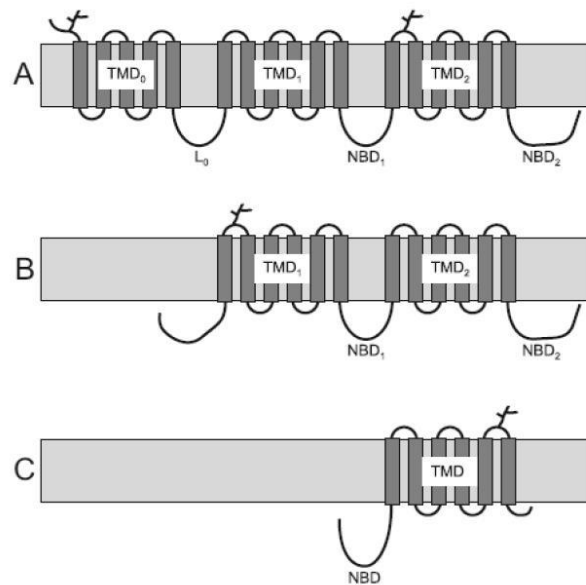


**Figura C:** Constituição da barreira hematoencefálica. Ligação entre as células endoteliais dos capilares cerebrais, pericitos e astrócitos. Adaptado de (PINTO et al., 2017).

Embora a BHE seja um dos principais obstáculos para o tratamento destes tumores, a resistência a múltiplas drogas (MDR) também contribui com a dificuldade na terapêutica da doença. A MDR trata-se de um fenótipo de resistência adquirida, ou seja, quando surge em um segundo ciclo de tratamento (pós-terapia), respondendo a determinados quimioterápicos inicialmente, porém, adquirindo resistência aos mesmos e a outros não relacionados (GOTTESMAN; PASTAN, 1993; LONGLEY; JOHNSTON, 2005). Este mecanismo é observado tanto em células tumorais *in vivo* quanto *in vitro*, resultando na ausência de respostas aos tratamentos quimioterápicos (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

A resistência a múltiplas drogas pode estar relacionada a uma série de fatores que não estão completamente elucidados. Um dos principais fatores envolvidos é o transporte do fármaco através da membrana plasmática (SHAROM, 2014), o qual é considerado a principal forma de resistência, pois esse procedimento pode envolver, no mínimo, três bombas que realizam o transporte dos quimioterápicos para fora da célula (SZAKÁCS et al., 2006). Essas bombas de efluxo pertencem à superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) e incluem o transportador ABCB1 (glicoproteína-P), o transportador ABCG2 (BCRP) e o transportador ABCC1 (MRP1) (**Figura D**) (ECKFORD; SHAROM, 2009).

Outra importante característica dessas bombas de efluxo é que elas também estão presentes na membrana celular de alguns tecidos normais (não-tumorais), como por exemplo, nas células endoteliais da BHE, funcionando como um importante mecanismo de controle no fluxo de fármacos da corrente sanguínea para o parênquima cerebral, assim como o fluxo no sentido contrário (KING et al., 2001).



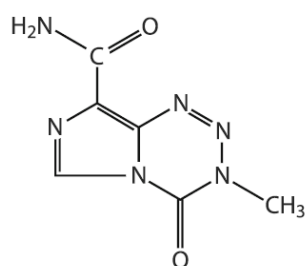
**Figura D:** Arquitetura molecular dos transportadores ABC. (A) O transportador ABCC1/MRP1, (B) o transportador ABCB1/P-gp e (C) o transportador ABCG2/BCRP (TMD – domínio transmembrana; NBD – domínio de ligação de nucleotídeos). Adaptado de (KUNJACHAN et al., 2013).

Os quimioterápicos utilizados no tratamento de pacientes diagnosticados com glioblastoma, como tricostatina A, ácido valpróico, vorinostat, toxina HC (*Helminthosporium carbonum*), carmustina (BCNU) e temozolomida (TMZ), apresentam resultados satisfatórios (OHBA; HIROSE, 2016; SIROTA et al., 2011). Porém, a entrada dos mesmos no parênquima cerebral é dificultada em razão da presença da BHE e da expressão de proteínas responsáveis pela quimioresistência, tornando ainda mais difícil obter-se respostas positivas ao tratamento, ocasionando acentuados efeitos colaterais, tais como náuseas e vômito, linfopenia (contagem de linfócitos abaixo de 1.000 células/mm<sup>3</sup>), aumento da atividade de enzimas hepáticas,

erupções cutâneas, entre outros (CALATOZZOLO et al., 2005; CARVEY; HENDEY; MONAHAN, 2009; OMURO, 2013).

### 1.3. A temozolomida

A TMZ (Temodal<sup>®</sup>, Temodar<sup>®</sup>) (**Figura E**) é a referência quimioterápica de primeira linha para o tratamento de gliomas malignos, sendo administrada por via oral. Ela é um derivado de imidazotetrazinas, uma classe de heterocíclicos aromáticos bicíclicos, e atua como um agente de alquilação, tendo como alvo o DNA, sendo utilizada em combinação com a radioterapia. Como consequência, gera adutos entre as bases nitrogenadas do DNA metilado que, sucessivamente, interferem no desenvolvimento das células tumorais, diminuindo as taxas de proliferação e possível dispersão no organismo (NEIDLE; THURSTON, 2005; STEPANENKO et al., 2016; VILLANO; SEERY; BRESSLER, 2009).

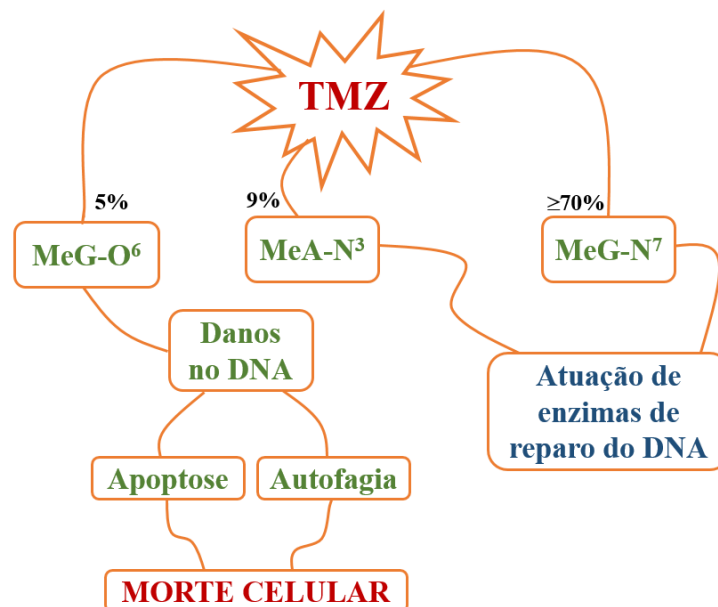


**Figura E:** Estrutura química da Temozolomida. Adaptado de (VILLANO; SEERY; BRESSLER, 2009).

A metilação do DNA ocorre principalmente em três sítios nucleofílicos, na guanina O<sup>6</sup> [MeG-O<sup>6</sup> (5%)], na adenina N<sup>3</sup> [MeA-N<sup>3</sup> (9%)] e na guanina N<sup>7</sup> [MeG-N<sup>7</sup> (70%)] (MOODY; WHEELHOUSE, 2014). Contudo, as metilações MeA-N<sup>3</sup> e MeG-N<sup>7</sup> não apresentam valores terapêuticos, pois enzimas de reparo por excisão de bases conseguem converter o dano gerado pela metilação. Sendo assim, a ação TMZ pode ser atribuída apenas às metilações que ocorrem na G-O<sup>6</sup>, representando uma pequena parcela (5%) dos danos gerados no DNA. Contudo, há

uma enzima de reparo relacionada a metilação na G-O<sup>6</sup>, a *metilguanina-DNA metiltransferase* (MGMT), a qual reverte a metilação, levando a uma ineficiência da ação da TMZ (ZHANG; FG STEVENS; D BRADSHAW, 2012).

Durante a replicação, a MeG-O<sup>6</sup> sem reparação alerta um sistema de reparo de incompatibilidade do DNA, o qual reconhece a metilação e inicia um processo de excisão de bases, porém a MeG-O<sup>6</sup> persiste em uma das fitas do DNA. Como consequência, ciclos de excisão e reinserção de bases resultam em rupturas da cadeia dupla do DNA, levando a um colapso na forquilha de replicação, ocasionando a parada do ciclo celular. Em um último momento, a célula entra em processo de apoptose ou autofagia, seguindo-se da morte celular (**Figura F**) (MARGISON; SANTIBÁÑEZ-KOREF, 2002; MOJAS; LOPES; JIRICNY, 2007). Desse modo, a alta funcionalidade do sistema de reparo de incompatibilidade do DNA e os baixos níveis da MGMT são requeridos para uma maior sensibilidade das células tumorais à TMZ (ZHANG; FG STEVENS; D BRADSHAW, 2012).



**Figura F:** Mecanismo de ação da TMZ. A metilação na guanina O<sup>6</sup> (MeG-O<sup>6</sup>) ocasiona adutos no DNA que representam apenas 5% das lesões no DNA induzidas pela TMZ, entretanto, são responsáveis pelo efeito citotóxico. O sistema de reparo de incompatibilidade do DNA reconhece os pares de bases anormais contendo a MeG-O<sup>6</sup> e eventualmente leva à quebra na fita dupla do DNA seguida da morte celular. Os adutos da metilação na adenina N<sup>3</sup> (MeA-N<sup>3</sup>) e na guanina N<sup>7</sup> (MeG-N<sup>7</sup>) também são citotóxicos, mas geralmente são reparados pelo sistema de reparo por excisão de bases. Adaptado de (VILLANO; SEERY; BRESSLER, 2009).

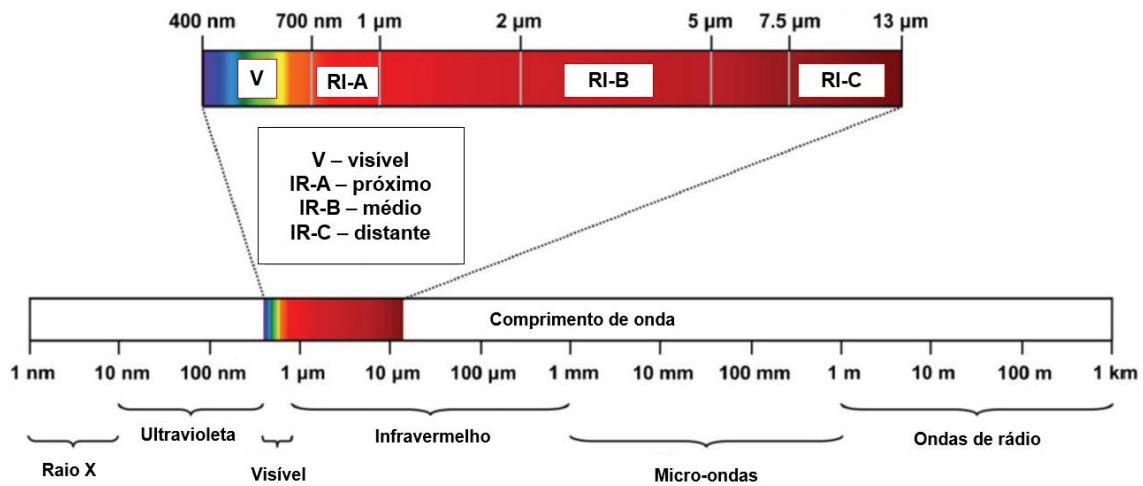
Em um outro sentido de resistência à TMZ está a resistência adquirida, representada pela superexpressão das bombas de efluxo na membrana das células, como dito anteriormente. A P-gp e a MRP1 são as proteínas de extrusão de fármacos que mais são expressas em células de glioblastoma, assim como nas células endoteliais que compõem a BHE (CALATOZZOLO et al., 2005). Dentre os transportadores de membrana encontrados em células que expressam o fenótipo MDR, a P-gp é a mais estudada *in vitro*, *in vivo* e na clínica, pois há uma superexpressão dessa proteína em células tumorais (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010), inclusive na linhagem de estudo, a C6, que expressa uma quantidade elevada do gene MDR1, o qual codifica a P-gp, seguida da expressão da MRP1, caracterizando alta resistência aos quimioterápicos (DECLÈVES et al., 2008).

Como já citamos, um tratamento adjuvante utilizado junto à administração da TMZ é a radioterapia. Estudos revelam uma eficiência da combinação desses tratamentos, aumentando a sobrevida de pacientes com glioblastoma em 12,1 – 14,6 meses em comparação apenas com os tratamentos radioterápicos, sendo que dentre esses estudos, as pesquisas mostram que há uma redução de 41% de riscos de morte após os tratamentos combinados (STUPP et al., 2005; YIN et al., 2013). Contudo, sabe-se que a radioterapia convencional utilizada na clínica em combinação com a TMZ causa danos às células não-tumorais e aos tecidos adjacentes à região do tumor, bem como ao organismo em geral. Nesse sentido, buscamos investigar os efeitos da radiação infravermelha na linhagem celular de estudo.

#### **1.4. A radiação infravermelha**

A radiação infravermelha (RI) é uma radiação solar, eletromagnética e não-ionizante que atinge a superfície terrestre, e compreende um comprimento de onda ( $\lambda$ ) que varia entre 760 nm a 1 mm (**Figura G**). Ainda, a RI pode ser dividida em RI-A ou RI-próxima ( $\lambda= 760 \text{ nm} - 1440 \text{ nm}$ ), RI-B ou RI-média ( $\lambda= 1440 \text{ nm} - 3000 \text{ nm}$ ) e RI-C ou RI-distante ( $\lambda=3000 \text{ nm} -$

1mm) (SCHROEDER; HAENDELER; KRUTMANN, 2008). Nesse trabalho, utilizamos uma lâmpada de LED (diodo emissor de luz) atérmica na faixa do infravermelho próximo, com pico de emissão em 880 nm.



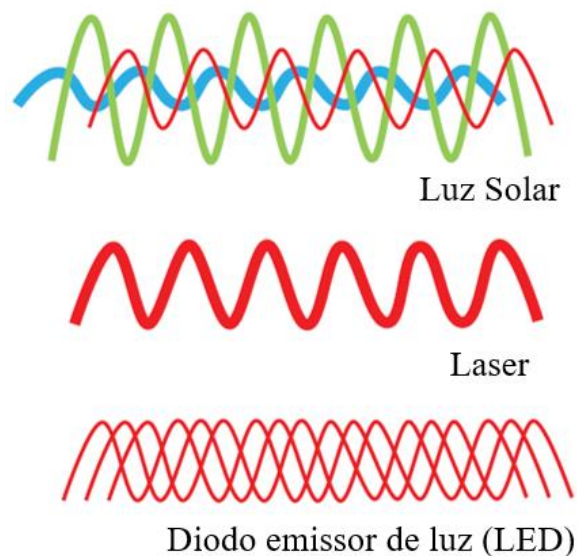
**Figura G:** Espectro eletromagnético. Adaptado de (KNOBEL; GUENTHER; RICE, 2011)

#### **1.4.1. Terapias com a RI-A e o câncer**

A RI-A vem sendo estudada na medicina pelas suas ações fotodinâmicas em combinação com algumas estruturas biológicas (células, membranas e fluidos celulares, DNA/proteínas), objetivando avaliar os efeitos da combinação sob diferentes aspectos fisiológicos (VATANSEVER; HAMBLIN, 2012). As terapias com radiação de baixo nível energético estão no âmbito das pesquisas que envolvem tratamentos com irradiação, na busca por respostas que são geradas pela intensidade de energia da radiação e não pelo calor, como é o caso da RI-A. Existem diferentes fontes atérmicas e de baixo nível energético, como lasers de baixa potência, LEDs e luz de banda larga, no espectro da luz visível e do infravermelho (TSAI; HAMBLIN, 2017).



As terapias com RI-A são definidas como terapias com luz de baixo nível, as quais utilizam uma luz direcional de baixa potência e de alta fluência monocromática, tendo como fonte principalmente os LEDs no comprimento de onda do vermelho ou infravermelho próximo ( $\lambda = 600-1100 \text{ nm}$ ), de modo que se resulte em um efeito terapêutico atérmico e não danoso aos tecidos em função do aquecimento (KARU, 2008; SOMMER et al., 2001). Os LEDs se diferenciam da energia solar ou lasers por serem monocromáticos e apresentam uma alta especificidade e biomodulação molecular direta (**Figura H**), caracterizando-os como uma fonte que permite a entrega de energia eficiente, destacando-se assim, quando o órgão a ser irradiado apresenta uma grande área de superfície, como por exemplo, o cérebro (ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013).



**Figura H:** Características da luz de baixo nível energético. A luz solar é composta por uma combinação de ondas não-coerentes com comprimentos de onda que abrangem todo o espectro visível. Em contraste, os lasers emitem ondas de um único comprimento de onda (monocromático), que possuem sincronização espacial e temporal. Esta alta coerência de comprimento de onda permite a transmissão de energia com alta densidade de potência. Os LEDs consistem em ondas monocromáticas que se direcionam a caminhos diferentes, caracterizando a não-coerência dessa radiação, mas que atingem um ponto alvo comum. A não-coerência permite a exposição do tecido nervoso, por exemplo, a comprimentos de onda "terapêuticos" e com densidades de potência relativamente baixas durante o tempo necessário para modular o metabolismo neural em resposta à ativação ou lesão no tecido, mesmo que este tempo seja prolongado. Adaptado de (ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013).

O uso de LEDs como terapia torna-se interessante quando se trata de fontes de radiações atômicas, pelo fato desse tipo de radiação gerar quantidades insignificantes de calor, reduzindo os riscos de lesões térmicas por aquecimento e destruição dos tecidos, como dissecação, ablação, coagulação e vaporização (EELLS et al., 2004). A RI-A, por apresentar um menor comprimento de onda, possui um conteúdo de energia eletromagnética maior, ou seja, inversamente proporcional ao seu comprimento de onda, o que permite uma maior capacidade de penetração em tecidos e órgãos. Além disso, as terapias com LEDs de baixo nível energético são reconhecidas pela FDA (*Food and Drug Administration*) para ensaios humanos sem qualquer status de risco à saúde (ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013; WONG-RILEY et al., 2005).

Muitos estudos relatam a eficiência da utilização de terapias envolvendo a RI-A, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, é importante levar em consideração que estudos pré-clínicos demonstraram que as terapias com RI-A não apresentaram qualquer risco de efeitos colaterais graves em pacientes. Os benefícios do uso dessa radiação estão associados à regeneração da pele, proteção contra danos gerados pela radiação ultravioleta, cicatrização de feridas, bem como o estímulo na síntese de fibras elásticas e colágenas (GRETHER-BECK et al., 2014; PORTANTIOLO LETTNIN et al., 2016).

A capacidade da RI-A penetrar o crânio e atingir o cérebro foi descrita anteriormente por Helm e colaboradores (2009). Com isso, para além dos processos de foto-ação e fotoproteção da RI-A relacionados à pele, pesquisas mostram que existem atividades relacionadas ao SNC, por exemplo, promovendo a estimulação neuronal (HELM; OTTERSEN; NASE, 2009; WONG-RILEY et al., 2005). Entretanto, a capacidade de atingir o parênquima cerebral não depende apenas do comprimento de onda da radiação, mas também das propriedades de absorção da radiação pelo tecido alvo, como a substância branca e cinzenta cerebral (ABDO; SAHIN, 2007).

Ainda, em relação às desordens que acometem o SNC, Rojas e Gonzalez-Lima (2013) revelam inúmeros estudos que envolvem a RI-A sendo utilizada como terapia para traumatismos cerebrais, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, bem como a anoxia cerebral e quadros de epilepsia (DETABOADA et al., 2006; ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013; UOZUMI et al., 2010). Acredita-se que esses benefícios observados pela irradiação com RI-A estejam relacionados à uma maior atividade do citocromo C oxidase e da enzima superóxido dismutase, processos que serão discutidos posteriormente, resultando em efeitos antioxidantes e neuroprotetores (ROJAS et al., 2008).

Os efeitos da RI-A em células tumorais ainda não são totalmente compreendidos, contudo, acredita-se que a interação da RI-A com células tumorais gera efeitos em relação a potenciais de ação na membrana e no seu metabolismo mitocondrial (SHEPPARD; SWICORD; BALZANO, 2008). Com isso, a apoptose é a principal causa de morte observada nos estudos com a RI-A em células tumorais, e esse efeito é independente da energia termal (OBAYASHI et al., 2015; TANAKA et al., 2010).

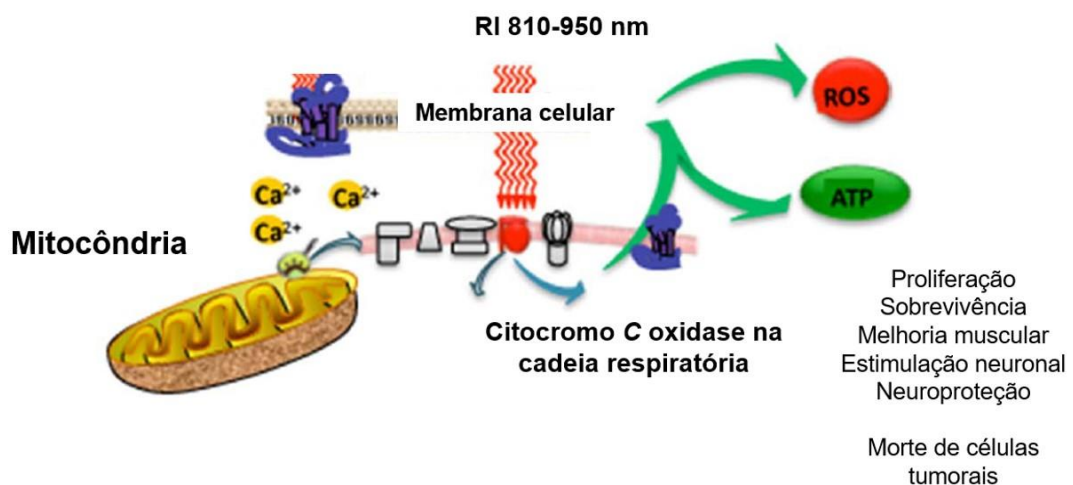
Tanaka e colaboradores avaliaram os efeitos da exposição de diversas linhagens tumorais (MCF-7 câncer de mama; HeLa câncer cervical uterino; NUGC-4 câncer gástrico; A549 adenocarcinoma de pulmão e B16F0/MDA-MB435 ambas melanoma) à RI-A, verificando uma diminuição da proliferação celular, indução de apoptose, danos de DNA, assim como uma parada na fase G2/M do ciclo celular (TANAKA et al., 2010, 2012).

Em relação à utilização da RI-A em culturas celulares de gliomas ou em modelos *in vivo* destes tumores, não encontramos dados na literatura referentes a este tema. Entretanto, com base nos argumentos citados em relação à capacidade da RI-A penetrar o crânio e gerar efeitos benéficos ao SNC, além de mostrar-se uma possível alternativa antitumoral, os tratamentos transcranianos com a RI-A podem se tornar úteis em relação à neuroproteção do tecido saudável

adjacente a região do tumor após a ressecção cirúrgica, além de não induzir riscos de fotobiomodulação do tumor residual (ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013)

#### 1.4.2. Efeitos biológicos e o mecanismo de ação da RI-A

Os efeitos biológicos gerados pela RI-A são determinados pela absorção de tal comprimento de onda por moléculas de fotoceptores, ou seja, cromóforos presentes em estruturas celulares, resultando em uma fotobiomodulação dessas estruturas (TSAI; HAMBLIN, 2017). Os efeitos fisiológicos gerados são consequências da excitação em dois principais tipos de fotoceptores, a água intracelular e a citocromo *C* oxidase, as quais podem modular as vias de sinalização intracelular (**Figura I**) (CHEN et al., 2009).



**Figura I:** Mecanismos de ação da radiação infravermelha próxima (RI) a nível celular e molecular. Adaptado de (TSAI; HAMBLIN, 2017).

O citocromo *C* oxidase é uma das proteínas que compõem um conjunto proteico localizado na membrana interna das mitocôndrias, também conhecido como complexo IV. Agrupado ao complexo I (NADH desidrogenase), II (succinato desidrogenase), III (citocromo *C* redutase) e

V (ATP sintase), formam o complexo transportador de elétrons, responsável pela geração de energia em forma de ATP (CAPALDI *et al.* 1983). Por ser considerado o principal cromóforo para a RI-A, Karu e colaboradores (2005) procuraram investigar quais comprimentos de onda seriam melhores absorvidos pelo citocromo *C* oxidase, concluindo-se que existem quatro picos de intensidade do espectro que são consideradas regiões ativas para a sua absorção, variando de 600 a 860 nm, aproximadamente (613.5 - 623.5 nm; 667.5 - 683.7 nm; 750.7 - 772.3 nm e 812.5 - 846.0 nm). (KARU; KOLYAKOV, 2005).

A fotobiomodulação gerada pela RI-A resulta em dois mecanismos de ação, os primários e os secundários. Os primários ocorrem durante a exposição à RI-A, onde há uma mudança no estado redox dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, induzindo a oxidação ou redução do citocromo *C* oxidase. Como consequência, surgem alterações no fluxo de elétrons, o que acarreta em um aumento no consumo de oxigênio e aumento nos potenciais de ação na membrana mitocondrial. Além disso, há um aumento significativo das espécies reativas de oxigênio (ERO), como oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), bem como seu produto de dismutação, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (PASSARELLA; KARU, 2014; ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013).

Os mecanismos de ação secundários ocorrem no período após irradiação, surgindo como um efeito dos mecanismos primários, o que resulta em alterações nos parâmetros que conferem a homeostasia celular. Esses efeitos são observados principalmente em vias de sinalização celular que envolvem segundos mensageiros, como o NAD/NADH, AMPc,  $\text{Ca}^+$  e ATP. Também se observa alterações na expressão de alguns genes, pois a RI-A ativa uma via retrógrada da mitocôndria para o núcleo, respondendo assim com alterações nos níveis de expressão de genes relacionados a divisão celular, expressão de moléculas de superfície e proteínas regulatórias do estado redox e das vias apoptóticas (KARU, 2008; ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013).

### **1.5. Terapia fotodinâmica**

A terapia fotodinâmica (TFD) é utilizada como uma modalidade terapêutica para uma série de doenças, sejam elas associadas ao câncer ou a outras lesões não malignas. A caracterização da TFD envolve três componentes minimamente invasivos, que são: (1) a administração tópica ou sistêmica de um medicamento fotossintético denominado fotossensibilizador (FS), (2) a irradiação da região alvo com uma fonte de luz monocromática altamente energética, geralmente no comprimento de onda da luz visível ou vermelho/infravermelho próximo (RI-A) e (3) a interação entre o FS e a fonte de radiação, resultando na excitação de tal molécula que reage com os fótons absorvidos e que, no final da reação, geram espécies altamente reativas, como as ERO (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; MARIANNE J. CRONJE, 2017).

Os relatos históricos da utilização da TFD datam meados do início do século XX, onde pesquisadores e médicos utilizavam o corante eosina em combinação com a luz visível para o tratamento do câncer da pele (JESIONEK; VON-TAPPENIER, 1903). Desde então, as pesquisas no campo da TFD ganharam interesse e foram destacando-se no meio das ciências para a sua aplicação médica. O auge das pesquisas relacionadas com a TFD foi durante a década de 1960, quando Lipson e Baldes descobriram o primeiro FS capaz de ser utilizado junto à TFD, o qual foi detectado no tecido tumoral e com a capacidade de induzir regressão do tumor após exposição à luz visível (LIPSON; BALDES, 1960).

A escolha do FS adequado para a utilização na TFD requer uma série de características que devem ser levadas em consideração. O FS deve apresentar nenhuma ou baixos níveis de toxicidade para animais de experimentação ou humanos, como hipotensão ou reações alérgicas, também deve apresentar a absorção de luz nos comprimentos de onda do vermelho ou infravermelho próximo. Além disso, o FS deve apresentar uma banda de absorção relativamente alta para minimizar as doses de sua administração e obter sucesso no tratamento e, dentre

outros, o FS deve apresentar uma farmacocinética de eliminação relativamente rápida, uma vez que há a necessidade de proteção contra a exposição à radiação no período pós-tratamento (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

À nível molecular, o FS, ao absorver a radiação, torna-se excitado e pode iniciar uma série de reações. Em uma reação do tipo I, o FS excitado pela radiação, pode interagir com algumas estruturas celulares, como membranas ou outras moléculas presentes do meio intracelular. Esse tipo de reação tem por característica a transferência de prótons ou elétrons para formar radicais catiônicos ou aniônicos, respectivamente. Ainda, na reação do tipo I, esses radicais podem interagir com o oxigênio molecular e dar início a produção de ERO, principalmente o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Sucessivamente, em uma reação do tipo II, o FS excitado pela radiação, pode doar a sua energia de excitação diretamente para um oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singlete reativo. Essas duas reações podem ocorrer concomitantemente e, por fim, seus produtos de reação são capazes de interagir com as estruturas celulares tornando-as oxidadas e que, posteriormente, acabam levando a danos e a morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; MA; JIANG, 2001).

A aplicação da TFD no tratamento do câncer é de grande importância e torna-se cada vez mais atraente, uma vez que o FS se localiza no tecido tumoral e a radiação deve atingir apenas a região do tumor, evitando assim, danos aos tecidos saudáveis adjacentes (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). O motivo pelo qual as células tumorais morrem ao entrar em contato com as ERO após TFD ainda é um objeto de estudo que intriga muitos pesquisadores. Sabe-se que em um microambiente tumoral, os níveis de ERO são altos e a atividade das enzimas antioxidantes são baixas, conferindo vantagens para as células tumorais sobreviverem, multiplicarem-se e tornarem-se resistentes aos tratamentos (FRANCO et al., 2008). Contudo, as células tumorais apresentam uma maior sensibilidade às ERO geradas após TFD, visto que após um ciclo de TFD, os níveis intracelulares de ERO aumentam em massa e

ultrapassam um limiar do qual a célula resiste. Assim, as ERO chegam a um nível capaz de diminuir a estimulação da produção de enzimas antioxidantes, reduzindo a proliferação e o crescimento celular e, em consequência desses processos, induzem a morte celular (ABRAHIM; KANTHIMATHI; ABDUL-AZIZ, 2012; HILEMAN et al., 2004; WANG et al., 2011).

As duas principais vias de morte celular, apoptose ou necrose, são bem relatadas na literatura como consequências da TFD. Entretanto, o tipo celular, a localização subcelular do FS e a dose de radiação aplicada, são fatores essenciais para determinação do tipo de morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; OLEINICK et al. 2002). Acredita-se que doses mais baixas de TFD encaminham a célula para uma morte por apoptose, enquanto que doses mais elevadas de TFD, induzem morte por necrose. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que, através de doses menores de TFD, o citocromo *C* é rapidamente liberado no citoplasma, seguindo-se da ativação de um apoptossoma envolvendo caspases, o que caracteriza uma morte celular por apoptose. Por outro lado, doses mais elevadas de TFD inativam enzimas e outros componentes necessários para a cascata apoptótica, como as caspases, e levam à morte celular por necrose (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; NAGATA et al., 2003; PLAETZER et al., 2002).

Muitos estudos relatam a eficiência da TFD para tumores cerebrais malignos e, como dito anteriormente nesta seção, a sobrevida média de pacientes diagnosticados com glioblastoma aumenta para aproximadamente 14,6 meses após os tratamentos de radiação e quimioterapia combinados (AKIMOTO, 2016; BECHET et al., 2014; MIKI et al., 2014; STUPP et al., 2005; VANACLOCHA et al., 2015). Entretanto, não encontramos dados na literatura que utilizem a radiação infravermelha na faixa do comprimento de onda próximo como um possível tratamento para os tumores cerebrais malignos. Ainda, não encontramos dados no que se diz respeito a interação entre a RI-A e a TMZ. Visto que esse quimioterápico



é altamente utilizado nos tratamentos do glioblastoma e que a RI-A apresentou resultados significantes em outras linhagens tumorais, independente da geração de calor, o presente estudo buscou investigar os efeitos da combinação da RI-A com a TMZ em uma linhagem celular de glioblastoma.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral do presente estudo foi analisar os efeitos da exposição à RI-A sozinha ou em combinação com o quimioterápico temozolomida em uma linhagem celular de glioblastoma de rato (C6).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Analisar os efeitos antiproliferativos/citostáticos *in vitro* da RI-A combinada ou não com a TMZ;
- Analisar a possível morte celular por apoptose ou necrose *in vitro* decorrente da exposição à RI-A, na presença e na ausência da TMZ;
- Analisar os níveis de espécies reativas de oxigênio *in vitro* gerados pela exposição à RI-A, na presença e na ausência da TMZ;
- Analisar o processo de migração celular *in vitro* após a exposição à RI-A sozinha ou combinada com a TMZ;
- Analisar a atividade *in vitro* do transportador ABCB1 (P-gp) na linhagem C6 após a exposição à RI-A sozinha ou combinada com a TMZ.

### **3. Manuscrito**

**Manuscrito a ser submetido ao periódico Journal of Photochemistry and Photobiology  
B: Biology**

**INTERACTION BETWEEN NEAR INFRARED RADIATION AND  
TEMOZOLOMIDE IN A GLIOBLASTOMA MULTIFORM CELL LINE: A  
TREATMENT STRATEGY?**

Marcelo Augusto Germani Marinho <sup>a</sup>, Magno da Silva Marques <sup>a</sup>, Aline Portantiolo Lettnin <sup>a</sup>,  
Ana Paula de Souza Votto <sup>a</sup>, Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira <sup>b</sup>, Ana Paula Horn <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Cultura Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio  
Grande-FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

Marcelo Augusto Germani Marinho – [marceloaugustomarinho@gmail.com](mailto:marceloaugustomarinho@gmail.com)

Magno da Silva Marques – [magnomarques@aol.com](mailto:magnomarques@aol.com)

Aline Portantiolo Lettnin – [line.89@hotmail.com](mailto:line.89@hotmail.com)

Ana Paula de Souza Votto – [anavotto@yahoo.com.br](mailto:anavotto@yahoo.com.br)

Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira – [dazafil@gmail.com](mailto:dazafil@gmail.com)

Ana Paula Horn – [anapaulahorn@yahoo.com.br](mailto:anapaulahorn@yahoo.com.br)

**Corresponding author:** Marcelo Augusto Germani Marinho;  
[marceloaugustomarinho@gmail.com](mailto:marceloaugustomarinho@gmail.com); Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal  
do Rio Grande – FURG; Av. Itália, Km 8, Rio Grande, RS, CEP 96210-900; Fone 55 53  
991086515; 55 53 3236 7472.

### 3.1. Abstract

Glioblastoma is one of the most aggressive malignant neoplasms that develop in the central nervous system (CNS) and accounts for approximately 54% of all malignant brain tumors. The high capacity of proliferation and tissue invasion are characteristic of its malignancy, in addition to being highly resistant to treatments of radiation and chemotherapy. Radiotherapy is an adjunctive treatment used together with the administration of temozolomide (TMZ), the main chemotherapeutic agent used to treat glioblastoma. Among many potential therapies for cancer, we highlight here photodynamic therapy (PDT), a combination of radiation and a photosensitizer capable of absorbing radiation and generating damage to tumor cells. Near-infrared radiation (IR-A) is a radiation with recognized biological effects described in the literature, highlighting its antioxidant, neuroprotective and antitumor effects. In view of the above, the aim of the present study was to evaluate the effects of the interaction between TMZ and IR-A on C6 glioblastoma cell line. We evaluated the effects of TMZ (10, 50, 100, 250, 500 and 1000  $\mu\text{M}$ ), IR-A (2, 3.5, 4.5 and 6  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) and the interaction between TMZ and IR-A by viability exclusion with tripan blue. To perform the interaction experiments, we have chosen 10  $\mu\text{M}$  TMZ and 4.5  $\text{J}/\text{cm}^2$  of IR-A. From this, we evaluated cytotoxicity, cell proliferation, intracellular reactive oxygen species levels (ROS), as well as the process of cell migration and the P-gp activity. As result of cellular viability, TMZ had a significant effect from the concentration of 100  $\mu\text{M}$  and IR-A did not present significant results. Cell death mainly due to apoptosis, followed by necrosis, decrease in cellular proliferation, increase in intracellular ROS levels, decrease in the cellular migration process and decrease of activity of P-gp were observed only when there was interaction between TMZ and IR-A. Our results suggest that, in the future, this interaction may serve as an antitumor strategy for PDT application.

**Keywords:** Light emitting diode, reactive oxygen species, glioma, P-glycoprotein, near-infrared radiation, photodynamic therapy

### 3.2. Introduction

Glioblastomas are the most common malignant brain tumors that develop in the central nervous system (CNS) [1], which are considered the most incidental and the most serious types of brain neoplasms estimating about 54% of cases of malignant astrocytomas [2,3]. Glioblastoma presents high resistance to radiotherapy and chemotherapy treatments, presenting an extremely unfavorable prognosis [4]. Therapies for brain tumors become difficult because the disease develops in the CNS, which is protected by the blood-brain barrier (BBB) [5], a physical barrier that limits the free transport of molecules from the blood to the cerebral parenchyma [6].

Although BBB is one of the major obstacles to the treatment of these tumors, multidrug resistance (MDR) also contributes to the difficulty in the treatment of the disease. MDR is a phenomenon of acquired resistance, responding to certain chemotherapeutics initially, but acquiring resistance to them [7,8]. The transport of drugs through the plasmatic membrane is one of the main factors involved in the phenomenon of MDR [9]. This phenomenon involves at least three transporters that extrude the chemotherapeutics out of the cell [10]. P-gp and MRP1 are the most widely expressed drug extrusion proteins in glioblastoma cells, as well as in endothelial cells that compose the BBB [11]. P-gp is the most studied *in vitro*, *in vivo* and in the clinic, because there is an overexpression of this protein in tumor cells [12].

Temozolomide (TMZ) is the chemotherapeutic reference for the treatment of glioblastoma, acting as a DNA alkylating agent. As a consequence, it interferes in the development of tumor cells, decreasing proliferation rates and possible dispersion in the organism [13,14]. However, a small proportion of the cytotoxic action of TMZ can be associated with its mechanism of action, approximately 5%, since there are enzymes that perform the repair of methylated DNA by excision and reinsertion of bases, reducing the damage generated in DNA [15]. Also, the presence of BBB and the expression of proteins

responsible for chemoresistance and DNA repair are factors that lead to greater difficulty in obtaining positive responses to treatment, leading to the need of high doses and marked side effects [11, 16, 17].

On the other hand, photodynamic therapy (PDT) is used as a therapeutic modality for a number of diseases, associated with cancer or other non-malignant lesions [18]. PDT involves three minimally invasive components, which are the use of a photosensitizer (PS), the irradiation of the target region with a highly energetic monochromatic light source, generally at the wavelength of visible light or red/near-infrared, and the interaction between the PS and the radiation source. As a final product of the reactions between PS and radiation, we have the generation of highly reactive species, such as reactive oxygen species (ROS), mainly singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) and the superoxide anion radical ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) [19], which are capable of interacting with some cellular structures, rendering them oxidized and eventually leading to damage and possible cell death [20].

The use of PDT in the form of conventional radiotherapy for malignant brain tumors is well described in the literature [20-23]. In addition to a significant increase in mean survival of patients undergoing PDT treatment for approximately 14.6 months, there is a 41% risk reduction of death following surgical resection with adjuvant PDT [24,25]. However, conventional radiotherapy is known to cause damage to non-tumor cells and tissues adjacent to the tumor region, as well as to the body in general.

Infrared radiation (IR) has been studied in medicine for its photodynamic actions in combination with some biological structures, in order to evaluate the effects of the combination under different physiological aspects [26]. IR is a non-ionizing electromagnetic radiation comprising a wavelength ranging from 760 nm to 1 mm and is divided into IR-A (760 nm - 1440 nm), IR-B (1440 nm - 3000 nm), and IR -C (3000 nm - 1mm) [27]. IR-A therapies are defined as low-energy light therapies, primarily as a source of light emitting diodes (LEDs), so

as to result in an athermal and non-harmful therapeutic effect on tissues [28,29] . The biological effects of IR-A are results of the absorption of radiation by chromophores present in cellular structures, resulting in excitation in two major photoacceptors, intracellular water and cytochrome C oxidase. The observed physiological effects result from the photobiomodulation of these structures on the cell signaling pathways [30,31], which induce a change in the redox state of the electron transport chain components, altering the electron flow and thus increasing the consumption of oxygen and the potencies of action on the mitochondrial membrane and consequently the intracellular ROS levels [32].

Studies that use IR-A in antitumor therapies are described in the literature and present significant results [33-36] and when it comes to healthy nervous tissue, many benefits are observed, including neuronal stimulation [37]. However, as far as we know, there is no study evaluating the effects of IR-A *in vitro* or *in vivo* on glioblastoma models or investigating the interaction between IR-A and TMZ as antitumor therapy, with possible PDT application. Thus, the aim of the present study was to investigate the *in vitro* effects of glioblastoma cell line C6 exposure to IR-A with or without TMZ treatment.

### **3.3. Materials and Methods**

### *3.3.1. Experimental model and cell culture*

The experiments were performed with a glioblastoma cell line C6 derived from rat obtained from the American Type Culture Collection. The cell line was cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (Gibco, USA), supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Brazil) and 100 U/L gentamicin and 2,5 mg/mL Fungizone<sup>®</sup> (Gibco, USA). Cells were maintained until the 30th passage in an incubator with an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### *3.3.2. Infrared lamp characteristics*

IR-A lamp with non-thermal wavelength (760–1400 nm, 100–240 V, 50/60 Hz 30WDPL Therapy System Infrared LEDs, USA) has a peak intensity of 880 nm with a mean irradiance of 1,5 mW/cm<sup>2</sup>. The lamp had no UVA, UVB or UVC radiation contamination, and it had a contamination of 238 μW/cm<sup>2</sup> of visible light. The irradiance of the IR-A lamp was measured immediately before the exposure tests with the IR-A using a radiometer (model IL 1400A, International Light, MA).

### *3.3.3. Exposure of cells to IR-A*

Cells (5x10<sup>3</sup> cells/mL) were seeded in 96-well plates and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24h. For exposure of the cells to the IR-A, the medium was removed and replaced with 100 μL of medium without FBS. The doses used were: 2 J/cm<sup>2</sup> (30 min), 3.5 J/cm<sup>2</sup> (45 min), 4.5 J/cm<sup>2</sup> (60 min) and 6 J/cm<sup>2</sup> (75 min). The control group did not receive IR-A irradiation. After the irradiation period, the medium without FBS was replaced with 100 μL of medium with 10% FBS and the cells were kept in a light-protected incubator until the analysis period.

### *3.3.4. Treatment with TMZ*



Cells ( $5 \times 10^3$  cells/mL) were seeded in 96-well plates and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24h. The TMZ (Sigma-Aldrich, USA) was diluted in DMSO (Dimethylsulfoxide) at a concentration of 10 mg/mL (w/v). TMZ treatments were performed at the concentrations of 10 μM, 100 μM, 250 μM, 500 μM and 1000 μM. Control cells did not receive TMZ, only treated with the vehicle. Cells were kept in a light-protected incubator until analysis.

### *3.3.5. Exposure of the cells to the IR-A with TMZ (interaction assay)*

Cells ( $5 \times 10^3$  cells/mL) were seeded in 96-well plates and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24h. For this experiment, the groups were divided into control (DMEM only), IR-A, TMZ and IR-A + TMZ. The concentrations of TMZ chosen were 10 μM and 100 μM and the groups received all doses of IR-A above cited. Cells were treated with the TMZ 30 min before exposure to IR-A, and it was maintained in the medium during analysis.

### *3.3.6. Cell viability assay*

After 24 or 48h of treatment, the groups that were irradiated with IR-A (2 J/cm<sup>2</sup>, 3.5 J/cm<sup>2</sup>, 4.5 J/cm<sup>2</sup> and 6 J/cm<sup>2</sup>), treated with TMZ (10 μM, 100 μM, 250 μM, 500 μM and 1000 μM) and the combined assay groups (IR-A, TMZ and IR-A + TMZ) were subjected to exclusion cell viability assay by trypan blue (Gibco, USA). Briefly, cells were washed twice with 200 μL of PBS and incubated with 50 μL of trypan blue and 50 μL of PBS for 10 min at room temperature. Next, the cells were washed with PBS and photographed under an Olympus IX81 epifluorescence inverted microscope at a 200X magnification. Were photographed and counted 3 fields per well and the pictures were quantified using ImageJ software and the data were expressed as the number of viable cells per field photographed. For subsequent assays, we performed analyzes with the combined treatments between TMZ at the concentration of 10 μM and IR-A at the dose of 4.5 J/cm<sup>2</sup>.

### 3.3.7. *Apoptosis and necrosis assay*

For analysis of cell death by apoptosis or necrosis, the cells ( $5 \times 10^3$  cells/mL) were seeded in 96-well plates and maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 24h. The apoptosis and necrosis assay was performed 3 and 6h after exposure of the cells to the combined treatments using the Annexin V-FITC fluorescence microscopy kit (Sigma-Aldrich, USA), following the protocol described by Engeland and collaborators with some modifications [38]. After the period of exposure cells were washed with a binding buffer and incubated with 50 µL of annexin V-FITC diluted 1:100 in binding buffer conjugated with 50 µL of propidium iodide diluted 2:100 in binding buffer for 10 minutes at room temperature. After the incubation period, the cells were washed again with the binding buffer and all wells were photographed under an Olympus IX81 epifluorescence inverted microscope, at a 100X magnification. Were photographed and counted 4 fields per well and the data are expressed as the number of cells in the process of apoptosis or necrosis per field.

### 3.3.8. *Mitotic index*

Cells ( $6 \times 10^4$  cells/mL) were seeded in 24 well plates containing poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, USA) at 10 µg/mL and were maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24h . To perform the mitotic index, we followed the protocol described by Zhou and collaborators with some modifications [39]. After exposure to combined treatments, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (w/v) for 15 minutes and permeabilized with PBS / 0.3% Triton X-100 for another 15 minutes. Cells were washed with PBS and incubated for 3 minutes with DAPI (1:10.000). After incubation, the cells were washed again with PBS and the analysis was performed through observation of the slides under a fluorescence microscope (Olympus BX51, Olympus DP72 camera) and were photographed and counted 5 fields per well. The data are

expressed as mitotic index, where the number of cells in mitosis was divided by the total number of cells.

### **3.3.9. Determination of intracellular reactive oxygen species (ROS) levels**

Intracellular ROS levels were evaluated 3, 6 and 24h after exposure of cells to interaction treatments. Cells ( $6 \times 10^4$  cells/mL) were seeded in 24 well plates and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24h. ROS levels were assessed using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA, Sigma-Aldrich, USA). Fluorescence was determined over 90 min at 37 °C in a fluorimeter (Victor 2, Perkin Elmer) with excitation wavelength of 485 nm and emission of 520 nm. The cytosolic ROS levels were calculated as the fluorescence area over 90 min and the data are expressed as fluorescence units FU/min.

### **3.3.10. Cell migration assay**

Cells ( $6 \times 10^4$  cells/mL) were seeded in 24 well plates and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24h. To perform the cell migration assay, after treatments the medium was removed and the cells were washed with PBS. Then, 500 µL of medium without FBS was added to each well and a slit was made in the monolayer of cell walls [14]. Immediately and 24h after the slit was made, all wells were photographed under an Olympus IX81 epifluorescence inverted microscope, at a 40X magnification. Cells that migrated into the slit were quantified using the ImageJ software. Were photographed and counted 3 fields per well and the data were expressed as percent slit closure.

### **3.3.11. P-glycoprotein activity analysis**

Cells ( $6 \times 10^4$  cells/ml) were seeded in 24-well plates and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24h. To analyze the activity of P-gp, we used fluorescent rhodamine (Rho 123) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). After 24h of exposure to the treatments, cells were trypsinized, centrifuged (1600 rpm for 5 min) and washed with PBS and fresh medium containing 300 ng/ml Rho 123 was added. Cells were incubated for 30 min at 37 °C in the atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>, washed once in PBS and allowed to extrude the dye in dye-free medium for a further 30 min at 37 ° C. These incubations were performed in the presence or absence of Verapamil P-gp inhibitor (VP; 30 μM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). The groups were divided into control, control+Rho, VP, VP+Rho, TMZ, TMZ+Rho, IR-A, IR-A+Rho, IR-A+TMZ and IR-A+TMZ+ Rho. Finally, the cells were washed once and suspended in PBS for reading in fluorimeter (Filter Marx F5, Molecular Devices, USA) with wavelength of 485/590 (excitation/emission). Data were expressed as intracellular fluorescence of Rho 123.

### **3.3.12. Statistical analyses**

All data are expressed as mean ± standard error and were submitted to one-way variance analysis (ANOVA) followed by Tukey-Kramer post-test for multiple comparisons. Differences between means were considered significant when  $p < 0.05$ .

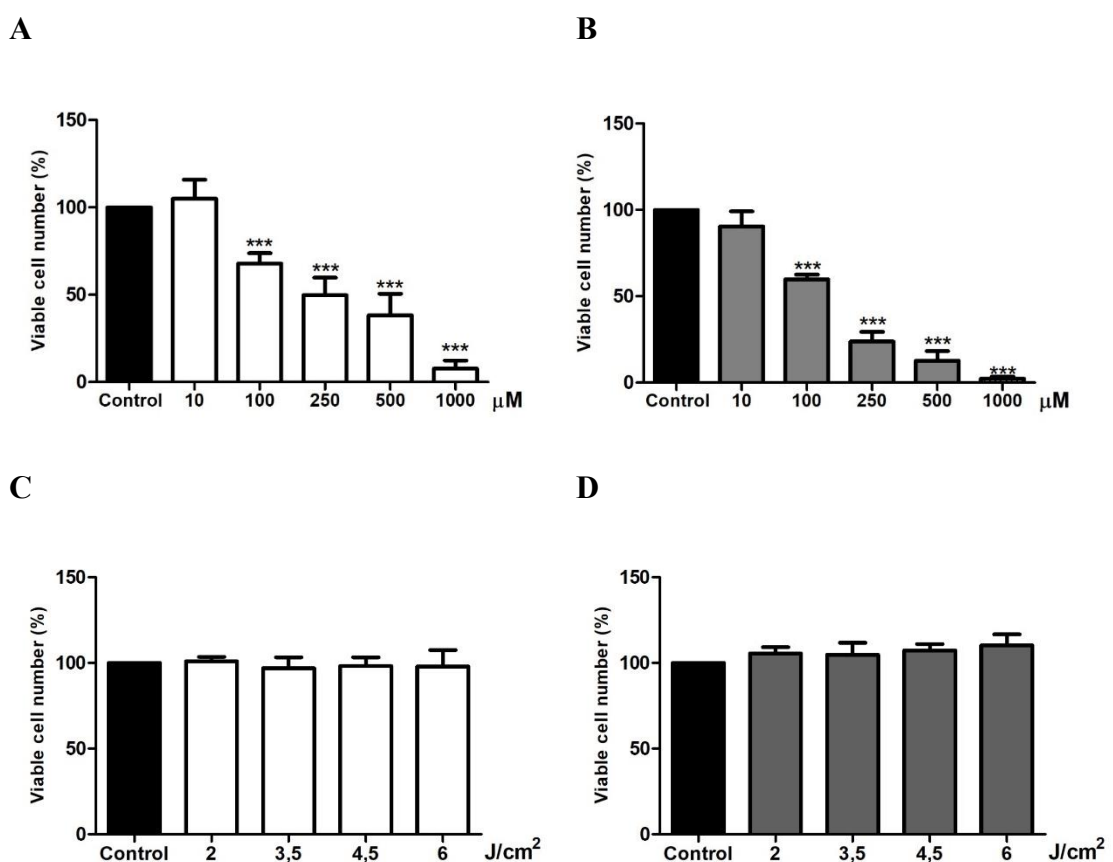
### **3.4. Theory**

The authors suppose that athermal IR-A optimizes the effect of TMZ when both interacting in C6 cell line.

### **3.5. Results**

### 3.5.1. Cell viability after treatments with TMZ and IR-A

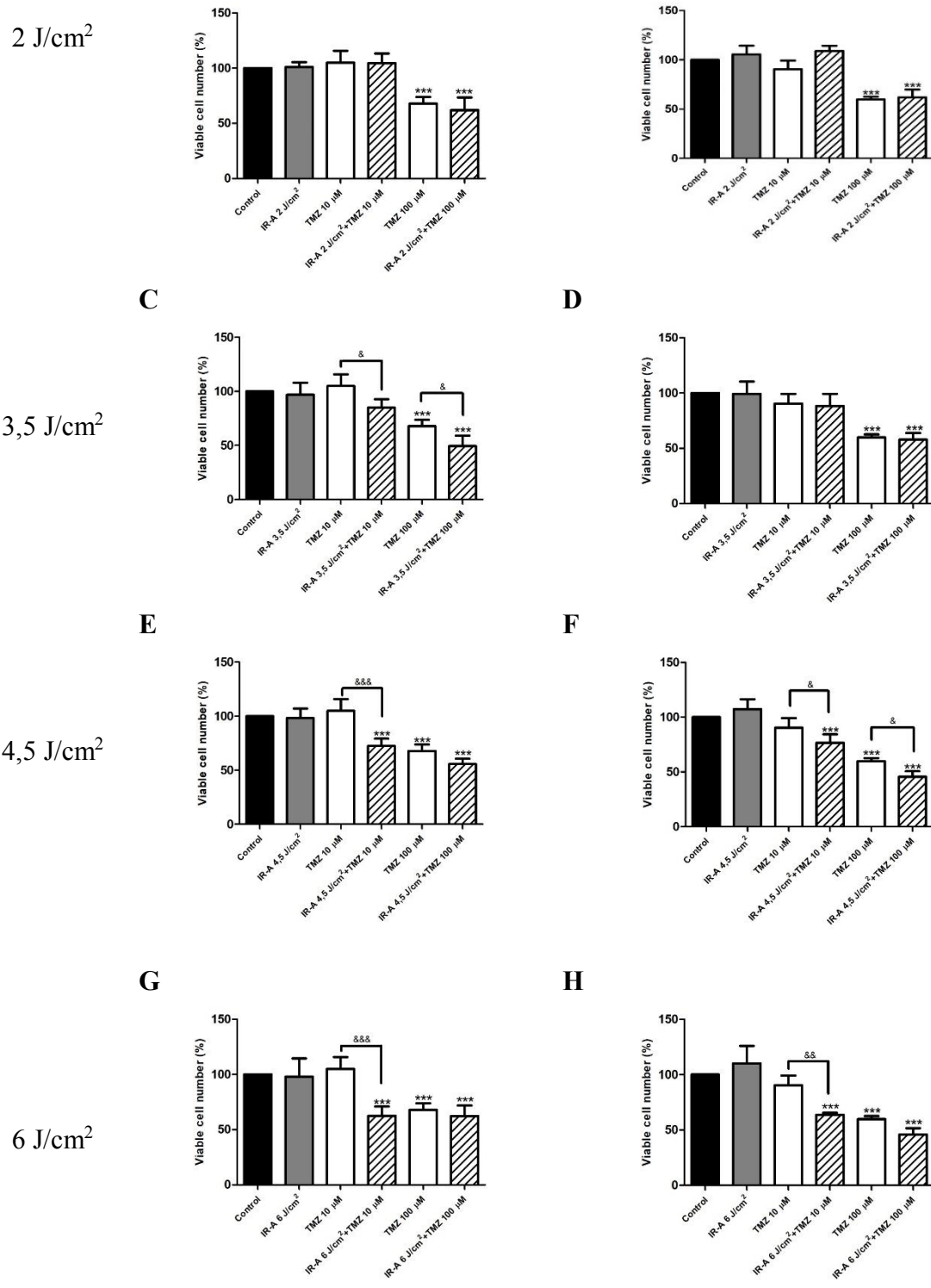
After 24 and 48h of treatments with TMZ, IR-A or both, the cell viability assay was confirmed by trypan blue exclusion. Results from the TMZ treatments show that there is a significant decrease in the number of viable cells to concentration higher than 100  $\mu\text{M}$  in both 24h and 48h. In addition, we observed that responses to TMZ treatments are concentration-dependent (**Fig. 1A and 1B**). Cells treatment with IR-A at the chosen doses neither decrease the number of viable cells in 24h nor in 48h (**Fig. 1C and 1D**).



**Figure 1:** Cell viability assay with trypan blue exclusion in the C6 cell line after 24h (white bars) and 48h (gray bars) of TMZ treatment at the concentrations of 10, 100, 250, 500 and 1000  $\mu\text{M}$  (A and B) and after exposure to IR-A at a dose of 2, 3.5, 4.5 and 6  $\text{J}/\text{cm}^2$  (C and D).  $n = 12$  wells, ANOVA followed by Tukey-Kramer test. \*\*\*  $p < 0.001$  (difference in relation to the control of each treatment).

Cell viability results for the interaction assays between TMZ at 10 or 100  $\mu\text{M}$  and IR-A at 2  $\text{J}/\text{cm}^2$  did not show significant differences at 24 or 48h. (**Fig. 2A and 2B**). The results for

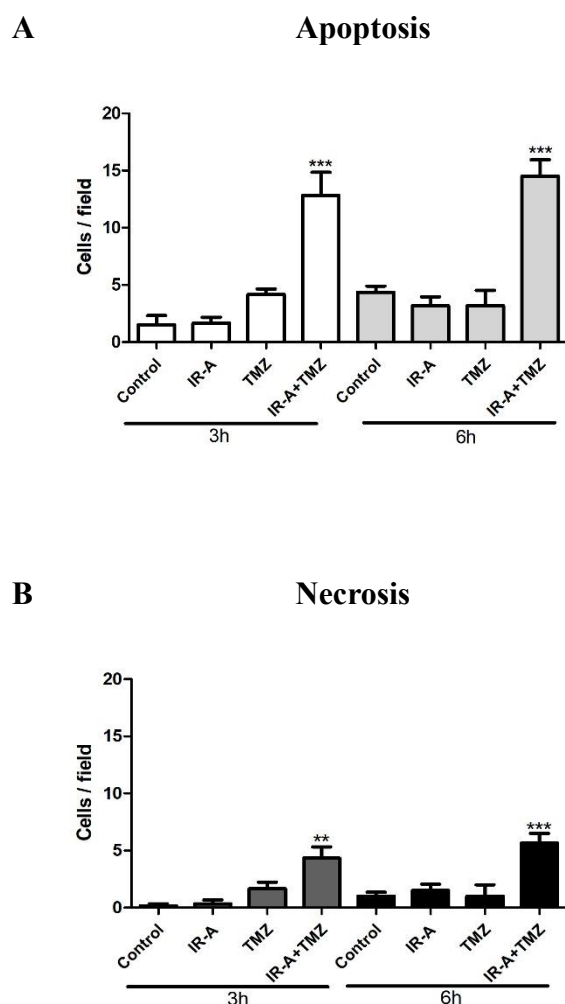




**Figure 2:** Cell viability assay with trypan blue exclusion in the C6 cell line after 24h and 48h of combined treatment of TMZ at the concentrations of 10  $\mu$ M or 100  $\mu$ M with exposure at IR-A at a dose of 2 J/cm<sup>2</sup> (A and B), 3.5 J/cm<sup>2</sup> (C and D), 4.5 J/cm<sup>2</sup> (E and F) and 6 J/cm<sup>2</sup> (G and H). n = 12 wells, ANOVA followed by Tukey-Kramer test. \*\*\* p < 0.001 (difference in relation to the control of each treatment), & p < 0.05, && p < 0.01 and &&& p < 0.001 (Differences comparing independent groups and interaction between treatments).

**3.5.2. Cell death from apoptosis or necrosis**

The assay for analysis of cell death by apoptosis or necrosis was performed 3 and 6h after IR-A, TMZ or IR-A + TMZ treatments. Our results show that the IR-A or TMZ-treated groups do not induce apoptosis or necrosis in cell death compared to the control group at the two times analyzed. However, when there is interaction between treatments, we observed a significant increase in the number of apoptotic cells 3 and 6h after exposure. In addition, even in a lesser proportion to apoptotic cells, we also observed an increase in the number of necrotic cells, 3 and 6h after the treatment (**Fig. 3A and 3B**). These results suggest that the treatment with IR-A + TMZ has a cytotoxic potential by inducing cell death.

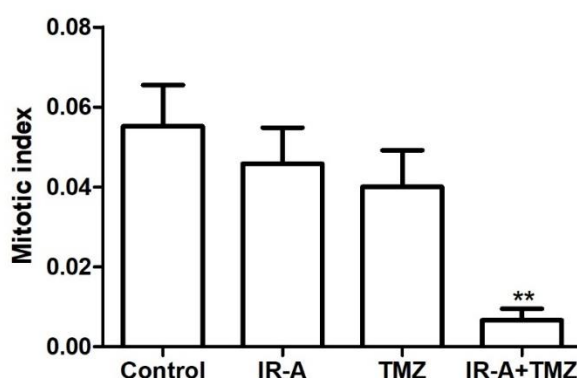


**Figure 3:** Apoptosis and necrosis assay in the C6 cell line 3 and 6h after treatment with TMZ 10  $\mu$ M, exposure to IR-A 4.5 J/cm<sup>2</sup> and IR-A+TMZ. n = 6 wells, ANOVA followed by Tukey-Kramer test. \*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001 (difference in relation to the control of each treatment)

### 3.5.3. Mitotic index



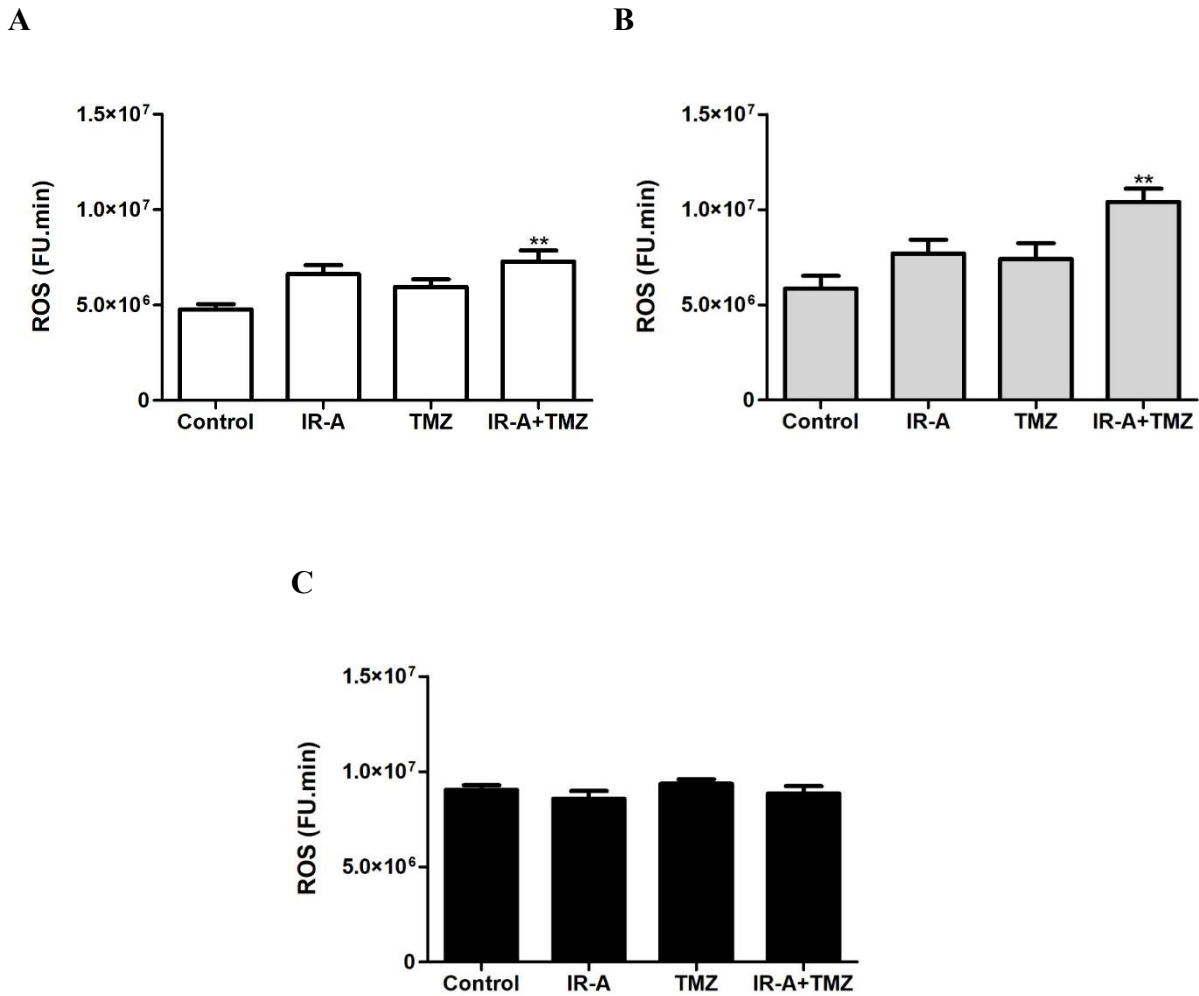
After 24h of treatments with IR-A, TMZ and IR-A+TMZ, cell proliferation was analyzed by mitotic index. Our results show that treatments with IR-A or TMZ did not present decreased in the cell proliferation in relation to the control group. However, there was a significant decrease in 88% in the mitotic index after interaction between treatments, suggesting the cytostatic potential of the combination between IR-A and TMZ, decreasing rates of cell proliferation (**Fig. 4**).



**Figure 4:** Analysis of mitotic index 24h after exposure to treatments with IR-A 4.5 J/cm<sup>2</sup>, TMZ 10  $\mu$ M and IR-A+TMZ in the C6 cell line. n = 8 wells, ANOVA followed by Tukey-Kramer. \*\* p <0.01 (difference in relation to the control group).

#### 3.5.4. ROS levels measurement

ROS levels were measured 3, 6 and 24h after treatments with IR-A, TMZ and IR-A+TMZ. Our results show that IR-A or TMZ alone did not induce significant ROS levels increase when compared to control. However, when there is interaction between IR-A and TMZ at 3 and 6h after treatment, we observed a significant increase of 52.62% and 77.95%, respectively, in intracellular ROS levels, indicating that the interaction between treatments is able to generate a greater level of ROS. Furthermore, intracellular ROS levels return to the normal state after 24h, showing no differences in relation to the control group (**Fig. 5A, 5B and 5C**).



**Figure 5:** Intracellular analysis of ROS levels 3h (A), 6h (B) and 24h (C) after exposure to treatments IR-A 4.5 J/cm<sup>2</sup>, TMZ 10 μM and IR-A+TMZ in the C6 cell line. n = 8 wells, ANOVA followed by Tukey-Kramer test. \*\* p < 0.01 (difference in relation to the control group).

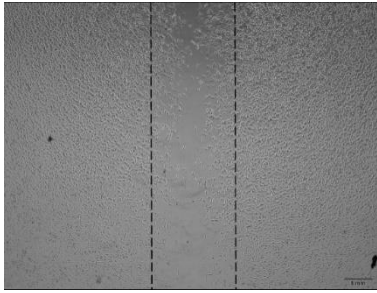
### 3.5.5. Cell migration analyses

The cell migration assay was performed 24h after treatment with IR-A, TMZ or IR-A+TMZ. Our results indicate that there were no significant differences in the cellular migration process in the IR-A or TMZ treatments in relation to the control group. However, when cells were exposed to IR-A+TMZ, the interaction between treatments was effective and showed a significant decrease of 53.7% in the cell migration process (**Fig. 6A e 6B**).

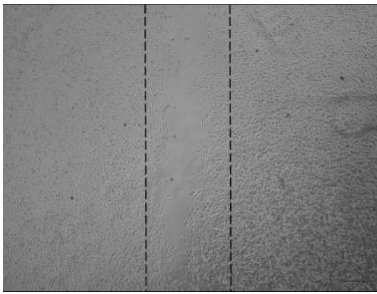
**A**



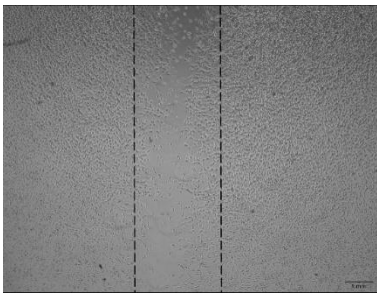
**Control 0h**



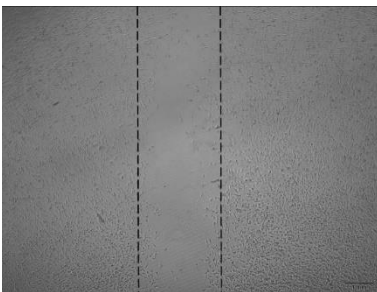
**Control 24h**



**IR-A**

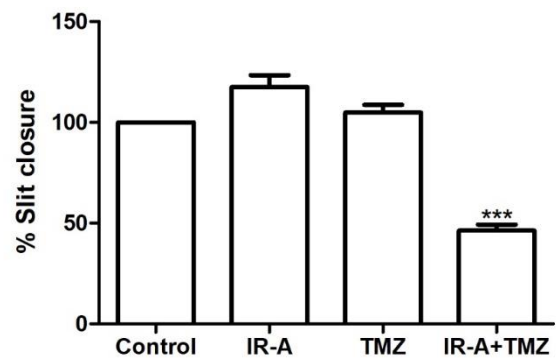


**TMZ**



**IR-A+TMZ**

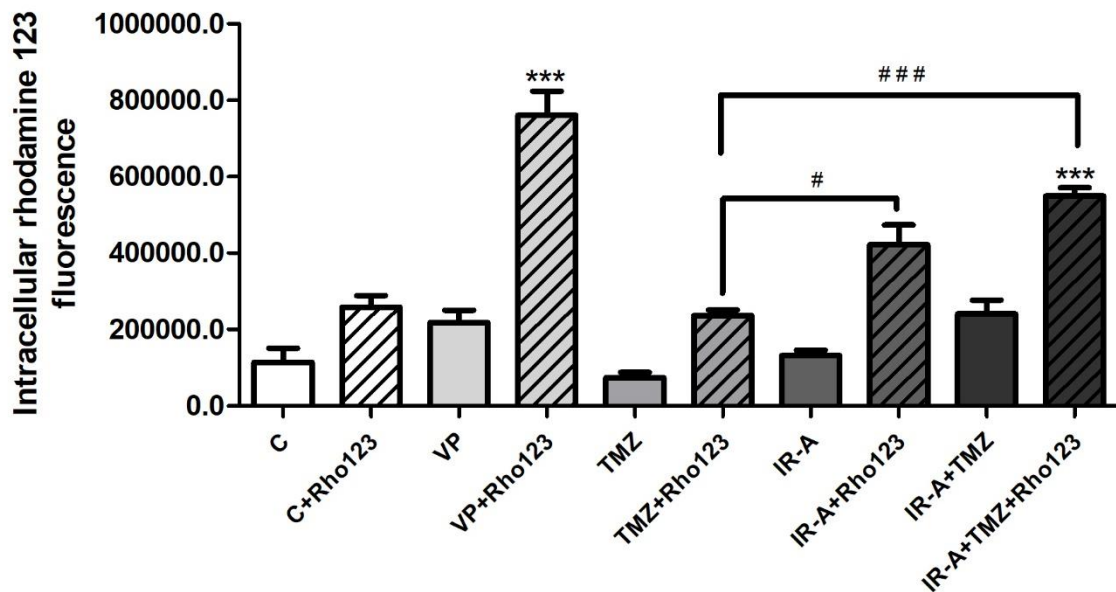
**B**



**Figure 6:** Representative images (6A) and quantification of the %-slit closure (6B) of the cell migration assay 24h after exposure to treatments IR-A 4.5 J/cm<sup>2</sup>, TMZ 10 μM and IR-A+TMZ in the C6 cell line. n = 8 wells, ANOVA followed by Tukey-Kramer test. \*\*\* p <0.001 (difference in relation to the control group).

### 3.5.6. *P-glycoprotein activity*

The activity of the ABCB1 / P-gp transporter was evaluated by extrusion of the Rho 123 dye after 24h of exposure to IR-A, TMZ or IR-A + TMZ (**Fig. 7**). The control group receiving treatment with Rho 123 (C + Rho 123) was able to extrude it out of the cell, showing the activity of P-gp when compared to the control group without the dye. The use of the Verapamil (VP) blocker was efficient, since there was a significant increase in the fluorescence of this group (VP + Rho 123) in relation to the group that received Rho 123 without the blocker (C + Rho 123), indicating that there the efflux of the dye outside the cell in the presence of VP is impaired. TMZ or IR-A treatments showed no significant increase in fluorescence over the C + Rho 123 group, indicating that treatments separately were not able to decrease P-gp activity, and Rho 123 was extruded out cell. However, when the treatments were administered simultaneously, we observed a significant increase in the fluorescence of this group (IR-A + TMZ + Rho 123) in relation to the C + Rho 123 group, indicating that the combination of treatments was able to decrease the activity of P-gp and Rho 123 was not extruded out of the cell. In addition, we also observed that there is a tendency of the IR-A + Rho 123 group to decrease P-gp activity, since this treatment was statistically different from the TMZ + Rho 123 group but not from the control group.



**Figure 7:** P-glycoprotein activity 24h after exposure to treatments IR-A 4.5 J/cm<sup>2</sup>, TMZ 10 μM and IR-A+TMZ in the C6 cell line. n = 8 wells, ANOVA followed by Tukey-Kramer test. \*\*\* p <0.001 (difference in relation to the control+Rho123 group), # p<0.05 and ### p<0.001 (differences between treatments with Rho 123).

### 3.6. Discussion

The present study investigated the effects of the interaction between TMZ and IR-A on glioblastoma cells. First, the action of TMZ and IR-A was evaluated separately, and our results showed that TMZ decreased significantly cell viability in concentrations higher than 100 μM, with IR-A showing no cytotoxic effects on the tested doses. To perform further experiments, we chose the interaction between 10 μM TMZ and 4.5 J/cm<sup>2</sup> of IR-A, which showed better results in the cell viability assay, since the interaction of IR-A with low concentrations of TMZ already presents significant results in 24h after exposure. Posteriorly, the results obtained in the interaction experiments showed to be very promising for future research, since cytotoxic and cytostatic effects were observed, in addition to a significant increase in the intracellular ROS levels and a decrease in the cellular migration process.

With the prospect of finding effective treatments for patients with glioblastoma through less invasive strategies and without extreme side effects, many studies propose the investigation of PDT as an alternative for the treatment of the disease [20,21,23,40,41], which justifies the search for new molecules that serve as PS and a source of radiation pable to optimizing the effect of such molecule. However, few studies have attempted to investigate whether TMZ could serve as a photosensitive molecule for exposure to a particular radiation, especially to IR-A, considered an athermic source of radiation, highly energetic and with a recognized transcranial penetrance [29,32]. Therefore, in our experiments, we investigated the interaction and possible photodynamic action of TMZ with IR-A in a glioblastoma cell line.

In this study, we attempted to explain the decrease in the number of viable cells observed by the trypan blue exclusion assay through the interaction between IR-A and TMZ, since these two factors were not cytotoxic separately in the dose and concentration chosen, respectively. TMZ is an alkylating agent that causes adducts in the DNA preventing the division and proliferation of tumor cells [13]. In relation to IR-A, the main mechanism of action is the generation of ROS, caused by the imbalance in the electron flow in the mitochondrial electron transport chain, leading to secondary mechanisms of action that target biomolecules and some cellular structures such as lipids , proteins and also DNA, causing the oxidation of these biomolecules, leading to cell death [42,43]. However, to our knowledge, nothing is described about the possible mechanisms that lead to cell death when there is interaction of TMZ and IR-A.

One of the possible explanations for the decrease in the number of viable cells could be that both TMZ and IR-A treatments lead to some kind of DNA damage, directly or indirectly, either by methylation in the nitrogenous bases or by the generation of ROS. Thus, TMZ and IR-A, even at non-cytotoxic concentration and dose, when interacting, could lead to an improvement in the double-strand breakage as well as a suppression of the DNA repair

pathways after exposure to the combination treatments. Chakravarti *et al.* previously described these mechanisms under the interaction of TMZ with a source of ionizing radiation (6 Gy) in four primary models of human glioblastoma [40]. In addition, Miki *et al.* also report a significant decrease in cell viability and increased DNA fragmentation in T98G and U251 glioblastoma cells following concomitant treatment of TPD (laser  $\lambda = 664$  nm; PS: sodium talporphyrin) and TMZ, and in the assays using TMZ as an adjuvant, that is, administered after irradiation, did not obtain significant results [22]. Thus, we believe that the interaction between TMZ and IR-A causes total DNA damage by the generation of ROS and methylation of the nitrogenous bases, rendering the repair system ineffective by excision and reinsertion of bases and, consequently, leading to cell death.

Glioblastoma cells present a high degree of cell division, uncontrolled proliferation and high capacity to invade healthy brain tissue [3,4]. Once induction of cell death generated by the exposure of cancer cells to PDT has been shown, mainly through the generation of ROS, many aspects must be taken into account, such as DNA damage, cell growth arrest, mitochondrial damage and the release of cytochrome *C* [44]. These characteristics serve as an alternative pathway for the use of this therapy in the treatment of malignant brain tumors. However, further research on the use of IR-A in the treatment of glioblastoma is necessary, especially on its interaction with TMZ.

The two most studied types of cell death, apoptosis and necrosis, are also recognized because of the exposure of tumor cells to PDT [45]. Our results showed that the combined treatments between TMZ and IR-A led to an increase in the number of apoptotic cells, both at 3 and 6 h after exposure, in addition to a significant increase of necrotic cells, although in lower extent than apoptotic death cells. This phenomenon is a consequence of the association between TMZ and IR-A, since the independent treatments did not induce apoptosis or necrosis. These results are supported by the hypothesis that a lower dose of PDT (2.5 - 3.5 J/cm<sup>2</sup>) induces

apoptosis, while, proportionally, higher doses ( $> 6 \text{ J/cm}^2$ ) lead to cell death by necrosis in adenocarcinoma cells epidermoid and melanoma exposed to radiation with wavelengths between 600-670 nm and doses between 2-50  $\text{J/cm}^2$  [46,47]. Activation of caspases is a biological marker characteristic of the apoptosis process [48], and concomitant administration of TMZ and laser at 664 nm wavelength has shown a significant increase in caspase-3 activation in human glioblastoma cells [22]. Thus, our results indicate there is a relationship between the doses of PDT, PS and type of cell death. Radiation source used in our study had a peak of intensity of approximately 880 nm and dose of  $4.5 \text{ J/cm}^2$ , thus confirming the induction of cell death mainly by apoptosis observed in our results.

However, the use of lasers in the treatment of cancer as a source of radiation for PDT has certain disadvantages, which has been reported by Muragaki *et al.* in clinical studies with patients diagnosed with glioblastoma. The presence of skin rashes, blisters and erythema were some of the consequences reported by the authors, since the radiation used is capable of generating heat and causing damage to healthy tissues. However, the observed damages disappeared within 15 days after administration of the therapy [49]. Thus, we believe that the use of IR-A may serve as an alternative to PDT, since there are no reports of side effects of the use of this radiation related to temperature and damage generated in healthy tissues.

Death and the decrease of cell proliferation are two characteristics enable to a great success in cancer treatment. In our results, we observed a cytotoxic potential of the combination of TMZ and IR-A by the apoptosis and necrosis assay. In addition to these findings, we also observed a cytostatic potential when we combined TMZ with IR-A, which was confirmed by the decrease in the mitotic index of glioblastoma cells, characterizing a lower rate of cell proliferation. Zhang *et al.* reported their *in vivo* experiments a significant decrease in tumor volume in mice implanted with glioblastoma cells and treated with PDT (laser  $\lambda = 630 \text{ nm}$ ; PS: hematoporphyrin monomethyl ether) in combination with TMZ [41]. These data are in



accordance to our results of cell proliferation, since the proliferation and dispersion in the cerebral parenchyma characterize the malignancy of these tumors. However, the radiation source and the photosensitizer used are not comparable to our study, since the source of radiation used was a laser with the capacity to generate heat, besides not being in the infrared spectrum.

The ability of IR-A to generate ROS was previously reported [32]. However, in our results, we did not observe a significant increase in intracellular levels of ROS in treatments with TMZ or IR-A alone, only when there was interaction 3 and 6h after treatments. Miki *et al.* previously reported an increase in intracellular levels of ROS after PDT in combination with TMZ. However, it was a 664 nm laser radiation source and the use of a PS (talaporfin sodium) administered together with TMZ. Thus, as described in the literature, when there is an association between sources of radiation, be it thermal, and TMZ, there is a significant increase in the intracellular levels of ROS, similar results have not been observed without interaction between the treatments [22].

One of the main targets of TMZ is the methylation of guanine at the O<sup>6</sup> position, attributing the cytotoxic potential by preventing cell division [50]. ROS is known to cause damage to guanine, since among the four nitrogenous bases, it is the one presents easiest oxidation by ROS, since it has the lowest redox potential [51,52]. The product of such a reaction is 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), one of the most abundant lesions related to this phenomenon and, as a consequence, leads to several pathways that impede cellular homeostasis [53]. In this context, DNA damage generated by IR-A and TMZ preferentially target guanine, thus, the simultaneous administration of IR-A and TMZ may be attributed to decreased cell proliferation, induction of apoptosis and increased intracellular levels of ROS observed in our study, which may serve as a new modality of combined therapy for glioblastoma.

Glioblastoma metastasis rarely occurs outside the CNS, thus, the leading cause of death in patients with glioblastoma is related to the high rates of tumor invasion within the cerebral parenchyma [54,55]. With the justification of diminishing the dispersion and the capacity of tissue invasion, we performed the cell migration assay. The results show a decrease in the migratory capacity of cells only when TMZ is administered simultaneously to the IR-A. Stepanenko et al. analyzed the effects of TMZ on the migration process of glioblastoma cells U251, T98G and C6, and TMZ was able to significantly decrease the migration capacity in all the cell lines used [14]. In addition, Hong *et al.* analyzed the migration process in the U251 and U87 cell lines after treatment with PDT (laser  $\lambda = 632$  nm; PS: photofrin) and a decrease in migratory capacity was observed in both cell lines [56]. However, we did not find data associating TMZ with PDT, in particular with IR-A, in cell migration analyzes. Our results suggest that the interaction between the treatments presents the capacity to decrease the cellular migration process, serving as a basis for new investigations in tissue dispersion and invasion capacity.

TMZ is a small lipophilic molecule able to cross the BBB [15] however, the resistance acquired after the cycles of therapy is a consequence of treatment failure [57]. The expression and activity of these proteins characterize the MDR phenotype and are responsible for the lack of success in the chemotherapeutic treatments [12]. When evaluating the activity of P-gp 24h after treatments with IR-A + TMZ, our results show a decrease in transporter activity, a response that was not observed when the treatments were administered separately.

Horne and collaborators reported PDT as a therapy to circumvent the MDR phenomenon by two main pathways: decreasing efflux activity of the drugs from within the cell or by not recognizing PS for its removal. In addition, Zhang and collaborators showed that PDT (laser  $\lambda = 630$  nm; PS: hematoporphyrin monomethyl ether) in combination with TMZ is able to decrease P-gp expression in both endothelial cells composing BBB and in glioma cells,

resulting in an increased accumulation of TMZ in tumor tissue [41]. However, no study sought to investigate the possible action of IR-A on the activity and expression of P-gp, in addition to the possible mechanisms that lead to interacting with TMZ.

After a cycle of PDT, a series of proteins respond to the stress generated by the therapy and, among them, the JNK (c-Jun N-terminal kinase) is outstanding. JNKs are members of the family of cell-kinase activated proteins kinases, such as radiation and unbalanced redox state [58,59]. After activation, these proteins migrate to the nucleus and regulate the activity of a number of transcription factors involved in growth, differentiation, survival and cell death [60]. Thus, the activated JNK pathway acts primarily at the level of messenger ARN of the *mdr1* gene, which encodes P-gp, inhibiting its expression and resulting in suppression of the MDR phenomenon [61].

In conclusion, the present study showed an interaction between TMZ and IR-A that, alone, have no effect on a glioblastoma cell line. When interact, they decrease the number of viable cell and proliferation, induce cell death mainly by apoptosis, increase intracellular ROS levels, decrease the cellular migration process and decrease activity of P-gp. The responses generated by this interaction are very promising for future preclinical research, and this combination could be an alternative photodynamic therapy for the treatment of glioblastoma.

### **Acknowledgments**

The authors thank PROAP / FURG for funding the maintenance of the laboratory. The authors also thank Marcio Oliveira for the laboratory support.

### 3.7. Bibliographic references

- [1] Porter KR, McCarthy BJ, Freels S, Kim Y, Davis FG (2010) Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. **Neuro Oncol** 12(6):520–527. Doi: 10.1093/neuonc/nop066
- [2] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues A (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol** 114:97–109. Doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
- [3] Dolecek TA, Propp Jm, Stroup NE, Kruchko C (2012) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. **Neuro Oncol** 14:1–49. Doi: 10.1093/neuonc/nos218
- [4] Bryukhovetskiy IS, Mischenko PV, Tolok EV, Zaitcev SV, Khotimchenko YS, Bryukhovetskiy AS (2015) Directional migration of adult hematopoietic progenitors to C6 glioma in vitro. **Oncol Lett** 9:1839-1844. Doi: 10.3892/ol.2015.2952
- [5] Smirnova ZS, Ermakova KV, Kubasova IY, Borisova LM, Kiselyova MP, Oborotova NA, Meerovich GA, Luk'yanets EA (2014) Experimental Study of Combined Therapy for Malignant Glioma. **Bull Exp Biol Med** 156(4):480-482. Doi: 10.1007/s10517-014-2379-2
- [6] Thöle M, Nobmann S, Huwyler J, Bartmann A, Fricker G (2012) Uptake of cationized albumin coupled liposomes by cultured porcine brain microvessel endothelial cells and intact brain capillaries. **J Drug Target** 10(7): 337–344. Doi: 10.1080/10611860290031840
- [7] Gottesman MM, Pastan I (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annu Rev Biochem** 62:385-427. Doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002125
- [8] Longley DB, Johnston PG (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. **J Pathol** 205: 275–292. Doi: 10.1002/path.1706
- [9] Sharom FJ (2014) Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function. **Front Oncol** 3;4: 41. Doi: 10.3389/fonc.2014.00041
- [10] Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. **Nat Rev Drug Discov** 5(3): 219-34. Doi: 10.1038 / nrd1984
- [11] Calatozzolo C, Gelati M, Ciusani E, Sciacca FL, Pollo B, Cajola L, Marras C, Silvani A, Vitellaro-Zuccarello L, Croci D, Boiardi A, Salmaggi A (2005) Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST- $\pi$  in human glioma. **J Neurooncol** 74: 113–121. Doi: 10.1007 / s11060-004-6152-7

- [12] Huber PC, Maruiama CH, Almeida WP (2010) Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Quim Nova** 33 (10): 2148-2154. Doi: 10.1590/S0100-40422010001000027
- [13] Villano JL, Seery TE, Bressler LR (2009) Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. **Cancer Chemother Pharmacol** 64(4): 647-55. Doi: 10.1007 / s00280-009-1050-5
- [14] Stepanenko AA, Andreieva SV, Korets KV, Mykytenko DO, Baklaushev VP, Huleyuk NL, Kovalova OA, Kotsarenko KV, Chekhonin VP, Vassetzky YS, Avdieiev SS, Dmitrenko VV (2016) Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells. **Cancer Cell Int** 16: 36. Doi: 10.1186/s12935-016-0311-8
- [15] Jihong Zhang J, Stevens MFG, Bradshaw TD (2012) Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Curr Mol Pharmacol** 5 (1): 102-14. Doi: 22122467
- [16] Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ (2009) The blood–brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. **J Neurochem** 111: 291–314. Doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06319.x
- [17] Omuro A, DeAngelis LM (2013) Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **JAMA**, 310:1842–1850. Doi: 10.1001 / jama.2013.280319
- [18] Bonneau S, Morliere P, Brault D (2004) Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution. **Biochem Pharmacol** 68(7): 1443-1452. Doi: 10.1016 / j.bcp.2004.06.014
- [19] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis Photodyn Ther** 1(4): 279–293. Doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4
- [20] Akimoto J (2016) Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors. **Neurol Med Chir** 56: 151–157. Doi:10.2176/nmc.ra.2015-0296
- [21] Bechet D, Mordon SR, Guillemin F, Barberi-Heyob MA (2014) Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies. **Cancer Treat Rev** 40 (2): 229-41. Doi: 10.1016 / j.ctrv.2012.07.004
- [22] Miki Y, Akimoto J, Omata H, Moritake K, Hiranuma M, Hironaka C, Fujiwara Y, Beppu M (2014) Concomitant treatment with temozolomide enhances apoptotic cell death in glioma cells induced by photodynamic therapy with talaporfin sodium. **Photodiagnosis Photodyn Ther** 11(4): 556-64. Doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.09.002

- [23] Vanaclocha V, Sureda M, Azinovic I, Rebollo J, Cañón R, Sapena NS, Cases FG, Brugarolas A (2015) Photodynamic therapy in the treatment of brain tumours. A feasibility study. **Photodiagnosis Photodyn Ther** 12(3): 422-7. Doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.05.007
- [24] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med** 352: 987–96. Doi: 10.1056 / NEJMoa043330
- [25] Yin AA, Zhang LH, Cheng JX, Dong Y, Liu BL, Han N, Zhang X (2013) Radiotherapy plus concurrent or sequential temozolomide for glioblastoma in the elderly: a meta-analysis. **PLoS One** 8 (9): e74242. Doi: 10.1371 / journal.pone.0074242
- [26] Vatansever F, Hamblin MR (2012) Far infrared radiation (FIR): its biological effects and medical applications. **Photonics Lasers Med** 1(4): 255–266. Doi:10.1515/plm-2012-0034
- [27] Schroeder P, Haendeler J, Krutmann J (2008) The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. **Exp Gerontol** 43(7): 629-32. Doi: 10.1016/j.exger.2008.04.010
- [28] Sommer AP, Pinheiro ALB, Mester AR, Franke RP, Whelan HT (2001) Biostimulatory Windows in Low-Intensity Laser Activation: Lasers, Scanners, and NASA's Light-Emitting Diode Array System. **J Clin Laser Med Surg** 19 (1): 29-33. Doi: 10.1089/104454701750066910
- [29] Karu T (2008) Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. **Photochem Photobiol** 84 (5): 1091-9. Doi: 10.1111 / j.1751-097.2008.00394.x
- [30] Chen ACH, Huang YY, Arany PR, Hamblin MR (2009) Role of Reactive Oxygen Species in Low Level Light Therapy. **The International Society for Optical Engineering** 7165, 716502. Doi: 10.1117/12.814890
- [31] Tsai SR, Hamblin MR (2017) Biological effects and medical applications of infrared radiation. **J Photochem Photobiol B** 170: 197-207. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014
- [32] Rojas JC, Gonzalez-Lima F (2013) Low-level light therapy of the eye and brain. **Eye Brain** 3: 49-67. Doi: 10.2147/EB.S21391
- [33] Sheppard AR, Swicord ML, Balzano Q (2008) Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. **Health Phys** 95(4): 365–96. Doi: 0.1097/01.HP.0000319903.20660.37
- [34] Tanaka Y, Matsuo K, Yuzuriha S, Yan H, Nakayama J (2010) Non-thermal cytotoxic effect of infrared irradiation on cultured cancer cells using specialized device. **Cancer Sci** 101(6): 1396-402. Doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01548.x

- [35] Obayashi T, Funasaka K, Ohno E, Miyahara R, Hirooka Y, Hamaguchi M, Goto H, Senga T (2015) Treatment with near-infrared radiation promotes apoptosis in pancreatic cancer cells. **Oncol Lett** 10(3): 1836-1840. Doi: 10.3892/ol.2015.3399
- [36] Tanaka Y, Tatewaki N, Nishida H, Eitsuka T, Ikekawa N, Nakayama J (2012) Non-thermal DNA damage of cancer cells using near-infrared irradiation. **Cancer Sci** 103(8): 1467-73. Doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02310.x
- [37] Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, Kane M, Whelan HT (2005) Photobiomodulation Directly Benefits Primary Neurons Functionally Inactivated by Toxins. **J Biol Chem** 280(6): 4761-71. Doi: 10.1074/jbc.M409650200
- [38] van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998) Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. **Cytometry** 31(1):1-9. Doi: 9450519
- [39] Zhou S, Abdouh M, Arena V, Arena M, Arena GO (2017) Reprogramming Malignant Cancer Cells toward a Benign Phenotype following Exposure to Human Embryonic Stem Cell Microenvironment. **PLoS One** 9;12(1): e0169899. Doi: 10.1371/journal.pone.0169899
- [40] Chakravarti A, Erkkinen MG, Nestler U, Stupp R, Mehta M, Aldape K, Gilbert MR, Black PM, Loeffler JS (2006) Temozolomide-Mediated Radiation Enhancement in Glioblastoma: A Report on Underlying Mechanisms. **Clin Cancer Res** 1;12(15): 4738-46. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0596
- [41] Zhang X, Guo M, Shen L, Hu S (2014) Combination of photodynamic therapy and temozolomide on glioma in a rat C6 glioma model. **Photodiagnosis Photodyn Ther** 11(4): 603-12. Doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.10.007
- [42] Passarella S, Karu T (2014) Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. **J Photochem Photobiol B** 140: 344-58. Doi: 10.1016/j.jphotobiol
- [43] Karu T (1999) Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B** 49: 1-17. Doi: 10.1016 / S1011-1344 (98) 00219-X
- [44] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis Photodyn Ther** 2(1): 1-23. Doi: 10.1016/S1572-1000(05)00030-X
- [45] Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochem Photobiol Sci** 1 (1): 1-21. Doi: 12659143

- [46] Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B, Hammerl P (2002) Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS4-PDT. **Photochem Photobiol Sci** 1(3):172-7. Doi: 12659513
- [47] Nagata S, Obana A, Gohto Y, Nakajima S (2003) Necrotic and Apoptotic Cell Death of Human Malignant Melanoma Cells Following Photodynamic Therapy Using an Amphiphilic Photosensitizer, ATX-S10(Na). **Lasers Surg Med** 33(1): 64-70. Doi: 10.1002/lsm.10190
- [48] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol** 15: 269-90. Doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.269
- [49] Muragaki Y, Akimoto J, Maruyama T, Iseki H, Ikuta S, Nitta H, Maebayashi K, Saito T, Okada Y, Kaneko S, Matsumura UM, Kuroiwa T, Karasawa K, Nakazato Y, Kayama T (2013) Phase II clinical study on intraoperative photo-dynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors. **J Neurosurg** 119:845-52. Doi: 10.3171 / 2013.7.JNS13415.
- [50] Moody CL, Wheelhouse RT (2014) The Medicinal Chemistry of Imidazotetrazine Prodrugs. **Pharmaceuticals** 7, 797-838; Doi: 10.3390/ph7070797
- [51] Steenken S, Jovanovic S (1997) How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. **J Am Chem Soc** 119 (3), pp 617–618. Doi: 10.1021/ja962255b
- [52] Zhou X, Wang Y, Si J, Zhou R, Gan L, Di C, Xie Y, Zhang H (2015) Laser controlled singlet oxygen generation in mitochondria to promote mitochondrial DNA replication *in vitro*. **Sci Rep** 18;5: 16925. Doi: 10.1038/srep16925.
- [53] Pan L, Zhu B, Hao W, Zeng X, Vlahopoulos SA, Hazra TK, Hegde ML, Radak Z, Bacsı A, Brasier AR, Ba X, Boldogh I (2016) Oxidized Guanine Base Lesions Function in 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1-mediated Epigenetic Regulation of Nuclear Factor kB-driven Gene Expression. **J Biol Chem** 2;291(49): 25553-25566. Doi: 10.1074/jbc.M116.751453
- [54] Lun M, Lok E, Gautam S, Wu E, Wong ET (2011) The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. **J Neurooncol** 105(2): 261-73. Doi: 10.1007/s11060-011-0575-8
- [55] Hamilton JD, Rapp M, Schneiderhan T, Sabel M, Hayman A, Scherer A, Kröpil P, Budach W, Gerber P, Kretschmar U, Prabhu S, Ginsberg LE, Bölke E, Matuschek C (2014) Glioblastoma Multiforme Metastasis Outside the CNS: Three Case Reports and Possible Mechanisms of Escape. **J Clin Oncol** 1;32(22): e80-4. Doi: 10.1200/JCO.2013.48.7546



- [56] Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, Zhang ZG, Zhang X, Zheng X, Jiang H, Chopp M (2009) Intracellular free calcium mediates glioma cell detachment and cytotoxicity after photodynamic therapy. **Lasers Med Sci** 24(5): 777-86. Doi: 10.1007/s10103-008-0640-5
- [57] Schaich M, Kestel L, Pfirrmann M, Robel K, Illmer T, Kramer M, Dill C, Ehninger G, Schackert G, Krex D (2009) A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. **Ann Oncol** 20(1): 175-81. Doi: 10.1093/annonc/mdn548
- [58] Dérijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: A Protein Kinase Stimulated by UV Light and Ha-Ras That Binds and Phosphorylates the c-Jun Activation Domain. **Cell** 76(6): 1025-37. Doi: 8137421
- [59] Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993) Identification of an oncoprotein and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. **Genes Dev** 7 (11): 2135-48. Doi: 8224842
- [60] Yan D, An G, Kuo MT (2016) C-Jun N-terminal kinase signalling pathway in response to cisplatin. **J Cell Mol Med** 20 (11): 2013-2019. Doi: 10.1111/jcmm.12908
- [61] Zhou J, Liu M, Aneja R, Chandra R, Lage H, Joshi HC (2006) Reversal of P-glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cells by the c-Jun NH2-terminal Kinase. **Cancer Res** 66 (1): 445-52. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1779

#### 4. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo buscou investigar os efeitos da interação entre a TMZ e a RI-A em células de glioblastoma. Primeiramente foi avaliada a ação da TMZ ou da RI-A, separadamente, na linhagem de estudo, e nossos resultados mostraram que a TMZ apresentou resultados significativos na diminuição de células viáveis a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$  em 24h, sendo que a RI-A não mostrou efeitos citotóxicos nas doses escolhidas, tanto em 24h quanto em 48h. Com isso, nós optamos por realizar um levantamento das respostas geradas pela combinação entre a TMZ nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  (não tóxica) e 100  $\mu\text{M}$  (primeira concentração a mostrar citotoxicidade) e a RI-A em todas as doses utilizadas para este estudo (2; 3,5; 4,5 e 6  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Para proceder os experimentos com interação, nós escolhemos 10  $\mu\text{M}$  de TMZ com 4,5  $\text{J}/\text{cm}^2$  de RI-A, a qual, durante os experimentos com interação, foi a menor dose que apresentou uma diminuição significativa no número de células viáveis, tanto em 24 quanto em 48h. Posteriormente, os resultados obtidos nos experimentos de interação entre a RI-A e a TMZ mostraram-se bastante promissores para futuras pesquisas, uma vez que foram observados efeitos citotóxico e citostático, além de um aumento significativo nos níveis intracelulares de ERO, uma diminuição no processo de migração celular e uma menor atividade da P-gp.

Com a perspectiva de encontrar tratamentos eficazes para pacientes com glioblastoma através de estratégias menos invasivas e sem efeitos colaterais graves, muitos estudos propõem a investigação da TFD como uma alternativa para o tratamento da doença (AKIMOTO, 2016; BECHET et al., 2014; CHAKRAVARTI et al., 2006; VANACLOCHA et al., 2015; ZHANG et al., 2014), o que justifica a busca por novas moléculas que sirvam como FS e uma fonte de radiação capaz de ser absorvida e otimizar o efeito de tal molécula. Contudo, nenhum estudo se propôs a investigar se a TMZ poderia servir como uma molécula fotossensível à exposição a determinada radiação, sobretudo à RI-A, considerada uma fonte atérmica de radiação,

altamente energética e com reconhecida penetrância transcraniana (KARU, 2008; ROJAS; GONZALEZ-LIMA, 2013). Portanto, em nossos experimentos, investigamos a interação e possível ação fotodinâmica da TMZ com a RI-A na linhagem C6, uma linhagem celular de glioblastoma.

Em relação à TMZ, nossos resultados mostraram-se significativos a partir da concentração de 100  $\mu\text{M}$ , 24 e 48h após o tratamento (**Figura 1A e 1B, pg. 42**). Ainda, o perfil de resposta das células ao tratamento mostrou-se dose-dependente, ou seja, com o aumento da concentração de TMZ, o número de células viáveis diminuiu proporcionalmente. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Barciszewska e colaboradores, onde células de glioma U138MG, U118MG, T98G e C6 foram tratadas com TMZ e apresentaram o mesmo perfil de resposta que os nossos resultados, onde a TMZ mostrou-se eficaz acima da concentração de 100  $\mu\text{M}$  (BARCISZEWSKA et al., 2015).

O ensaio de viabilidade celular realizado por exclusão com azul de tripan após a exposição à RI-A nas doses escolhidas (2; 3,5; 4,5 e 6  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) não mostrou diminuição no número de células viáveis tanto em 24h quanto em 48h após exposição (**Figura 1C e 1D, pg.42**). Alguns estudos relatam que a exposição à radiação com lasers de baixa potência no comprimento de onda do vermelho ou infravermelho próximo pode seguir duas vias: a de inibir a de estimular a proliferação celular (JIA; GUO, 2004; MOORE et al., 2005). Contudo, o verdadeiro mecanismo pelo qual a célula é inibida ou estimulada a proliferar ainda não é totalmente compreendido. Células de glioblastoma humano A-172 foram expostas à uma fonte de radiação pertencente a RI-A que emite radiação no comprimento de onda de 808 nm, ocasionando uma diminuição na proliferação e na viabilidade celular, mostrando um perfil dose-dependente da radiação (MURAYAMA *et al.*, 2012). Entretanto, as doses de radiação utilizadas pelos autores variaram entre 18 e 54  $\text{J}/\text{cm}^2$  e uma potência de 15  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , uma dose que diferenciou de 3 a 9 vezes a mais do que a máxima dose utilizada neste estudo com uma

potência 10 vezes maior. Além disso, Sroka e colaboradores (1999) demonstraram que as células de glioblastoma humano U373MG expostas à uma fonte de radiação de 805 nm e com doses entre 5 e 20 J/cm<sup>2</sup> apresentaram uma queda na taxa de proliferação celular, uma vez que os resultados obtidos também se mantiveram para a linhagem de câncer de mama MCF7 (SROKA *et al.*, 1999). Sendo assim, acreditamos que, com base nos nossos resultados e nos dados achados na literatura, a fonte de radiação, a dose, a potência e o tipo celular, são elementos que influenciam diretamente nas respostas geradas após a irradiação. Neste estudo, procuramos explicar a diminuição no número de células viáveis, observada pelo ensaio por exclusão com azul de tripan, através da interação entre a RI-A e a TMZ, uma vez que esses dois fatores não se mostraram citotóxicos separadamente na dose e concentração escolhidas, respectivamente (**Figura 2 A-H, pg. 44**). A TMZ é um agente de alquilação que causa adutos no DNA, impedindo a divisão e a proliferação das células tumorais (VILLANO; SEERY; BRESSLER, 2009). Em relação a RI-A, o principal mecanismo de ação é a geração de ERO, causada pelo desequilíbrio no fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, levando a mecanismos de ação secundários que possuem como alvo biomoléculas e algumas estruturas celulares, como lipídios, proteínas e também o DNA, ocasionando a oxidação dessas biomoléculas, levando a morte celular (KARU, 1999; PASSARELLA; KARU, 2014). Entretanto, pouco se sabe quais os possíveis mecanismos que levam à morte celular quando há a interação da TMZ com a RI-A.

Uma das possíveis explicações para a diminuição no número de células viáveis é que ambos os tratamentos utilizados, TMZ e RI-A, levam a algum tipo de dano no DNA, seja ele direto ou indireto, por metilação nas bases nitrogenadas ou pela geração de ERO. Sendo assim, TMZ e RI-A, mesmo em concentração e dose não citotóxicas, quando interagem, podem ocasionar um aprimoramento na quebra da fita dupla bem como uma supressão das vias de reparo do DNA após a exposição aos tratamentos combinados. Estes mecanismos foram

descritos anteriormente por Chakravarti e colaboradores sob a interação da TMZ com uma fonte de radiação ionizante (6 Gy) em 4 modelos primários de glioblastoma humanos (CHAKRAVARTI et al., 2006). Além disso, Miki e colaboradores também relatam uma diminuição significativa na viabilidade celular e um aumento na fragmentação do DNA em células de glioblastoma T98G e U251 após o tratamento concomitante de TFD (laser  $\lambda=664$  nm; FS: taloporfirina sódica) e TMZ, sendo que nos ensaios utilizando a TMZ como um adjuvante, ou seja, administrada após a irradiação, não obtiveram resultados significativos (MIKI et al., 2014).

Com isso, acreditamos que a interação entre a TMZ e a RI-A causa danos somatórios ao DNA, pela geração de ERO e metilação das bases nitrogenadas, tornando ineficiente o sistema de reparo por excisão e reinserção de bases, elevando o número de biomoléculas oxidadas pelas ERO e, conseqüentemente, levando a morte celular.

Células de glioblastoma apresentam um alto grau de divisão celular, proliferação descontrolada e alta capacidade de invadir o tecido cerebral saudável (BRYUKHOVETSKIY et al., 2015; DOLECEK et al., 2012). Uma vez reconhecida a indução da morte celular gerada pela exposição de células do câncer à TFD, principalmente através da geração de ERO, muitos aspectos devem ser levados em consideração, como os danos do DNA, parada do crescimento celular, danos mitocondriais e a liberação do citocromo C (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). Essas características servem como uma via alternativa para a utilização dessa terapia nos tratamentos de tumores cerebrais malignos. Entretanto, mais pesquisas sobre a utilização da RI-A no tratamento do glioblastoma tornam-se necessárias, principalmente sobre a sua interação com a TMZ.

Os dois principais tipos de morte celular, apoptose e necrose, também são reconhecidos como consequência da exposição de células tumorais à TFD (OLEINICK et al. 2002). Nossos resultados mostraram que os tratamentos combinados entre TMZ e RI-A levaram a um aumento

no número de células apoptóticas, tanto em 3 quanto em 6h após a exposição, além de um aumento significativo de células necróticas, mesmo que em menor proporção ao número de células apoptóticas (**Figura 3A e 3B, pg. 45**). Esse fenômeno é consequência da associação entre TMZ e RI-A, já que os tratamentos independentes não induziram morte celular por apoptose ou necrose. Esses resultados são suportados pela hipótese de que uma dose mais baixa de TFD (2,5 – 3,5 J/cm<sup>2</sup>) induz apoptose, enquanto que, proporcionalmente, doses mais elevadas (> 6 J/cm<sup>2</sup>) levam a morte celular por necrose em células de adenocarcinoma epidermoide e melanoma expostas a radiações com comprimento de onda entre 600-670 nm e doses entre 2-50 J/cm<sup>2</sup> (NAGATA et al., 2003; PLAETZER et al., 2002). Além disso, a ativação de caspases é um marcador biológico característico do processo de apoptose (BUDIARDJO et al., 1999), e a administração concomitante de TMZ e laser com comprimento de onda de 664 nm apresentou um aumento significativo na ativação de caspase-3 em células de glioblastoma humano (MIKI et al., 2014). Assim, nossos resultados indicam que há uma relação entre as doses de TFD, o FS e o tipo de morte celular, sendo que a fonte de radiação utilizada em nosso estudo apresentava um pico de intensidade de aproximadamente 880 nm com uma dose de 4,5 J/cm<sup>2</sup>, confirmando assim, a indução de morte celular principalmente por apoptose observada em nossos resultados.

Importante destacar que o uso de lasers no tratamento do câncer como uma fonte de radiação para TFD apresenta certas desvantagens, as quais foram reladas por Muragaki e colaboradores em estudos clínicos com pacientes diagnosticados com glioblastoma. A presença de erupções cutâneas, bolhas e eritema foram algumas consequências relatadas pelos autores, pois a radiação utilizada é capaz de gerar calor e causar danos aos tecidos saudáveis. Entretanto, os danos observados desapareceram dentro de 15 dias após a administração da terapia (MURAGAKI et al., 2013). Sendo assim, acreditamos que o uso da RI-A possa servir como

uma alternativa para a TFD, já que não há relatos de efeitos colaterais do uso dessa radiação relacionados à temperatura e aos danos gerados nos tecidos saudáveis.

A morte e a diminuição da proliferação celular são duas características que, juntas, possibilitam um maior sucesso no tratamento do câncer. Em nossos resultados, observamos um potencial citotóxico da combinação entre a TMZ e a RI-A através do ensaio de apoptose e necrose. Além disso, também observamos um potencial citostático quando combinamos TMZ com RI-A, o qual foi confirmado pela diminuição no índice mitótico das células de glioblastoma, caracterizando um menor índice de proliferação celular (**Figura 4, pg. 46**). Zhang e colaboradores (2014) reportaram em seus experimentos *in vivo* uma significativa diminuição do volume tumoral em ratos implantados com células de glioblastoma e tratados com TFD (laser  $\lambda=630$  nm; FS: Éter monometílico de hematoporfirina) em combinação com a TMZ (ZHANG et al., 2014). Esses dados podem ser comparados com nossos resultados de proliferação celular, visto que a proliferação e dispersão no parênquima cerebral caracterizam a malignidade desses tumores. Contudo, a fonte de radiação e o FS utilizados não se comparam ao nosso estudo, visto que a fonte de radiação utilizada era um laser com a capacidade de gerar calor, além de não estar no espectro do infravermelho.

A RI-A é absorvida por cromóforos presentes em estruturas celulares, principalmente o citocromo C, localizado na membrana interna das mitocôndrias, onde há a absorção da radiação e o início de uma série de reações que alteram o estado redox da célula e que, conseqüentemente, aumentam os níveis intracelulares de ERO (KARU, 1999; PASSARELLA; KARU, 2014). Em nossos resultados, não observamos um aumento significativo nos níveis intracelulares de ERO após exposição das células à RI-A e aos tratamentos com a TMZ, apenas quando houve a interação 3 e 6h após os tratamentos combinados (**Figura 5 A-C, pg. 47**). O aumento nos níveis intracelulares de ERO após TFD em combinação com TMZ foi relatada anteriormente por Miki e colaboradores (2014) ao administrar laser de 664 nm juntamente com o FS talaporfin de sódio

e a TMZ nas linhagens humanas de glioblastoma T98G e U251. Assim, de acordo com o descrito na literatura, quando há a associação entre uma fonte de radiação, seja ela térmica, e a TMZ, há um aumento significativo nos níveis intracelulares de ERO, resultados estes que não são observados quando não há a interação entre os tratamentos (MIKI et al., 2014).

Ainda em relação ao aumento nos níveis intracelulares de ERO após TFD, sabe-se que as células tumorais apresentam um comportamento de maior sensibilidade sob essas condições. Em um ciclo de TFD, as células tornam-se mais sensíveis e susceptíveis às ERO geradas pós terapia, sendo que há um aumento significativo dessas moléculas e que as células ultrapassam a sua capacidade de resistirem aos danos gerados pelas mesmas. Além disso, altos níveis de ERO também são reconhecidos por suprimir o sistema de defesa antioxidante enzimático por diminuir a síntese de enzimas antioxidantes. Esses fenômenos contribuem para a diminuição da proliferação e crescimento, ocasionando a morte celular (ABRAHIM; KANTHIMATHI; ABDUL-AZIZ, 2012; HILEMAN et al., 2004; WANG et al., 2011). As reações que ocorrem e o mecanismo de ação gerado pela interação entre a TMZ e a RI-A ainda não foram descritos. Contudo, por pertencer à família das imidazotetrazinas, a TMZ é classificada como um composto heterocíclico aromático bicíclico (MOODY; WHEELHOUSE, 2014). Compostos aromáticos possuem a capacidade de absorver radiação e, assim como ocorre em outros tipos de absorção de energia, as moléculas, ao absorverem a radiação infravermelha, iniciam uma série de reações fotoquímicas. Ao entrar em contato com uma fonte de radiação, elas atingem um estado de maior energia e, ao voltar ao seu estado normal, doam essa energia de excitação para um oxigênio molecular presente no meio, e assim, geram as ERO (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Um dos principais alvos da TMZ em seu mecanismo de ação é a metilação da guanina na posição O<sup>6</sup>, atribuindo-se o potencial citotóxico por impedir a divisão celular (MOODY; WHEELHOUSE, 2014). As ERO são conhecidas por gerar danos na guanina, uma vez que



dentre as quatro bases nitrogenadas, ela é quem apresenta uma maior facilidade de oxidação pelas ERO, pois apresenta o menor potencial redox (STEMP; BARTON, 1996; ZHOU et al., 2015). O produto de tal reação é a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), uma das lesões mais abundantes relacionadas a esse fenômeno que, como consequência, levam a diversas vias que impedem a homeostasia celular (PAN et al., 2016). Neste contexto, se relacionarmos os danos no DNA gerados pela RI-A e pela TMZ, ambos apresentam como alvo preferencialmente a guanina. Sendo assim, a administração simultânea da RI-A e TMZ pode no futuro servir como uma nova modalidade de terapia combinada para o glioblastoma.

Os quadros de metástase decorrente de glioblastoma raramente ocorrem fora do SNC, sendo que a principal causa de morte em pacientes com glioblastoma está relacionada com as altas taxas de invasão do tumor dentro do parênquima cerebral (HAMILTON et al., 2014; LUN et al., 2011). Com a justificativa de estudar a dispersão e a capacidade de invasão tecidual, nós realizamos o ensaio de migração celular. Os resultados mostram uma diminuição na capacidade migratória das células apenas quando a TMZ é administrada simultaneamente à RI-A (**Figura 6A e 6B, pg. 48**). Stepanenko e colaboradores analisaram os efeitos da TMZ no processo de migração das células de glioblastoma U251, T98G e C6, e a TMZ na concentração de 100  $\mu$ M foi capaz de diminuir significativamente a capacidade de migração em todas as linhagens utilizadas (STEPANENKO et al., 2016).

Além disso, Hong e colaboradores (2009) analisaram o processo de migração nas linhagens U251 e U87 após tratamento com TFD (laser  $\lambda=632$  nm; PS: photofrin) e observou-se uma diminuição na capacidade migratória em ambas as linhagens (HONG et al., 2009). Em suma, não encontramos na literatura dados que associem a TMZ com a TFD, em particular com a RI-A, nas análises de migração celular. Assim, os nossos resultados sugerem que a interação entre os tratamentos diminui o processo de migração celular, servindo como base para novas investigações na capacidade de dispersão e invasão tecidual.

A superexpressão de proteínas responsáveis pelo efluxo dos quimioterápicos é outra importante característica que deve ser levada em consideração quando trata-se de buscas de novas alternativas para o tratamento do câncer. A expressão e a atividade dessas proteínas caracterizam o fenótipo MDR e são responsáveis pela falta de sucesso nos tratamentos quimioterápicos (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010). A P-gp é uma das principais bombas de efluxo estudadas na questão de MDR, uma vez que essa proteína é encontrada tanto em células tumorais quanto em células não-tumorais e, tratando-se de SNC, ela também é expressa nas células endoteliais que compõem a BHE (KING et al., 2001). Ao avaliarmos a atividade da P-gp 24h após os tratamentos com RI-A+TMZ, nossos resultados mostram que há uma diminuição na atividade do transportador, resposta essa que não foi observada quando os tratamentos foram administrados separadamente (**Figura 7, pg. 50**).

A TMZ é uma pequena molécula lipofílica capaz de atravessar a BHE (ZHANG; FG STEVENS; D BRADSHAW, 2012), contudo, a resistência adquirida após os ciclos de terapia é uma consequência que resulta na falha do tratamento, uma vez que, em amostras de tecidos cerebrais de pacientes com glioblastoma que exibiram resistência à TMZ e recorrência tumoral, houve um aumento nos níveis de expressão da P-gp (SCHAICH et al., 2009). Assim, Horne e colaboradores (2009) relataram que a TFD é sugerida como uma terapia para contornar o fenômeno de MDR por duas principais vias: diminuindo a atividade do efluxo dos fármacos de dentro da célula ou pelo não reconhecimento do FS para a sua remoção.

O estudo de Zhang *et al.* (2014) mostra que a TFD (laser  $\lambda=630$  nm; PS: Éter monometílico de hematoporfirina) em associação com a TMZ é capaz de diminuir a expressão da P-gp tanto em células endoteliais que compõem a BHE quanto nas células de glioma, resultando em um maior acúmulo de TMZ no tecido tumoral (ZHANG et al., 2014). Contudo, nenhum estudo buscou investigar a possível ação da RI-A na atividade e expressão da P-gp, além dos possíveis mecanismos que ocorrem ao interagir com a TMZ.

O mecanismo de ação pelo qual a TFD interage com a P-gp e faz com que seus níveis de expressão e sua atividade sejam diminuídos não são completamente compreendidos. Entretanto, acredita-se que, após um ciclo de TFD, uma série de proteínas respondem ao estresse gerado pela terapia e, uma dessas proteínas é a JNK (c-Jun N-terminal kinase). As JNKs são membros da família de proteínas kinases ativadas por estresse celular, como por exemplo a radiação e o estado redox desbalanceado (DÉRIJARD et al., 1994; HIBI et al., 1993). Após serem ativadas, essas proteínas deslocam-se para o núcleo e regulam a atividade de uma série de fatores de transcrição envolvidos no crescimento, diferenciação, sobrevivência e morte celular (YAN; AN; KUO, 2016). Assim, a via JNK ativada atua principalmente a nível de RNA mensageiro do gene *mdr1*, o qual codifica a P-gp, inibindo a sua expressão e resultando na supressão do fenótipo de MDR (ZHOU et al., 2006).

Em conclusão, o presente estudo mostrou que há uma interação entre TMZ e a RI-A e que, separadamente, ambos os tratamentos, nas doses e concentrações escolhidas, não apresentam efeitos sobre uma linhagem celular de glioblastoma. Quando ocorre a interação entre os tratamentos, há uma diminuição na viabilidade e na proliferação celular, indução de morte celular principalmente por apoptose, aumento dos níveis intracelulares de ERO, diminuição do processo de migração celular e também diminuição da atividade da P-gp. As respostas geradas por esta interação são muito promissoras para futuras pesquisas pré-clínicas, e essa combinação pode ser uma terapia fotodinâmica alternativa para o tratamento do glioblastoma.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da associação entre o quimioterápico TMZ e a RI-A em uma linhagem de glioblastoma. Uma vez reconhecendo a gravidade e a dificuldade em encontrar tratamentos eficazes e menos invasivos para pacientes diagnosticados com glioblastoma, a TFD é uma alternativa de tratamento que é utilizada para diversos tipos de tumores, incluindo os tumores que se desenvolvem no SNC. Assim, o nosso trabalho buscou demonstrar se há alguma interação entre a TMZ, fármaco referência no tratamento do glioblastoma, e a RI-A, uma fonte de radiação com propriedades biológicas reconhecidas em seu uso na TFD. Observamos resultados significativos apenas quando houve a interação entre a TMZ e a RI-A, em concentração e dose não citotóxicas, respectivamente. Após a exposição aos tratamentos combinados, observamos tanto um efeito citotóxico quanto um efeito citostático. Ainda, houve um aumento significativo dos níveis intracelulares de ERO e a diminuição no processo de migração celular, além de uma menor atividade da P-gp após a interação entre TMZ e RI-A.

Assim, nossos resultados sugerem que há uma interação importante e positiva entre a TMZ e a RI-A, uma vez que em nenhuma das análises citadas acima, os tratamentos independentes mostraram resultados significativos. Sendo assim, este é o primeiro estudo que mostra a relação entre a TMZ e a RI-A como uma possível terapia fotodinâmica para tumores cerebrais malignos. Esperamos que mais pesquisas sob tal interação dos tratamentos e estudos pré-clínicos sejam realizadas, na incansável busca por um tratamento eficaz para essa patologia.

## 6. PERSPECTIVAS

A partir dos dados apresentados nessa dissertação e com a reconhecida interação entre a TMZ e a RI-A, algumas propostas são destacadas:

- Analisar, através de citometria de fluxo, a ação da interação entre TMZ e RI-A sobre as fases do ciclo celular;
- Analisar a atividade do transportador ABCC1/MRP1 após exposição de TMZ com interação com a RI-A;
- Analisar a atividade das enzimas antioxidantes GSH, GST, SOD e CAT após exposição de TMZ com interação com a RI-A;
- Analisar, através de imunocitoquímica, a quantidade/localização da proteína p53 após exposição à interação dos tratamentos;
- Analisar o dano de DNA pelo ensaio cometa após exposição à interação entre os tratamentos;
- Analisar os efeitos citotóxicos/citostáticos em linhagens celulares não-tumorais, após a exposição de TMZ e a interação com a RI-A;
- Analisar os efeitos da interação entre a TMZ e a RI-A em outros tipos tumorais com difícil prognóstico, como por exemplo em células de melanoma.

## 7. BIBLIOGRAFIA GERAL

ABC do câncer. Abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128. ISBN 978-85-7318-188-3 (versão eletrônica)

ABDO, A.; SAHIN, M. **NIR Light Penetration Depth in the Rat Peripheral Nerve and Brain Cortex.** IEEE, ago. 2007Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/4352642/>>. Acesso em: 18 jan. 2018

ABRAHIM, N. N.; KANTHIMATHI, M. S.; ABDUL-AZIZ, A. Piper betle shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 220, 2012.

AKIMOTO, J. Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 56, n. 4, p. 151–157, 2016.

BARCISZEWSKA, A.-M. et al. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0136669, 26 ago. 2015.

BECHET, D. et al. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 229–241, mar. 2014.

BEIER, D. et al. Efficacy of clinically relevant temozolomide dosing schemes in glioblastoma cancer stem cell lines. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 109, n. 1, p. 45–52, ago. 2012.

BIRBILIS, T. A. et al. Spinal metastasis of glioblastoma multiforme: an uncommon suspect? **Spine**, v. 35, n. 7, p. E264–E269, 2010.

BRYUKHOVETSKIY, I. S. et al. Directional migration of adult hematopoietic progenitors to C6 glioma in vitro. **Oncology Letters**, v. 9, n. 4, p. 1839–1844, abr. 2015.

BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 15, n. 1, p. 269–290, 1999.

CALATOZZOLO, C. et al. Expression of Drug Resistance Proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST- $\pi$  in Human Glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 74, n. 2, p. 113–121, set. 2005.

CARVEY, P. M.; HENDEY, B.; MONAHAN, A. J. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, n. 2, p. 291–314, out. 2009.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, dez. 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1–23, mar. 2005.

- CHAKRAVARTI, A. et al. Temozolomide-Mediated Radiation Enhancement in Glioblastoma: A Report on Underlying Mechanisms. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 15, p. 4738–4746, 1 ago. 2006.
- CHEN, A. C.-H. et al. **Role of reactive oxygen species in low level light therapy**. (M. R. Hamblin, R. W. Waynant, J. Anders, Eds.) 12 fev. 2009 Disponível em: <<http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.814890>>. Acesso em: 18 jan. 2018
- CHENG, Y. et al. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 42–57, fev. 2014.
- DECLÈVES, X. et al. ABC transporters and the accumulation of imatinib and its active metabolite CGP74588 in rat C6 glioma cells. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 3, p. 214–222, mar. 2008.
- DÉRIJARD, B. et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 1025–1037, 1994.
- DETABOADA, L. et al. Transcranial application of low-energy laser irradiation improves neurological deficits in rats following acute stroke. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 1, p. 70–73, jan. 2006.
- DOLECEK, T. A. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. **Neuro-Oncology**, v. 14, n. suppl 5, p. v1–v49, 1 nov. 2012.
- ECKFORD, P. D. W.; SHAROM, F. J. ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 2989–3011, 8 jul. 2009.
- EELLS, J. T. et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**, v. 4, n. 5–6, p. 559–567, set. 2004.
- FLOOR, S. L. et al. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 9, p. 509–515, set. 2012.
- FRANCO, R. et al. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 6–11, jul. 2008.
- GOTTESMAN, M. M.; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annual review of biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 385–427, 1993.
- GRETHER-BECK, S. et al. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation: Photoprotection beyond UV. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 30, n. 2–3, p. 167–174, abr. 2014.
- HAMILTON, J. D. et al. Glioblastoma multiforme metastasis outside the CNS: three case reports and possible mechanisms of escape. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 22, p. e80–e84, 2014.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

- HELM, P. J.; OTTERSEN, O. P.; NASE, G. Analysis of optical properties of the mouse cranium—Implications for in vivo multi photon laser scanning microscopy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 178, n. 2, p. 316–322, abr. 2009.
- HIBI, M. et al. Identification of an oncoprotein-and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. **Genes & development**, v. 7, n. 11, p. 2135–2148, 1993.
- HILEMAN, E. O. et al. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 209–219, 1 mar. 2004.
- HONG, X. et al. Intracellular free calcium mediates glioma cell detachment and cytotoxicity after photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 5, p. 777–786, set. 2009.
- HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, 2010.
- JIA, Y.-L.; GUO, Z.-Y. Effect of low-power He-Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 323–328, abr. 2004.
- KARSY, M. et al. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. **Folia Neuropathologica**, v. 4, p. 301–321, 2012.
- KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1–17, 1999.
- KARU, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochemistry and photobiology**, v. 84, n. 5, p. 1091–1099, 2008.
- KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 23, n. 4, p. 355–361, 2005.
- KING, M. et al. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. **Nature neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 268–274, 2001.
- KNOBEL, R. B.; GUENTHER, B. D.; RICE, H. E. Thermoregulation and Thermography in Neonatal Physiology and Disease. **Biological Research For Nursing**, v. 13, n. 3, p. 274–282, 1 jul. 2011.
- KUNJACHAN, S. et al. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13–14, p. 1852–1865, nov. 2013.
- LESNIAK, M. S.; BREM, H. Targeted therapy for brain tumours. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 499–508, jun. 2004.
- LEVITZKI, A.; KLEIN, S. Signal transduction therapy of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 4, p. 287–329, ago. 2010.
- LONGLEY, D.; JOHNSTON, P. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 275–292, jan. 2005.
- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 12 jul. 2007.



LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, jun. 2016.

LUN, M. et al. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 105, n. 2, p. 261–273, nov. 2011.

MA, J.; JIANG, L. Photogeneration of singlet oxygen ( $^1O_2$ ) and free radicals ( $Sen^-$ ,  $O^{\cdot-2}$ ) by tetra-brominated hypocrelin B derivative. **Free radical research**, v. 35, n. 6, p. 767–777, 2001.

MAHVASH, M. et al. Glioblastoma Multiforme in Children: Report of 13 Cases and Review of the Literature. **Pediatric Neurology**, v. 45, n. 3, p. 178–180, set. 2011.

MARGISON, G. P.; SANTIBÁÑEZ-KOREF, M. F.  $O^6$ -alkylguanine-DNA alkyltransferase: Role in carcinogenesis and chemotherapy: Review articles. **BioEssays**, v. 24, n. 3, p. 255–266, mar. 2002.

MARIANNE J. CRONJE, T. K. H. Cancer Tissue Classification, Associated Therapeutic Implications and PDT as an Alternative. **Anticancer Research**, v. 37, n. 6, 29 maio 2017.

MIKI, Y. et al. Concomitant treatment with temozolomide enhances apoptotic cell death in glioma cells induced by photodynamic therapy with talaporfin sodium. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 4, p. 556–564, dez. 2014.

MOJAS, N.; LOPES, M.; JIRICNY, J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. **Genes & Development**, v. 21, n. 24, p. 3342–3355, 15 dez. 2007.

MOODY, C.; WHEELHOUSE, R. The Medicinal Chemistry of Imidazotetrazine Prodrugs. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 7, p. 797–838, 10 jul. 2014.

MOORE, P. et al. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. 1, p. 8–12, jan. 2005.

MURAGAKI, Y. et al. Phase II clinical study on intraoperative photodynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors. **Journal of neurosurgery**, v. 119, n. 4, p. 845–852, 2013.

MURAYAMA, H. et al. Low-power 808-nm laser irradiation inhibits cell proliferation of a human-derived glioblastoma cell line in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 87–93, jan. 2012.

NAGATA, S. et al. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n. 1, p. 64–70, jul. 2003.

NANCY L. OLEINICK, I. B. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–21, 7 jan. 2002.

NEIDLE, S.; THURSTON, D. E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 4, p. 285–296, abr. 2005.

OBAYASHI, T. et al. Treatment with near-infrared radiation promotes apoptosis in pancreatic cancer cells. **Oncology Letters**, v. 10, n. 3, p. 1836–1840, set. 2015.

OHBA, S.; HIROSE, Y. Current and Future Drug Treatments for Glioblastomas. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 38, p. 4309–4316, 2016.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764–772, 15 fev. 2013.

OMURO, A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. **JAMA**, v. 310, n. 17, p. 1842, 6 nov. 2013.

PAN, L. et al. Oxidized Guanine Base Lesions Function in 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1-mediated Epigenetic Regulation of Nuclear Factor  $\kappa$ B-driven Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 49, p. 25553–25566, 2 dez. 2016.

PASSARELLA, S.; KARU, T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 140, p. 344–358, nov. 2014.

PINTO, M. P. et al. Targeted brain delivery nanoparticles for malignant gliomas. **Nanomedicine**, v. 12, n. 1, p. 59–72, jan. 2017.

PLAETZER, K. et al. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 172–177, 6 mar. 2002.

POLLARD, S. M. et al. Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 6, p. 568–580, jun. 2009.

PORTANTIOLO LETTNIN, A. et al. Protective effect of infrared-A radiation against damage induced by UVB radiation in the melan-a cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 163, p. 125–132, out. 2016.

PORTER, K. R. et al. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by age, gender, behavior, and histology. **Neuro-Oncology**, v. 12, n. 6, p. 520–527, 1 jun. 2010.

RADOGNA, F. et al. Neuroprotection by Melatonin on Astrocytoma Cell Death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171, n. 1, p. 509–513, ago. 2009.

ROBERT, M.; WASTIE, M. Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**, v. 4, n. 1, jan. 2008.

ROJAS, J. C. et al. Neuroprotective Effects of Near-Infrared Light in an In Vivo Model of Mitochondrial Optic Neuropathy. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 50, p. 13511–13521, 10 dez. 2008.

ROJAS, J. C.; GONZALEZ-LIMA, F. Neurological and psychological applications of transcranial lasers and LEDs. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 447–457, ago. 2013.

SCHAICH, M. et al. A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 1, p. 175–181, jan. 2009.

SCHROEDER, P.; HAENDELER, J.; KRUTMANN, J. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. **Experimental Gerontology**, v. 43, n. 7, p. 629–632, jul. 2008.

SHAROM, F. J. Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. **Frontiers in Oncology**, v. 4, 2014.

SHEPPARD, A. R.; SWICORD, M. L.; BALZANO, Q. Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. **Health physics**, v. 95, n. 4, p. 365–396, 2008.

SIROTA, M. et al. Discovery and Preclinical Validation of Drug Indications Using Compendia of Public Gene Expression Data. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 96, p. 96ra77-96ra77, 17 ago. 2011.

SMIRNOVA, Z. S. et al. Experimental study of combined therapy for malignant glioma. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 156, n. 4, p. 480, 2014.

SOMMER, A. P. et al. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 19, n. 1, p. 29–33, 2001.

STEMP, E. D.; BARTON, J. K. Complexes Bound to DNA: Is DNA. **Metal Ions in Biological Systems: Volume 33: Probing of Nucleic Acids by Metal Ion Complexes of Small Molecules**, v. 33, p. 325, 1996.

STEPANENKO, A. A. et al. Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells. **Cancer Cell International**, v. 16, n. 1, dez. 2016.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 987–996, 2005.

SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 219, 1 mar. 2006.

TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v. 72, n. 2, p. 111–127, fev. 2004.

TANAKA, Y. et al. Non-thermal cytotoxic effect of infrared irradiation on cultured cancer cells using specialized device. **Cancer Science**, v. 101, n. 6, p. 1396–1402, 15 mar. 2010.

TANAKA, Y. et al. Non-thermal DNA damage of cancer cells using near-infrared irradiation. **Cancer Science**, v. 103, n. 8, p. 1467–1473, ago. 2012.

THÖLE, M. et al. Uptake of Cationized Albumin Coupled Liposomes by Cultured Porcine Brain Microvessel Endothelial Cells and Intact Brain Capillaries. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, n. 4, p. 337–344, jan. 2002.

TSAI, S.-R.; HAMBLIN, M. R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 170, p. 197–207, maio 2017.

- UOZUMI, Y. et al. Targeted increase in cerebral blood flow by transcranial near-infrared laser irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 6, p. 566–576, 20 jul. 2010.
- URBAŃSKA, K. et al. Review Glioblastoma multiforme – an overview. **Współczesna Onkologia**, v. 5, p. 307–312, 2014.
- VANACLOCHA, V. et al. Photodynamic therapy in the treatment of brain tumours. A feasibility study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 3, p. 422–427, set. 2015.
- VATANSEVER, F.; HAMBLIN, M. R. Far infrared radiation (FIR): Its biological effects and medical applications. **Photonics & Lasers in Medicine**, v. 1, n. 4, 1 jan. 2012.
- VILLANO, J. L.; SEERY, T. E.; BRESSLER, L. R. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 647–655, set. 2009.
- WANG, S. et al. Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents? **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2545–2554, nov. 2011.
- WONG-RILEY, M. T. T. et al. Photobiomodulation Directly Benefits Primary Neurons Functionally Inactivated by Toxins: ROLE OF CYTOCHROME *c* OXIDASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4761–4771, 11 fev. 2005.
- YAN, D.; AN, G.; KUO, M. T. C-Jun N-terminal kinase signalling pathway in response to cisplatin. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 11, p. 2013–2019, nov. 2016.
- YIN, A. et al. Radiotherapy Plus Concurrent or Sequential Temozolomide for Glioblastoma in the Elderly: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74242, 24 set. 2013.
- ZHANG, J.; STEVENS, M.; BRADSHAW, T. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. **Current molecular pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 102–114, 2012.
- ZHANG, X. et al. Combination of photodynamic therapy and temozolomide on glioma in a rat C6 glioma model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 4, p. 603–612, dez. 2014.
- ZHOU, J. et al. Reversal of P-glycoprotein–Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cells by the c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase. **Cancer Research**, v. 66, n. 1, p. 445–452, 1 jan. 2006.
- ZHOU, X. et al. Laser controlled singlet oxygen generation in mitochondria to promote mitochondrial DNA replication in vitro. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, dez. 2015.
- ZIEGLER, D. S. et al. Resistance of human glioblastoma multiforme cells to growth factor inhibitors is overcome by blockade of inhibitor of apoptosis proteins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 9, p. 3109–3122, 2 set. 2008.