UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

IGOR SANTOS FREITAS

EFEITO DE ÓLEO VEGETAL PEROXIDADO OBTIDO POR OZONIZAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM MODELO DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Mogi das Cruzes, SP

2024

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

IGOR SANTOS FREITAS

EFEITO DE ÓLEO VEGETAL PEROXIDADO OBTIDO POR OZONIZAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM MODELO DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre na Área de Biotecnologia, orientado pelo Dr. Tiago Rodrigues.

Mogi das Cruzes, SP

2024

FINANCIAMENTO







Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Freitas, Igor Santos
F866e Efeito de óleo vegetal peroxidado obtido por ozonização sobre a viabilidade, proliferação e migração celular em modelo de glioblastoma humano / Igor Santos Freitas. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
47 f. : il.
Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Tiago Rodrigues.

1. Gioblastoma 2. Estresse Oxidativo 3. Neplasias 4. Ozonização 5. Óleo Peroxidado I. Rodrigues, Tiago II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 616.9942203

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às nove horas do dia trinta de janeiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "EFEITO DE ÓLEO VEGETAL PEROXIDADO OBTIDO POR OZONIZAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO EMIGRAÇÃO CELULAR EM MODELO DE GLIOBLASTOMA HUMANO", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Igor Santos Freitas**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Tiago Rodrigues, e Denise Costa Arruda, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Jorge Luis Maria Ruiz, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). Sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

aprovado (aprovado(a)/reprovado(a)) por unanimidade (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 30 de janeiro de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
Documento assinado digitalmente gov.br JORGE LUIS MARIA RUIZ Data: 31/01/2025 11:05:24-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	
Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz	aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Profª Drª Denise Costa Arruda	aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Documento assinado digitalmente gov.br TIAGO RODRIGUES Data: 31/01/2025 08:58:16-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	
Prof. Dr. Tiago Rodrigues	aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que nos proporciona o dom da vida.
A minha esposa Thais Alessandra, aos meus filhos Tobias, Matias e Manuela, pois fazem parte de todos os momentos da minha vida.

Agradeço ao Professor Tiago Rodrigues por todo apoio, paciência e ensinamentos para comigo.

À Instituição UMC pela oportunidade de realizar um sonho.

Agradeço às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelo financiamento.

Aos meus amigos e familiares por me apoiarem nesse processo de aprendizagem.

RESUMO

O glioblastoma é uma neoplasia cerebral maligna e invasiva que está associada a uma alta taxa de mortalidade. O tratamento padrão envolve a ressecção cirúrgica, sempre que possível, além de radioterapia e quimioterapia com temozolomida. No entanto, a recidiva após a quimioterapia e o aparecimento de células resistentes a este quimioterápico é frequentemente descrito, diminuindo sobremaneira a probabilidade de cura e sobrevivência do paciente. Assim, embora diversas estratégias terapêuticas estejam sendo estudadas para o tratamento do GBM, a taxa de remissão completa ainda é muito baixa e a busca por novas abordagens terapêuticas, incluindo novos alvos e novos compostos, é necessária. Muitos quimioterápicos já utilizados na clínica oncológica empregam fármacos que apresentam atividade antitumoral por induzir (entre outros efeitos) estresse oxidativo, resultando assim em morte celular, como por exemplo, a doxorrubicina. De acordo com a literatura, o óleo peroxidado obtido por ozonização têm se mostrado eficaz contra bactérias, fungos e vírus, sendo testado para o tratamento de infecções. Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não é completamente esclarecido, porém, devido a sua característica química, pode envolver a indução de estresse oxidativo. Considerando a inexistência de estudos em modelos tumorais, neste projeto investigamos os efeitos do óleo vegetal peroxidado sobre a viabilidade celular em modelos de glioblastoma *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que o óleo peroxidado apresentou citotoxicidade de forma concentração dependente nas linhagens de glioblastoma multiforme humano U343MG e U251MG. Por outro lado, o óleo não peroxidado, nas mesmas condições experimentais, não exibiu citotoxicidade.

Palavras-chave: câncer, estresse oxidativo, morte celular, ozônio, radicais livres.

Abstract

Glioblastoma is a malignant and invasive brain neoplasm that is associated with a high mortality rate. Standard treatment involves surgical resection, where possible, in addition to radiation therapy and chemotherapy with temozolomide. However, recurrence after chemotherapy and the appearance of cells resistant to this chemotherapy drug is often described, greatly reducing the probability of cure and survival of the patient. Thus, although several therapeutic strategies are being studied for the treatment of GBM, the rate of complete remission is still very low and the search for new therapeutic approaches, including new targets and new compounds, is necessary. Many chemotherapy drugs already used in clinical oncology use drugs that have antitumor activity by inducing (among other effects) oxidative stress, thus resulting in cell death, such as doxorubicin. According to the literature, peroxidized oil obtained by ozonation has been shown to be effective against bacteria, fungi and viruses, being tested for the treatment of infections. However, its mechanism of action is not yet fully understood, however, due to its chemical characteristic, it may involve the induction of oxidative stress. Considering the lack of studies in tumor models, in this project we investigated the effects of peroxidized vegetable oil on cell viability in glioblastoma models in vitro. The results showed that the peroxidized oil presented cytotoxicity in a concentration-dependent manner in the human glioblastoma multiforme strains U343MG and U251MG. On the other hand, the non-peroxidized oil, under the same experimental conditions, did not exhibit cytotoxicity.

Keywords: cancer, oxidative stress, cell death, ozone, free radicals.

LISTA DE ABREVIATURAS

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

GBM - Glioblastoma multiforme

GPx1 - Glutationa peroxidase 1

IDH - Isocitrato desidrogenase

MGMT - O6-metilguanina-DNA metiltransferase

MTIC - 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida

OMS - Organização Mundial da Saúde

TC - Tomografia computadorizada

TMZ - Temozolomida

SUMÁRIO

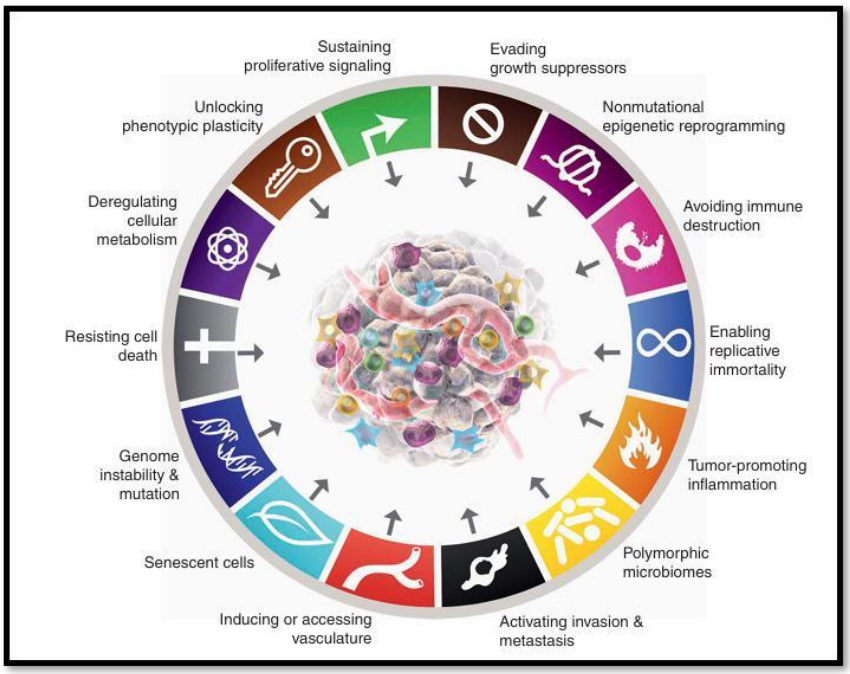
1. INTRODUÇÃO 9
2. MATERIAL E MÉTODOS 19
2.1. PREPARO DA AMOSTRA 19
2.2. CULTURA CELULAR 20
2.3. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR TESTE DE REDUÇÃO DO MTT 20
2.4. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR: ENSAIO CLONOGÊNICO 20
2.5. AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR: SCRATCH TESTE 21
2.6. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA 21
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 22
3. RESULTADOS 22
3.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO E NÃO OZONIZADO POR REDUÇÃO DE MTT 22
3.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA 24
3.3. AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA 27
3.4. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA 30
4. DISCUSSÃO 33
5. CONCLUSÃO 34
REFERÊNCIAS 35

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células que podem se originar em qualquer tecido do corpo humano (ROY & SAIKIA, 2016), além disso, as células troncos estão envolvidas na formação tumoral, pois apresentam a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em vários tipos de células (SELL, 2010) devido a uma série de mutações genéticas e alterações epigenéticas (ILANGO *et al.*, 2020). O câncer também pode ser oriundo de fatores como carcinogênese química, físicos e infecções virais (CASTANEDA *et al.*, 2022). Enquanto as células normais necessitam de sinais de crescimento para proliferar, as células cancerígenas geram muitos dos seus próprios sinais (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

A transformação maligna apresenta algumas características moleculares que fornecem vantagens adaptativas ao tumor, que incluem escape de mecanismos de supressores de crescimento, resistência à indução de morte celular, sinais proliferativos constantemente ativados, imortalidade, aumento da angiogênese, capacidade de metástase, reprogramação metabólica e evasão do sistema imunológico (HANAHAN & WEINBERG, 2011), desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não mutacional, senescência celular e microbiota (HANAHAN, 2022).

Figura 1 - Características do câncer.



Fonte: Hanahan, 2022.

De acordo com Barabutis *et al.,* (2018) a proteína p53 é um fator de transcrição frequentemente encontrada mutada em células tumorais, pois ela atua regulando atividades como ciclo celular, senescência e apoptose. Durante a divisão celular se houver dano no DNA o p53 pode induzir parada no ciclo celular permitindo o reparo, se os danos forem irreparáveis, a proteína pode induzir apoptose ou parada permanente no ciclo celular (ZHANG *et al.*, 2020). Entretanto após a mutação o p53 perde a função de supressão tumoral e adquire a capacidade de promover resistência a apoptose às células tumorais, além de aumentar a capacidade de migração e invasão proporcionando metástase (FARES *et al*., 2020, Hu *et al.*, 2021). As células tumorais adquirem resistência à indução de morte celular, pois podem apresentar superexpressão do gene Bcl-2, esse gene regula a permeabilidade mitocondrial inibindo a liberação de fatores pro-apoptóticos (MOHAMMAD *et al.*, 2015), além disso, as células cancerígenas apresentam redução da expressão de BAX, uma proteína pro-apoptótica (FENG *et al.*, 2018). A invasão pode ocorrer por disseminação de células únicas ou migração coletiva, ambas envolvendo mudanças na morfologia celular e remodelação do tecido (SELL, 2010). A reprogramação metabólica é uma característica prevalente do metabolismo do câncer, também é chamado de glicólise aeróbica e essa alteração no metabolismo se distingue por uma elevada captação e utilização de glicose, levando ao aumento da produção de ácido lático (VANDER HEIDEN *et al.*, 2009). Consequentemente, isso leva a modificações do microambiente tumoral por meio da acidificação e facilita a proliferação e metástase de células cancerígenas (DE LA CRUZ-LOPEZ *et al.,* 2019).

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo (KIRI & RYBA, 2024) e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 10 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença (World Health Organization, 2022). Estima-se um aumento de 47% no número de casos de câncer no mundo em 2025 comparado a 2020 (GLOBOCAN, 2020). No Brasil o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2020) estima cerca 704 mil novos casos de câncer até 2025, além disso, a região sul e sudeste concentra cerca de 70% dos casos do país. O custo total do tratamento do câncer na Europa foi de 199 bilhões de euros (HOFMARCHER *et al.,* 2020). No mundo estima-se que serão gastos 25,2 trilhões de dólares até 2050, desse total 5,3 trilhões serão gastos pelos EUA (CHEN *et al.,* 2022). No Basil no ano de 2022, o custo direto do tratamento do câncer foi de aproximadamente 3,9 bolhões de reais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Devido ao impacto causado na humanidade, busca-se terapias mais eficientes para o tratamento do câncer (WALEWSKI, 2015). Dentre as terapias utilizadas para tratar pacientes com câncer destacam-se a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, porém devido ao insucesso outras formas de tratamento são estudadas como terapias biológicas,

imunoterapias, anticorpos, vírus, além de terapias multimodais (PAPIEŻ & KRZYŚCIAK, 2021).

Gliomas são os tumores cerebrais primários mais frequentes do sistema nervoso central (SNC) (FERNANDES *et al.*, 2023), além disso, causam mais de 15000 mortes por ano nos EUA (SCHAFF & MELLINGHOFF, 2023) Histologicamente assemelham-se as células gliais normais e geralmente são nomeados de acordo com essa semelhança (MODREK *et al.*, 2014). As células gliais incluem astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias, todas desempenhando papéis essenciais no suporte, nutrição e proteção dos neurônios, influenciando desde o nascimento dos neurônios até a montagem dos circuitos e a sinaptogênese (ALLEN & LYONS, 2018). A diversidade funcional dessas células resulta na ampla variedade de gliomas, que podem se manifestar com diferentes graus de agressividade, localização e impacto clínico (OSTROM *et al.*, 2021). Os gliomas são formados por células neoplásicas e não neoplásicas que incluem macrófagos e micróglia (HAMBARDZUMYAN *et al.*, 2016). As células neoplásicas se proliferam continuamente, acumulam mutações proporcionando a diversidade celular tumoral, pois essas células são clones geneticamente diferentes (GISINA *et al.*, 2022).

A incidência de GBM no mundo varia de 3,19 a 4,17 casos por 100.000 pessoas (GROCHANS *et al.*, 2022), já no brasil a incidência chega a 6,04 casos por 100.000 pessoas (SILVA *et al.*, 2024). Além disso, a incidência de metástase extracraniana é rara ocorrendo em menos de 1 % dos casos de GBM (MAJD *et al.*, 2024). Embora possa ocorrer em qualquer faixa etária, é mais comum em adultos, do sexo masculino com idade entre 45 e 70 anos (OMURO & DEANGELIS, 2013). A incidência anual de glioma nos EUA chega a aproximadamente 7 por 100000 indivíduos (SCHAFF & MELLINGHOFF, 2023), além disso, estima-se que que representem cerca de 30% de todos os tumores cerebrais primários e 80% dos tumores cerebrais malignos (GUZAUSKAS *et al.*, 2018). De acordo com o Ministério da Saúde (2017), no Brasil, a taxa de mortalidade de pacientes com glioma ultrapassa 89%. No que se refere ao SNC, os gliomas são o tipo mais frequentes de tumores primários em adultos (OSTROM *et al.*, 2021). De modo geral, a sua forma maligna surge de um processo multifatorial que envolve alterações genéticas sequenciais e cumulativas e se demonstram mais comuns em indivíduos brancos, do sexo masculino (OMURO; DEANGELIS, 2013) e de meia idade, em que a maior incidência ocorre entre 40 e 65 anos (SCHNEIDER *et al.*, 2010). A ressonância magnética é o exame mais detalhado e comum para diagnosticar gliomas, fornece imagens precisas do cérebro, permitindo identificar o tamanho, localização e características do tumor (HANGEL *et al.*, 2024). Os gliomas difusos do tipo adulto incluem o astrocitoma, IDH mutado; oligodendroglioma, e 1p/19q codeletado e glioblastoma, IDH-selvagem. Os gliomas difusos do tipo pediátrico, por

sua vez, são classificados em grau II a IV, o que se reflete na conduta e prognóstico da doença (FERNANDES *et al.,* 2023). Segundo a OMS os gliomas são divididos em glioma difuso do tipo adulto e glioma difuso do tipo pediátrico que por sua vez é subdividido em glioma difuso de baixo grau do tipo pediátrico e glioma difuso de alto grau do tipo pediátrico (LOUIS *et al.,* 2021).

Quadro 1 – Classificação dos gliomas difuso do tipo adulto e pediátrico

Tipo de Glioma	**Subtipo**	**Características Moleculares**	**Grau OMS**
Gliomas Difusos do Tipo Adulto	Astrocitoma, IDH-mutante	Mutações IDH1 ou IDH2, deleção homozigótica de CDKN2A/B	2, 3, 4
	Oligodendroglioma, IDH-mutante e 1p/19q-codeletado	Mutações IDH1 ou IDH2, co-deleção 1p/19q	2, 3
	Glioblastoma, IDH-selvagem	Mutações no promotor TERT, amplificação do gene EGFR, alterações nos cromossomos 7 e 10	4
Gliomas Difusos do Tipo Pediátrico	**Gliomas Difusos de Baixo Grau do Tipo Pediátrico**	Alterações nos genes MYB ou MYBL1, caminho MAPK	1
	Gliomas Difusos de Alto Grau do Tipo Pediátrico	Mutações H3 K27, H3 G34, IDH-selvagem	4

Fonte: (LOUIS *et al.*, 2021)

Dentre eles os tumores do cérebro, o glioblastoma multiforme (GBM) representa a grande maioria dos casos de gliomas malignos (OMURO & DEANGELIS, 2013). É relativamente bem aceito que a origem dos GBMs pode ser atribuída à teoria das células-tronco, que se divide em duas hipóteses principais: a teoria da desdiferenciação dos astrócitos e a teoria das células-tronco do glioblastoma (SOUSA *et al.,* 2015). Ambos são caracterizados pela presença, no

glioma astrócito, de uma subpopulação de células que exibem propriedades semelhantes às de células-tronco neuronais, como multipotencialidade e a capacidade de se autorrenovar ou formar neuroesferas *in vitro* (BISEROVA *et al.,* 2021).

De modo geral, a apresentação clínica do GBM pode incluir déficit neural e cognitivo, perda de memória, convulsões e aumento da pressão intracraniana, que pode estar associada a dores de cabeça, vômito e papiledema (HANIF *et al.,* 2017). Quando os sintomas se desenvolvem rapidamente, podem ser confundidos com um acidente vascular cerebral ou até mesmo com confusão/delírio mental, que reflete em seu baixo prognóstico (OMURO & DEANGELIS, 2013). O diagnóstico do GBM é realizado principalmente através de técnicas de imagem, como ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons, que são essenciais para a identificação inicial do tumor (LI *et al.*, 2022). Para um diagnóstico definitivo, são necessários exames histopatológicos, geralmente realizados após a ressecção do tumor (OSTROM *et al*, 2021). Além disso, biomarcadores específicos, como mutações nos genes IDH1 e IDH2, a co-deleção dos cromossomos 1p/19q e a metilação do promotor MGMT, são utilizados para a classificação e prognóstico do GBM, fornecendo informações cruciais sobre a agressividade do tumor e a resposta esperada ao tratamento (Louis *et al.,* 2021).

O glioblastoma multiforme, que recebe tal nome por apresentar células de tamanho e formas variadas, é o tumor cerebral com maior malignidade, biologia complexa e pior prognóstico (OMURO & DEANGELIS, 2013). Para o seu surgimento, um conjunto de aspectos genéticos, epigenéticos e modificações pós-traducionais cooperam em uma série bem orquestrada de eventos que levam a transformações oncogênicas das células neuronais. Entre as principais características que diferem o GBM de gliomas de baixo grau tem-se uma alta atividade mitótica e proliferação vascular, inibição apoptose (ADAMSON *et al.,* 2009).

As vias de sinalização Wnt, fator de crescimento transformador Beta (TGF-β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), inibidor de quinase dependente de ciclina 2ª (CDKN2A), Fator Nuclear kappa B (NF-κB) e PI3K/AKT/mTOR desempenham papéis cruciais na patogênese do GBM e no comportamento agressivo do tumor (KHABIBOV *et al.,* 2022). Entre essas, a amplificação e superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) são particularmente comuns, ocorrendo em 35-45% dos casos de GBM (CRESPO *et al.,* 2015). No entanto, apesar da importância do EGFR na progressão do GBM, os inibidores de EGFR têm mostrado baixa eficácia em ensaios clínicos. Isso se deve, em parte, à heterogeneidade do tumor e à presença de mutações adicionais que podem compensar a inibição do EGFR, tornando o tratamento menos eficaz (AN *et al.,* 2018).

O glioblastoma multiforme comumente apresenta hipoxia no microambiente tumoral e essa condição promove a progressão tumoral, pois, induz a expressão de genes que protegem as células contra o dano oxidativo e a apoptose (LEI *et al.*, 2023)

Atualmente, o tratamento escolha para GBM é ressecção cirúrgica, seguida por quimioterapia e radioterapia (OSTROM *et al*, 2021). Contudo, as limitações oferecidas pela barreira hematoencefálica conferem às células tumorais a capacidade de escapar dos tratamentos convencionais (DEMUTH & BERENS, 2004; WENGER *et al.*, 2009). Houve avanços significativos no tratamento do GBM, incluindo a remoção do tumor usando fluorescência, imagem tridimensional (3D), tomoradioterapia, eletro-hipertermia moderada e temozolomida (TMZ) adjuvante (CZARNYWOJTEK *et al.*, 2023).Embora muitos avanços tenham ocorrido no tratamento do GBM, em virtude de sua característica de difusão agressiva e pobre capacidade de resposta a intervenções convencionais, incluindo ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, o tempo médio de sobrevivência dos pacientes portadores é de 12 a 16 meses (GITTLEMAN *et al.*, 2017; OSTROM *et al*, 2021). A cirurgia guiada por fluorescência é uma técnica que utiliza corantes fluorescentes como o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e a fluoresceína para auxiliar a identificação e remover tumores cerebrais com maior precisão, pois esses corantes se ligam às células tumorais, tornando-as visíveis sob luz específica durante a cirurgia, o que ajuda a garantir que mais tecido cancerígeno seja removido (CAO *et al.*, 2023). A tomoradioterapia é uma técnica avançada de radioterapia que utiliza imagens de tomografia computadorizada (TC) para guiar a administração precisa de radiação ao tumor, maximizando a dose no alvo e minimizando a exposição aos tecidos saudáveis (LI *et al.*, 2024). O processo envolve a aquisição de imagens de TC para mapear o tumor em 3D, delineamento preciso do volume alvo e cálculo da dose (CZARNYWOJTEK *et al.*, 2023).

A temozolomida é um agente quimioterápico utilizado principalmente no tratamento de gliomas, incluindo o GBM (WEN *et al.*, 2020). Por se tratar de um pró-fármaco, é necessário que se converta em MTIC (5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida), que possui atividade citotóxica, ou seja, é capaz de matar células tumorais (CZARNYWOJTEK *et al.*, 2023), além disso, é um agente alquilante que danifica o DNA das células tumorais, impedindo sua replicação e levando à morte celular, também quando combinada com a radioterapia, que também danifica o DNA das células tumorais, o efeito é potencializado (SCHAFF & MELLINGHOFF, 2023). Somado a isso, TMZ adiciona grupos metil (–CH3) às bases de guanina no DNA. Esse processo ocorre principalmente nas posições O6 e N7 da guanina (DHUNGEL *et al.*, 2024). A adição de grupos metil ao DNA cria lesões que são normalmente reparadas pelo sistema de reparo de DNA, no entanto, a TMZ induz uma reparação aberrante

dessas lesões, levando à formação de ligações cruzadas no DNA e, eventualmente, à morte celular (TRESCH *et al.*, 2021).

Inicialmente o tratamento é dividido em duas fases, a primeira que é a fase concomitante a radioterapia e a segunda é a fase de manutenção (CZARNYWOJTEK *et al.*, 2023). Durante a primeira fase, a TMZ é administrada diariamente por via oral, em uma dose de 75 mg/m² de superfície corporal, geralmente dura 6 semanas e é combinada com sessões diárias de radioterapia (DHUNGEL *et al.*, 2024). Após a conclusão da primeira fase, a TMZ é administrada em ciclos de 28 dias, cada ciclo consiste em 5 dias de tratamento com uma dose mais alta de TMZ, seguida por 23 dias de descanso (OBRADOR *et al.*, 2024). A dose durante esses 5 dias é geralmente de 150-200 mg/m² por dia. Este regime cíclico ajuda a reduzir os efeitos colaterais e permite que o paciente se recupere entre os ciclos de tratamento (DHUNGEL *et al.*, 2024). Ainda, de acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2022) a TMZ pode ser utilizada isoladamente ou combinada com outras terapias como carmustina, lomustina, irinotecano, bevacizumabe, procarbazina, carboplatina e vincristina. Os efeitos adversos da TMZ podem variar entre os pacientes, mas os mais comuns incluem náuseas, vômitos, fadiga, perda de apetite, e erupções cutâneas (BEGLEY *et al.*, 2023). Além disso, pode causar anemia, leucopenia e trombocitopenia, o que pode aumentar o risco de infecções e sangramentos, também pode ocorrer toxicidade hepática (DUNCAN *et al.*, 2021). Apesar de ser o principal medicamento para GBM, sua eficácia é limitada devido à resistência desenvolvida pelas células tumorais (DHUNGEL *et al.*, 2024).

Nesse sentido, a doxorrubicina, quimioterápico utilizado para vários tipos de câncer, tem sido estudada em modelos de GBM, isoladamente (SARDI, 2016) ou em associação à TMZ, ou ainda em sistemas nanoestruturados (BALOI *et al*, 2022; MAKSIMENKO *et al.*, 2019; ZIGANSHINA *et al*, 2023). Este medicamento pertence à classe dos antraciclinas, que são conhecidas por sua capacidade de interferir na síntese do DNA e na replicação celular, levando à morte das células tumorais (CHEN *et al.*, 2021). Seu mecanismo de ação envolve a formação de complexos que impedem a transcrição e a replicação do DNA, resultando em danos irreparáveis às células tumorais (KOSTKA *et al.*, 2024).

DHUNGEL *et al.*, (2024) demonstraram em seus resultados que a associação de doxorrubicina a TMZ aumentou a absorção da doxorrubicina o que elevou a inibição das células tumorais induzindo apoptose. Apesar da doxorrubicina apresentar cardiotoxicidade como efeito adverso, seu mecanismo de ação envolve indução de estresse oxidativo, promovendo, portanto, morte nas células tumorais (THORN *et al.*, 2011). Portanto, substâncias capazes de promover estresse oxidativo podem representar um mecanismo com grande potencial terapêutico para

estes tipos de câncer (LI *et al.*, 2024). Entretanto, mesmo com o tratamento combinado entre a TMZ e a doxorrubicina as células tumorais podem apresentar resistência ao tratamento (YALAMARTY *et al.*, 2023).

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal que inibe o crescimento de novos vasos sanguíneos (FERRARA *et al.*, 2004). Ao se ligar ao fator de crescimento endotelial vascular, impede sua interação com os receptores na superfície das células endoteliais, bloqueando, assim, a sinalização necessária para a angiogênese (CHENG *et al.*, 2023). Somado a isso, o tratamento concomitante com TMZ proporciona redução do edema cerebral causado pelo tumor, melhorando a qualidade de vida do paciente (BOTA *et al.*, 2015). Entretanto, a resistência das células tumorais ao tratamento com bevacizumabe limita sua utilização (MICHAELSEN *et al.*, 2018). Ainda que a imunoterapia e os inibidores da angiogênese pudessem ser considerados como opções terapêuticas, a eficácia destes tratamentos é limitada pela barreira hematoencefálica (WENGER *et al*, 2009).

Com isso, apesar dos avanços na oncologia, a resistência ao tratamento continua a ser um desafio significativo (YALAMARTY *et al.*, 2023). A barreira hematoencefálica impõe a permeabilidade seletiva das moléculas, tornando-se um obstáculo para o transporte de quimioterápicos direcionados a vários tipos de câncer cerebral, incluindo GBM (HAUMANN *et al.*, 2020). Os mecanismos de resistência incluem reparo do DNA e a presença de células autorrenováveis que promovem a resistência contra diversas modalidades de tratamento atuais (WU *et al.*, 2021). A enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) remove os grupos metil adicionados pela TMZ, revertendo o dano e permitindo que as células tumorais sobrevivam (YALAMARTY *et al.*, 2023). A expressão elevada de MGMT está associada à resistência ao TMZ (JIAPAER *et al.*, 2018). As células-tronco tumorais possuem propriedades de auto-renovação e tumorigenicidade, além disso, são altamente resistentes à quimio e radioterapia devido à presença de transportadores de efluxo de drogas e mecanismos de reparo de DNA (SOUSA *et al.*, 2015).

A hipóxia tumoral é uma das principais razões para o prognóstico negativo do GBM (YALAMARTY *et al.*, 2023). A resistência tumoral também pode ser induzida pela hipóxia, uma vez que essa condição aumenta a expressão de glutationa peroxidase 1 (GPx1) (LEI *et al.*, 2023). Essa enzima possui atividade antioxidante, protegendo a célula tumoral da apoptose induzida por radiação (LIU *et al.*, 2024). Somado a isso, a autofagia permite que as células tumorais utilizem suas próprias organelas como fonte de energia, ajudando-as a sobreviver e resistir aos tratamentos (WU *et al.*, 2022). Assim, até o presente, a combinação de radioterapia

com o agente alquilante oral TMZ representa o tratamento de escolha para GBM, aumentando a sobrevida média em 1,8 anos (GUZAUSKAS *et al.*, 2018)

Neste sentido, se faz necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (JIAPAER *et al.,* 2018). Somado a isso, é conhecido que o estresse oxidativo induz morte celular e que fármacos como a doxorrubicina e TMZ apresentam esse mecanismo de ação (THORN *et al.*, 2011). As espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio causam danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios da membrana, e estão envolvidos em várias vias de sinalização celular, como NF-κB, MAPK e PI3K (JOMOVA *et al.,* 2023). LIU *et al.,* (2022), demonstraram que a crisomicina A aumenta o estresse oxidativo e impede a progressão do glioblastoma.

O ozônio, um gás natural constituído por três átomos de oxigênio que apresenta um caráter fortemente oxidante, tem ganhado destaque (SERRA *et al.*, 2023). Na atualidade, o ozônio tem sido empregado em uma nova área de estudo denominada ozonioterapia, entretanto, muita celeuma tem surgido pela sua ampla utilização por médicos, fisioterapeutas, esteticistas, farmacêuticos, biomédicos e enfermeiros, normalmente sem critério, regulamentação por legislação e, mais importante, sem comprovação científica (IZZOTTI *et al.*, 2022). Estudos pré-clínicos sugerem que o ozônio, sozinho ou em combinação com a quimioterapia, é eficaz para inibir o crescimento de células de câncer de mama (LI & PU, 2024).

Na Medicina, uma nova área de estudo e aplicação que envolve o emprego de misturas contendo ozônio para o tratamento de afecções diversas tem se popularizado e é denominada ozonioterapia (HERNÁNDEZ *et al.,* 2020). Este tipo de terapia tem sido usada para uma ampla variedade de doenças e afecções, que incluem fibromialgia (TIRELLI *et al.,* 2019), osteoartrite (SCONZA *et al.,* 2020) e até mesmo COVID-19, o que evidencia uma possível ação antiviral (CATTEL *et al.,* 2021). Dentre os produtos “ozonizados” atualmente empregados nesta área, destaca-se o óleo peroxidado obtido por ozonização de óleo vegetal (DÍAZ *et al.,* 2006).

Os óleos vegetais são substâncias hidrofóbicas e apresentam consistência líquida a temperatura ambiente, e em sua composição é observado a presença de ésteres de triacilgliceróis, ácidos graxos e, principalmente, lipídios insaturados (CARDOSO, 2021). Dentre os óleos vegetais, o óleo de girassol se destaca por possuir uma composição rica em ácidos graxos insaturados, em especial os ácidos oleico e linoleico, e lipídeos insaturados (DÍAZ *et al.,* 2006). Na atualidade, estudos acerca dos benefícios obtidos a partir da ozonização do óleo de girassol têm surgido, principalmente quanto a sua capacidade antimicrobiana (HERNÁNDEZ *et al.,* 2020). Além do óleo de girassol o azeite de oliva também apresenta efeito protetor na carcinogênese mamária (MORAL & ESCRICH, 2022). O óleo de semente de

açaí demonstrou efeitos antitumorais em linhagens celulares de câncer cervical, incluindo inibição da proliferação celular, migração e formação de colônias (BORGES *et al.,* 2024). Além disso, OMBREDANE *et al.,* (2024), demonstraram que a nanoemulsão de óleo de pequi apresentou efeitos antitumorais contra células de câncer de mama triplo-negativo *in vitro*. AL-RAJHI *et al.,* (2024), demonstraram que o óleo ozonizado de semente preta apresentou melhor atividade antimicrobiana e antineoplásica quando comparado ao óleo de semente preta bruto.

Um dos produtos "ozonizados" que tem sido empregado atualmente é o "óleo ozonizado", que neste projeto, por fidelidade químico-científica, será chamado de óleo peroxidado obtido por ozonização de óleo vegetal (SKALKA *et al.*, 2009). O óleo ozonizado é criado quando o ozônio reage com os ácidos graxos insaturados do óleo, formando compostos ativos chamados ozonídeos e peróxidos (ALMUHAYAWI *et al.*, 2025). Ozonídeos são formados pela reação do ozônio com as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados presentes nos óleos vegetais, enquanto os peróxidos são formados quando o ozônio se combina com os ácidos graxos insaturados, resultando na criação de ligações peróxidas (SIDDIQUI *et al.*, 2022). Diferentemente dos ozonídeos os peróxidos liberando oxigênio ativo e radicais livres rapidamente durante sua decomposição (YAREMENKO *et al.,* 2020).

Alguns estudos prévios sugerem que o óleo peroxidado e seus subprodutos têm se mostrado eficazes para o tratamento de infecções bacterianas incluindo *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhi e Klebsiella pneumoniae* (AL-RAJHI *et al.*, 2024), fúngicas como a *Candida* (MONZILLO *et al.,* 2020) além do *Pythium insidiosum*, causador da pitiose, uma zoonose (BRAGA *et al.,* 2024) e parasitárias (ZANARDI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020), mas o mecanismo de ação ainda não é totalmente esclarecido (IORIO *et al.*, 2016). Um estudo recente apresenta evidências clínicas de uma possível ação antitumoral (IZZOTTI *et al.,* 2022). Tais efeitos contra microrganismos se dão por ação citotóxica proveniente de indução de estresse oxidativo por peróxidos lipídicos estáveis presentes no óleo (ZANARDI *et al.*, 2016).

Portanto, conhecendo as características comumente exibidas por tumores, em que se destacam a baixa disponibilidade de oxigênio, crescimento favorecido por moléculas antioxidantes e bloqueio mitocondrial, um estudo recente obteve resultados favoráveis quanto ao efeito antitumoral dos óleos vegetais ozonizados (IZZOTTI, 2022). Consequentemente, estes apresentam-se como uma estratégia potencial para neutralizar a progressão e recidivas do câncer, além de diminuir o risco de rádio e quimiorresistência (IZZOTTI *et al.*, 2022).

Dessa forma, investigamos a possível ação antitumoral do óleo de girassol peroxidado *in vitro,* em modelo de GBM, por meio da avaliação dos seus efeitos sobre a viabilidade celular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados possuíam o maior grau de pureza disponível comercialmente e a água utilizada para o preparo das soluções foi bidestilada e purificada pelo sistema Milli-Q. As amostras de óleo de girassol peroxidado por ozonização foram obtidas comercialmente da empresa Philozon (Camboriú/SC). O índice de peróxido nas amostras foi determinado pelo fornecedor para certificar a presença de óleo peroxidado. Tal quantificação também permitiu a normalização dos resultados pelo índice de peroxidação e permitiu a comparação com possíveis outros estudos que exibam esse índice. O resultado apresentado na Tabela 1 abaixo refere-se a amostra utilizada neste estudo.

Tabela 1 - Quantificação do índice de peróxido nas amostras de óleo peroxidado obtidas comercialmente.

Amostra	Marca	Lote	Validade	Índice de peróxido (mEq/kg)
Óleo de girassol ozonizado	Philozon®	18423A	07/25	4071

2.1. PREPARO DA AMOSTRA

Para os experimentos, utilizou-se amostras de óleo de girassol peroxidado por ozonização adquiridas comercialmente, em comparação com o óleo de girassol comercial não ozonizado (controle experimental). Tais amostras foram consideradas como 100% e estoques intermediários foram preparados por diluição dos óleos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Os resultados obtidos serão posteriormente normalizados pelo índice de peróxido. Para os experimentos, diluiu-se as amostras a partir dos estoques intermediários para que a concentração final de DMSO nos ensaios fosse < 1,0 %. Embora essa concentração rotineiramente não seja citotóxica para as células, mas o mesmo volume do solvente (DMSO) foi adicionado no controle para aferir a ausência de citotoxicidade do solvente e ser utilizada para os cálculos de porcentagem de viabilidade celular.

2.2. CULTURA CELULAR

As linhagens celulares de glioblastoma multiforme humano U343MG e U251MG foram cultivadas em meio DMEM (*high glucose)* suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) inativado por calor (56°C por uma hora), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μg/ml, pH 7,2. As células foram mantidas em estufa Panasonic MCO-19AIC- UV (Panasonic Healthcare Co. Ltd., Japão) com 5% de CO_2 a 37°C. Os subcultivos foram realizados a cada 72 horas e a viabilidade celular foi determinada utilizando o corante azul de tripan 0,16% (m/v) e contagem em câmara de Neubauer.

2.3. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR TESTE DE REDUÇÃO DO MTT

As células (3×10^4 células/cm^2) foram incubadas em placas 96 poços com 200 μL de meio de cultura suplementado 24 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C para adesão celular. Após este período, o meio DMEM suplementado com SFB 10% foi trocado e concentrações crescentes do óleo ozonizado (0,0005%; 0,001%; 0,005%; 0,01%; 0,05% e 0,125%) foram adicionadas e incubadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Após o período de incubação, adicionou-se 10 μL da solução de MTT (0,25 mg/mL) seguido por mais 4 horas de incubação. Os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 80 μL de SDS 10% (m/v) (em HCl 0,01 mol/L) e incubados por 12 horas à temperatura ambiente. Após a determinação da absorbância em 570 nm e 630 nm no leitor de placa (Biotek ELX800, USA), a porcentagem de células viáveis foram calculadas em relação ao controle (100%). Determinou-se os valores de EC_{50} (*half maximal effective concentration)* a partir das curvas concentração-resposta.

2.4. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR: ENSAIO CLONOGÊNICO

Para avaliar a capacidade do composto de inibir a formação de colônias foi utilizado o ensaio clonogênico. O protocolo utilizado segue as orientações de Franken (2006), com algumas modificações. Foram semeadas 100 células em placas de 12 poços. Após 24h, as células já aderidas foram tratadas com os compostos em estudo nas concentrações de 0,01% e 0,05%. Como controle, foi adicionado o mesmo volume do veículo usado para os compostos (DMSO). As placas foram mantidas em cultura por 7 dias e o tratamento foi realizado 2 vezes com a troca do meio. Após este período, o meio de cultura foi descartado, as placas lavadas

com tampão fosfato salino (PBS), e as colônias formadas coradas com solução aquosa contendo metanol 50% e cristal violeta 0,5% por 25 minutos. Em seguida, foram feitas 3-5 lavagens em água corrente para remoção do excesso de corante e as placas foram deixadas em temperatura ambiente para secagem total. As placas foram fotografadas para comparação do crescimento das colônias (número e tamanho) nos diferentes tratamentos em relação ao controle. O percentual do número de colônias foi calculado em relação ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Número de colônias (\%)} = \frac{\text{número de colônias na amostra} \times 100}{\text{número de colônias do controle celular}}$$

2.5. AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR: *SCRATCH* TESTE

As células ($3\times10^4/cm^2$) foram semeadas em placas de 24 poços em meio DMEM high glucose e incubadas por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com 0,01 e 0,05% de óleo de girassol ozonizado e não ozonizado. Com o auxílio de uma ponteira de 200 µL foram realizadas fendas (arranhão) no centro de cada poço. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e novamente incubadas com meio suplementado, na presença e na ausência dos compostos por 24 horas. As imagens de microscopia óptica em campo claro foram obtidas em 0, 4, 24 e 29h em um microscópio Leica AF6000 (Leica Microsystems, Alemanha). As análises das áreas livres de células foram realizadas com o software ImageJ.

2.6. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM HOECHST 33258/PI

As células ($3x10^4/cm^2$) foram plaqueadas em placas de 24 poços e mantidas por 24 horas em estufa contendo 5,0% de CO_2 a 37°C para adesão. Após este período, as células foram tratadas com 0,01 e 0,05% de óleo de girassol ozonizado e não ozonizado e incubadas por 24 horas. Feito isso, as células foram carregadas com 1,5 µM iodeto de propídio e 8 µM Hoechst 33258. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período

de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão de fluorescência para remoção do excesso de fluoróforo. As imagens foram detectadas por microscopia de fluorescência widefield (Leica DMI6000B, Leica Microsystems, Alemanha) usando o conjunto de filtros e espelhos dicróicos A4 (Ex.: 360/40, Espelho dicróico: 400 nm: Filtro BP: 470/40) e Y3 (Ex: 620/60, Espelho dicróico: 660; Filtro BP: 700/75) utilizando o software Leica Application Suite (Leica Microsystems, Germany).

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

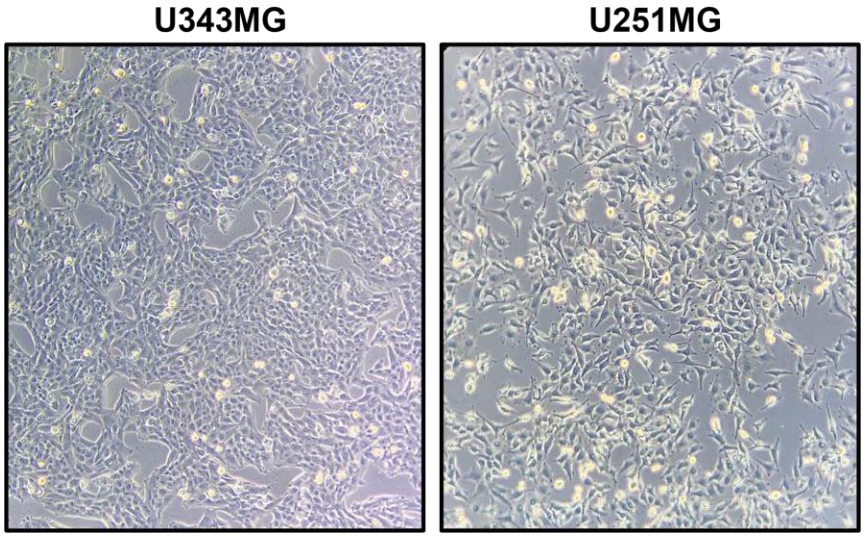
Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. As análises gráficas e os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa Prisma 8.0 (GraphPad Software, Inc.) e o software ImageJ. A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste Tukey, com significância definida em * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3. RESULTADOS

3.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO E NÃO OZONIZADO POR REDUÇÃO DE MTT

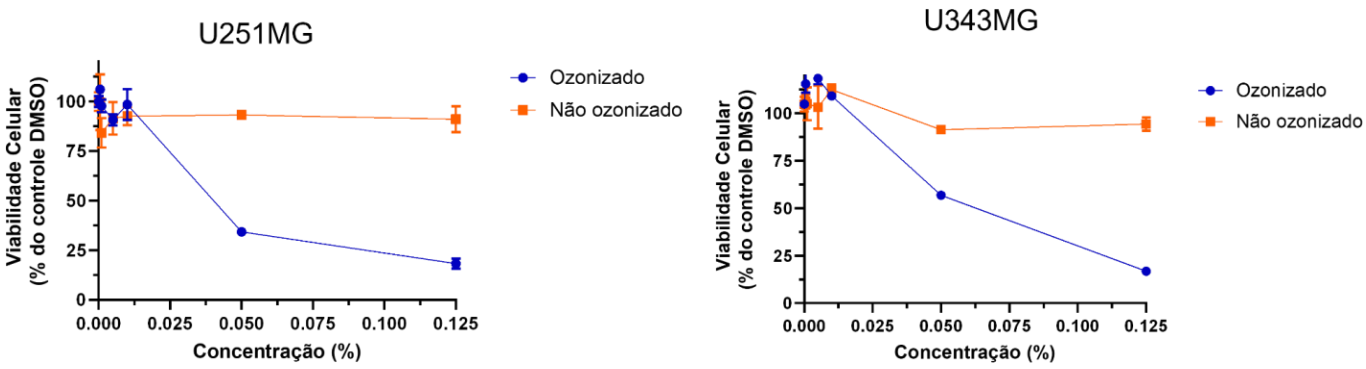
A citotoxicidade do óleo de girassol peroxidado por ozonização foi verificada em duas linhagens de glioblastoma multiforme, denominadas U343MG e U251MG (**Figura 1**), por meio do ensaio de redução por MTT. Este consiste em um método espectrofotométrico baseado na redução de um sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan por desidrogenases de células metabolicamente ativas, alterando a coloração dos poços experimentais de amarelo para roxo. Logo, verifica-se que a intensidade da absorbância obtida é diretamente proporcional aos cristais de formazan gerados e, portanto, é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Figura 2 - Imagens representativas das células de glioblastoma multiforme U343MG (esquerda) e U251MG (direita) em cultura bidimensional com aproximadamente 90% de confluência no aumento de 10x.



A incubação do óleo de girassol peroxidado por ozonização com as células U251MG e U343MG (Figura 3A) por 24 horas resultou em diminuição da viabilidade celular de forma concentração dependente (linhas azuis). De modo a averiguar se os efeitos avaliados eram, de fato, advindos da ozonização do óleo, comparou-se, em concentrações correspondentes, a citotoxicidade do óleo de girassol não ozonizado nas duas linhagens e em condições análogas de incubação e ensaio de redução do MTT. A citotoxicidade não foi observada para o óleo de girassol não ozonizado (linhas laranjas), mostrando que a citotoxicidade é dada pela ozonização do óleo.

Figura 3. Efeito do óleo de girassol ozonizado e não ozonizado sobre a viabilidade das células de GBM analisado pelo teste de redução do MTT. As linhagens celulares U251MG e U343MG foram incubadas com óleo de girassol ozonizado e não ozonizado em diferentes concentrações, nos tempos de 24h. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (DMSO), que foi considerado como 100%.



Para estimar um parâmetro que permita comparação de potência citotóxica, calculamos os valores de EC_{50} em 24h do óleo de girassol peroxidado em ambas as linhagens. Como pode ser observado na Tabela 2, o óleo de girassol ozonizado atingiu metade da potência máxima na linhagem U251MG em 0,030% enquanto para a U343MG em 0,050%, mostrando que é necessária uma concentração maior do óleo na linhagem U343MG em comparação com a linhagem U251MG para que a viabilidade diminua em 50%.

Em seguida, avaliamos se a citotoxicidade observada para o óleo peroxidado era dependente do tempo de incubação. Para isso, realizamos curvas de concentração-resposta também nos tempos de 48 e 72h. Os resultados estão apresentados abaixo na Fig. 4 e não evidenciam diferenças significativas na citotoxicidade com o aumento do tempo de incubação, com exceção do tempo 72h na linhagem U343MG, em que se observou um aumento da citotoxicidade.

Tabela 2 – Valores de EC_{50} (*half maximal effective concentration*) obtidos a partir das curvas concentração-resposta do óleo de girassol ozonizado sobre a viabilidade celular das células U251MG e U343MG após 24 h de incubação.

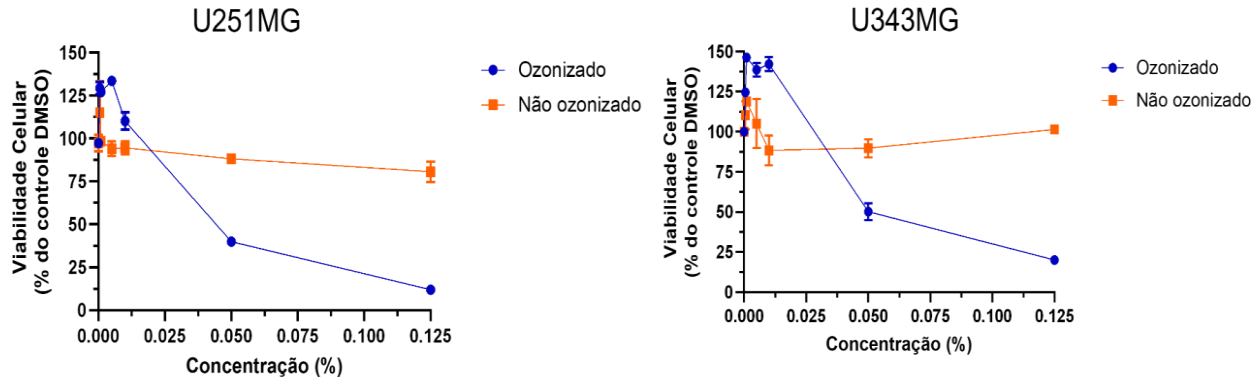
Linhagem celular	EC_{50} (%)
U251MG	0,030
U343MG	0,050

2.1. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

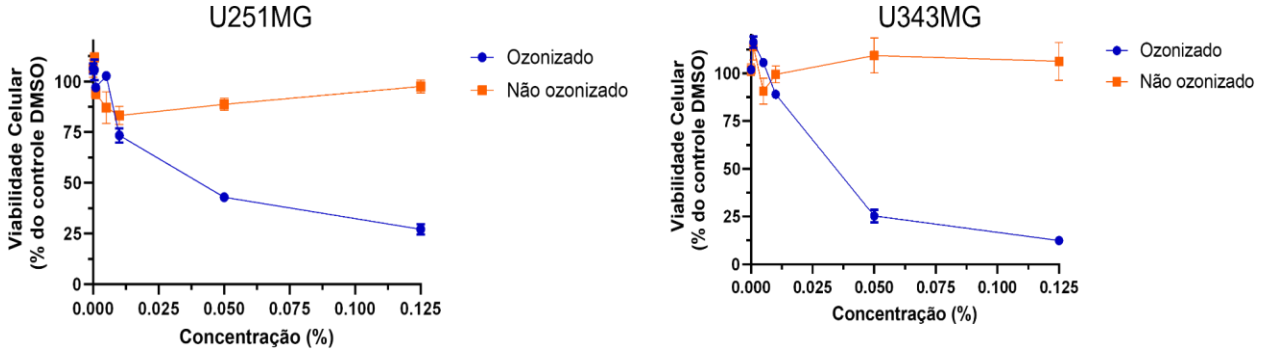
Com o estudo do ensaio clonogênico buscamos avaliar a capacidade das células remanescentes, que sobreviveram ao tratamento, de formar colônias. Neste estudo, as células foram semeadas em placas e, quando já aderidas, receberam os compostos de tratamento nas concentrações de 0,01% e 0,05%, sendo incubadas durante o período de 24h e, posteriormente, mantidas em cultivo por 7 dias.

Figura 4 - Efeito do óleo de girassol ozonizado e não ozonizado sobre a viabilidade das células de GBM analisado pelo teste de redução do MTT. As linhagens celulares U251MG e U343MG foram incubadas com óleo de girassol ozonizado e não ozonizado em diferentes concentrações, nos tempos de (A) 48h (B)72h. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (DMSO), que foi considerado como 100%.

(A)

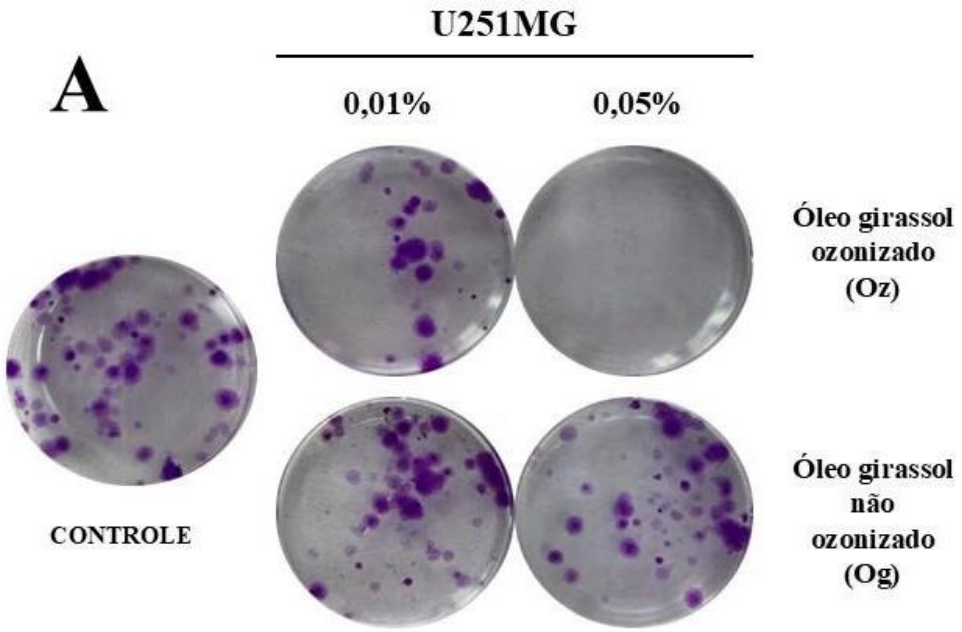


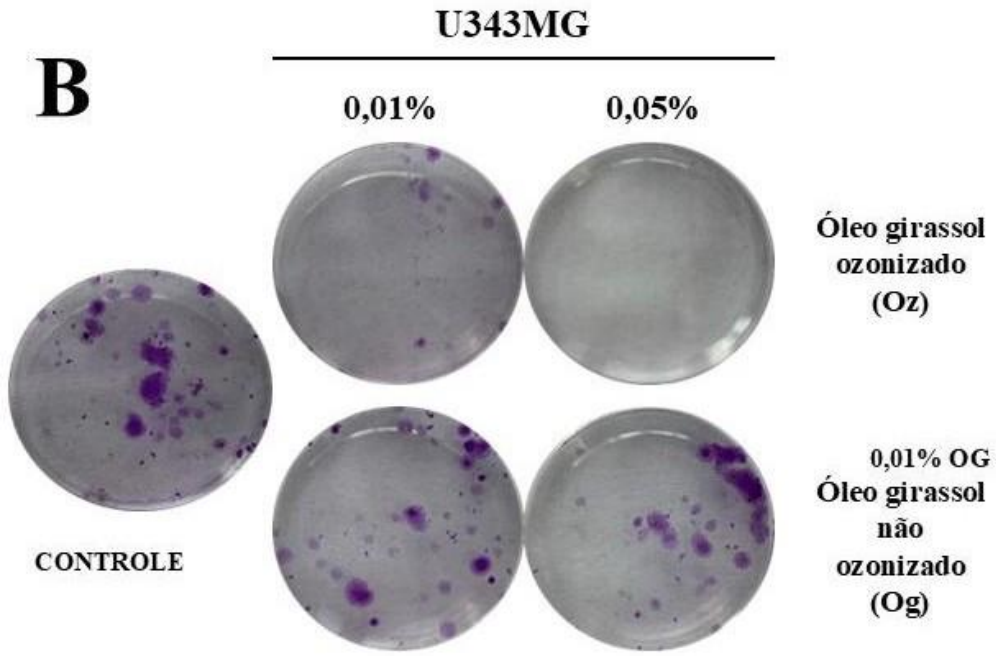
(B)

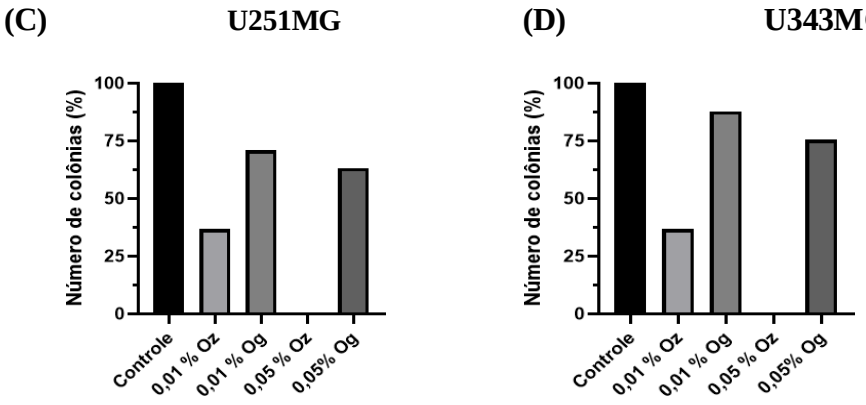


Ao término do período de cultivo observamos que, tanto no tratamento com o óleo convencional quanto com o óleo ozonizado houve a redução no número de colônias formadas (Figura 5), porém, a diminuição se demonstrou mais significativa com o óleo ozonizado, em que na concentração citotóxica de 0,05% não se formou nenhuma colônia depois dos 7 dias.

Figura 5 - Efeito do óleo de girassol ozonizado e não ozonizado sobre a capacidade das células de GBM de formarem colônias. As linhagens de GBM foram cultivadas e tratadas com óleo de girassol ozonizado (Oz) e não ozonizado (Og) nas concentrações de 0,01 e 0,05% por 24h e mantidas em estufa por 7 dias para formação de colônias. Após esse período, as colônias foram fixadas com metanol 50% e coradas com cristal violeta 0,5%. (A) Imagem das formações de colônia controle, óleo de girassol ozonizado nas concentrações 0,01 e 0,05% e óleo de girassol não ozonizado nas concentrações 0,01 e 0,05% na linhagem U251MG (B) Imagem das formações de colônia controle, óleo de girassol ozonizado nas concentrações 0,01 e 0,05% e óleo de girassol não ozonizado nas concentrações 0,01 e 0,05% na linhagem U343MG. (C) Análise quantitativa U251MG (D) análise quantitativa U343MG. A contagem de colônias foi feita pelo software ImageJ.





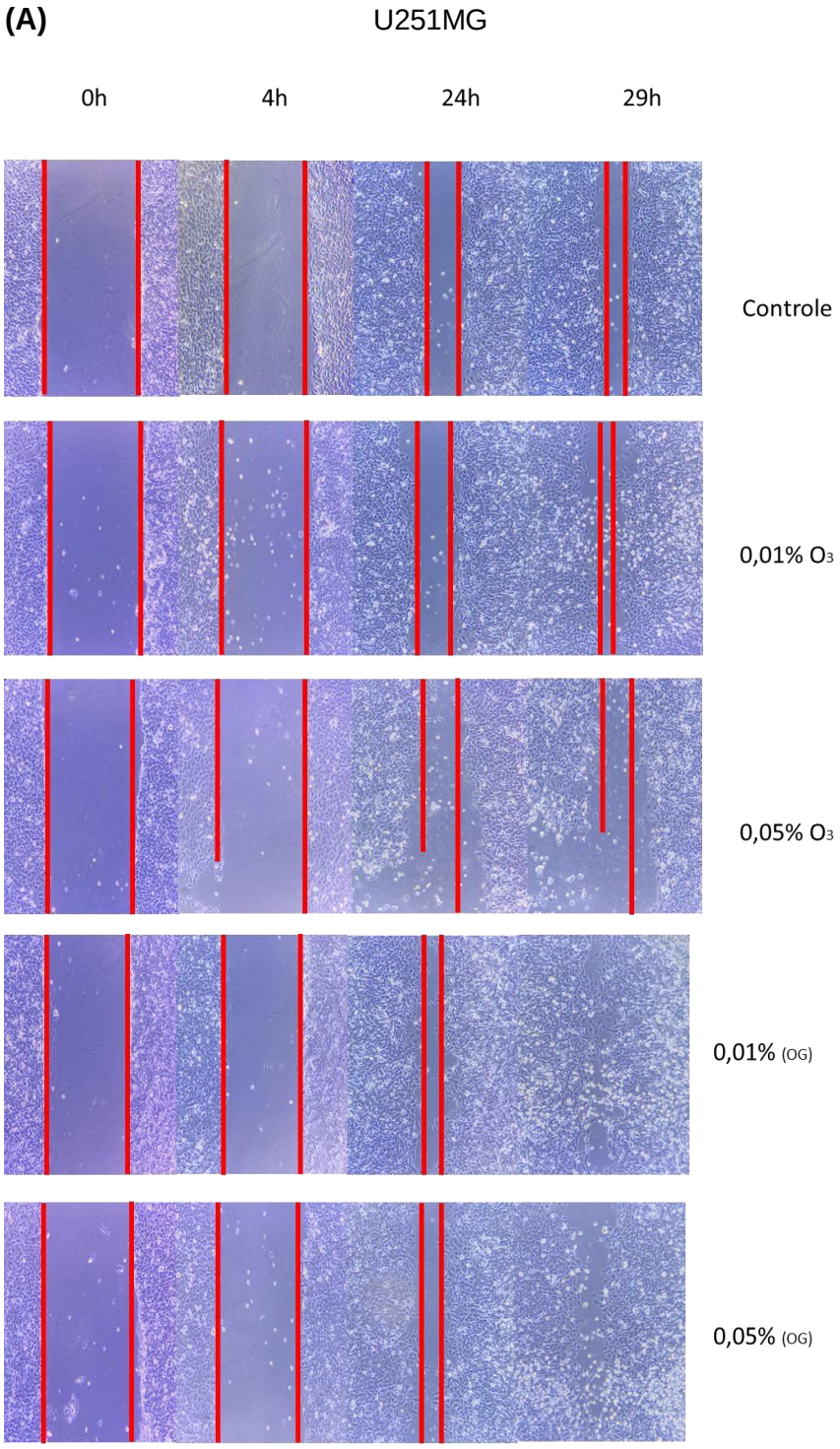


2.2. AVALIAÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

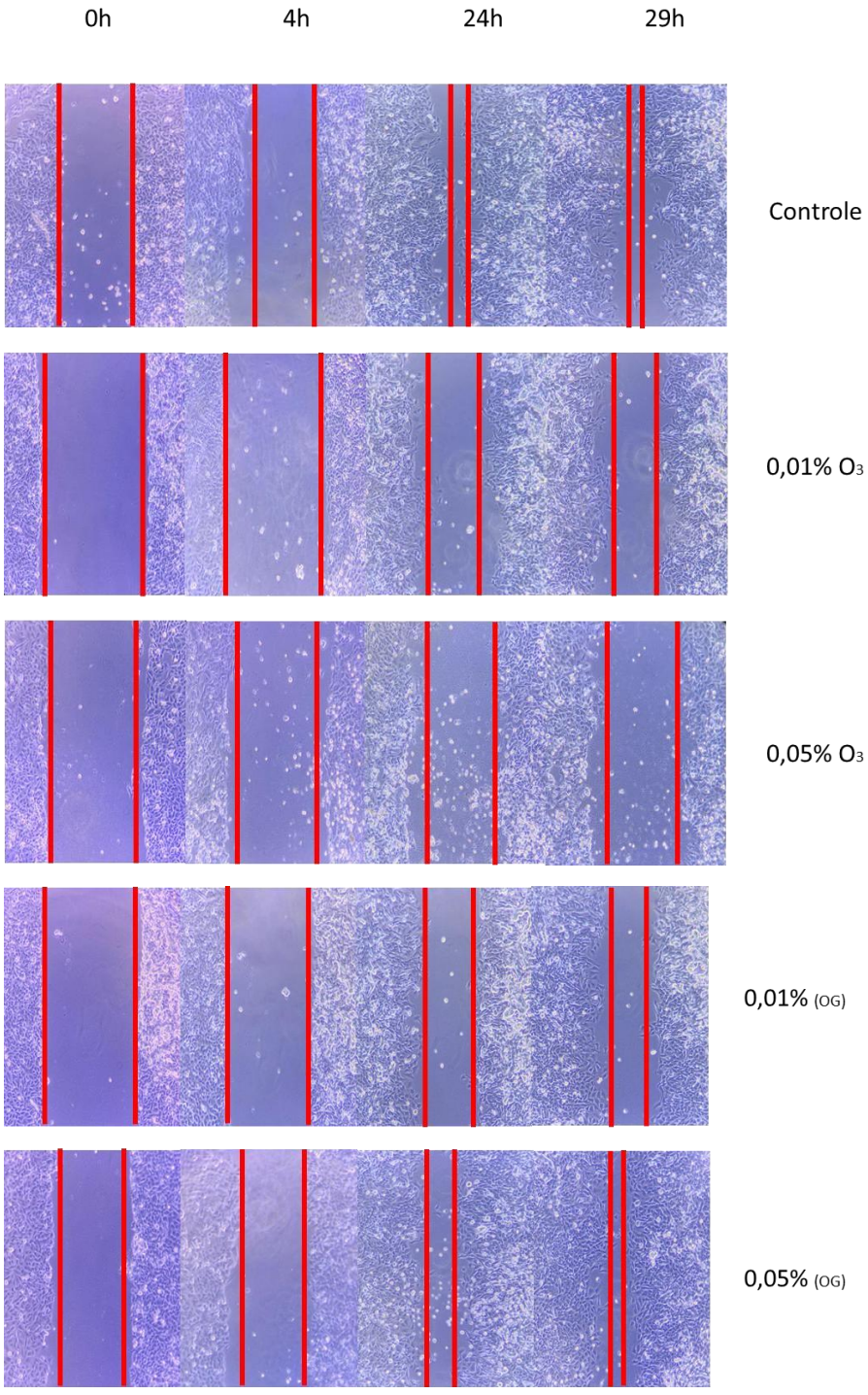
Considerando que o óleo de girassol ozonizado diminuiu a viabilidade celular e a formação de colônias, realizou-se o ensaio de migração celular, a fim de investigar o potencial do composto em inibir a migração das células.

Pode-se observar que, nas duas linhagens analisadas, a menor migração ocorreu na concentração de 0,05 % do óleo ozonizado, quando comparada ao controle. A linhagem U343MG demonstrou-se mais sensível ao tratamento, como pode ser observado na figura 6 D. Já na concentração de 0,01 % houve uma ligeira diminuição em relação ao controle para as duas linhagens.

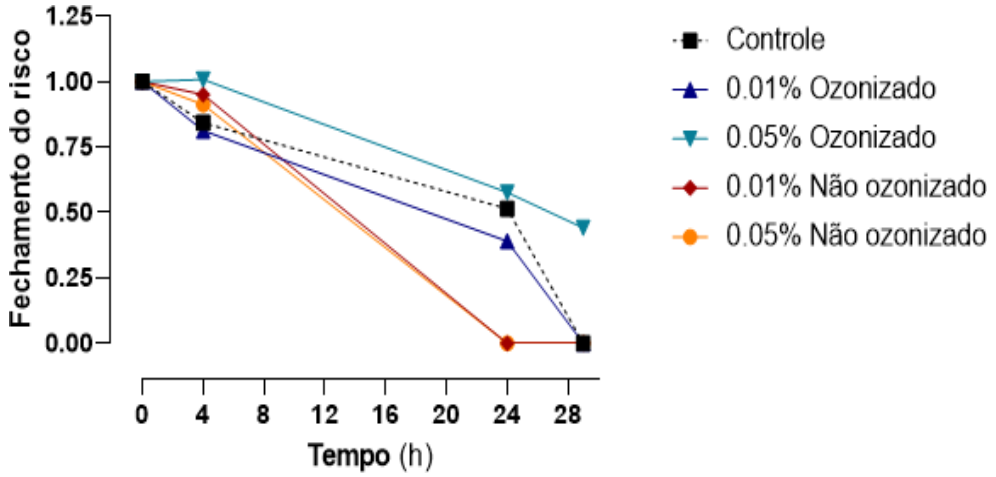
Figura 6 - Avaliação da migração celular pelo ensaio de *scratch test* em linhagens de GBM tratadas com óleo de girassol ozonizado. Imagens representativas foram criadas a partir de um risco feito com uma pipeta de 200 µL e tiradas no microscópio óptico nos tempos de 0, 4, 24 e 29h após o tratamento com o óleo de girassol ozonizado (0,01 e 0,05%) e não ozonizado (0,01 e 0,05%) (A) imagens representativas da U251MG (B) imagens representativas da U343MG (C) Porcentagens de fechamento do risco em 0, 4, 24 e 29 horas após o risco para linhagem U251MG (D) Porcentagens de fechamento do risco em 0, 4, 24 e 29 horas após o risco para linhagem U343MG.



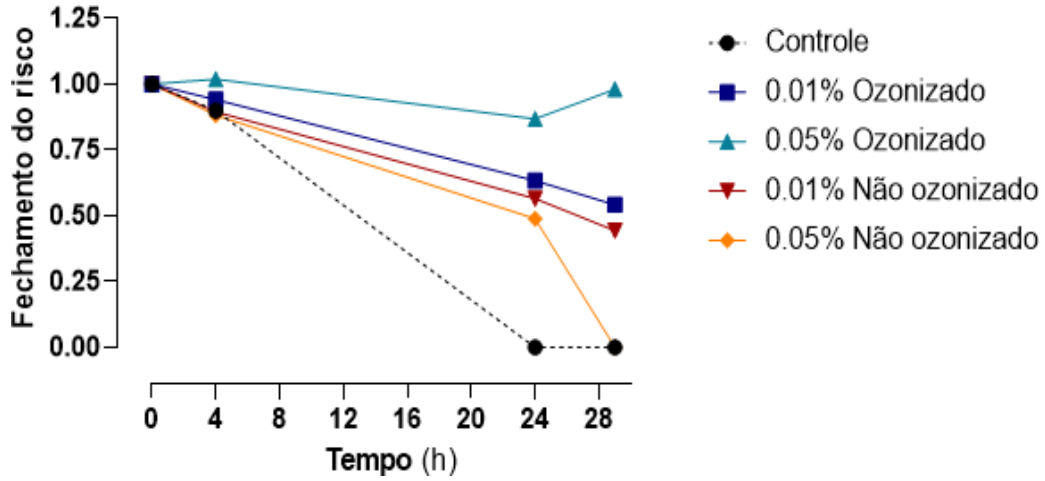
(B) U343MG



(C) U251MG



(D) U343MG



2.3. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

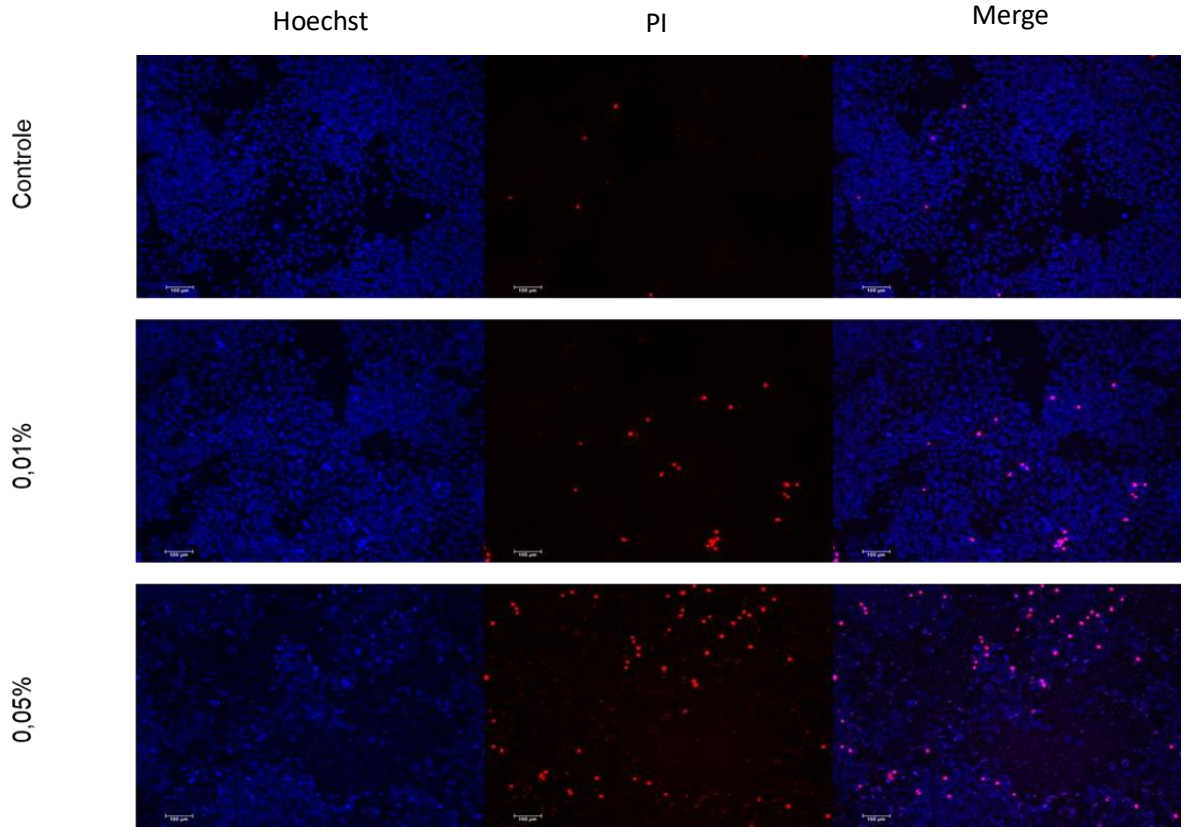
De modo a comprovar o efeito citotóxico do óleo ozonizado observado em experimentos anteriores, ambas linhagens foram incubadas por 24 horas com duas concentrações diferentes de tratamento (0,01% e 0,05%). Em seguida, as células foram coradas com os fluoróforos Hoechst e PI. O PI se liga ao DNA de células com danos na membrana plasmática (GRAHAM *et al.*, 1990) e cora o núcleo de vermelho, enquanto o Hoechst se liga ao DNA de todas as células e cora o núcleo de azul (CASEY *et al.*, 1993).

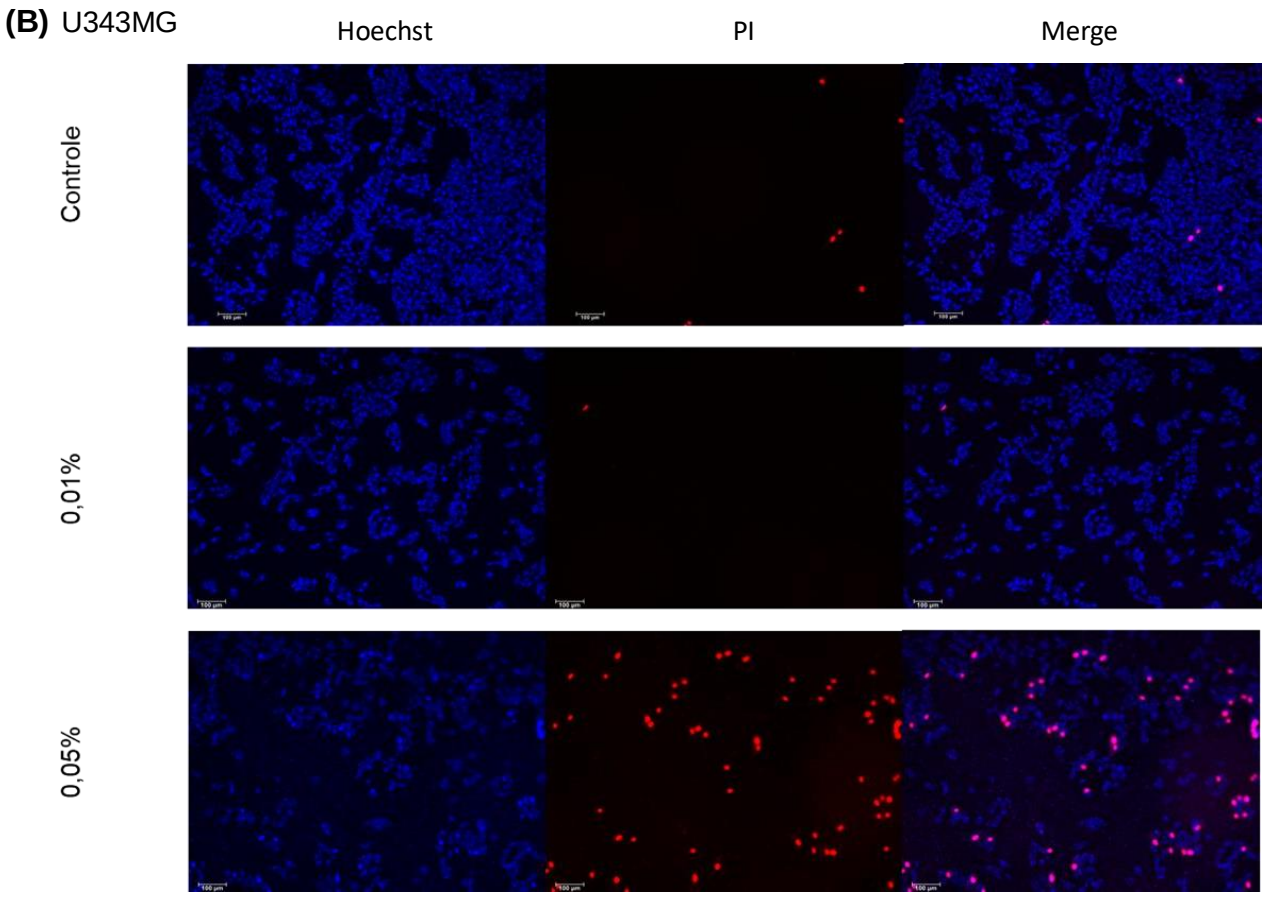
Como resultado, verificamos uma relação direta entre o número de células mortas ou de viabilidade reduzida com a concentração do tratamento empregado, em que a concentração 0,01% apresentou uma quantidade igual ou pouco superior ao controle de células marcadas com o PI enquanto que a concentração citotóxica de 0,05% há um número elevado de células coradas em vermelho, confirmando de maneira qualitativa os resultados anteriores.

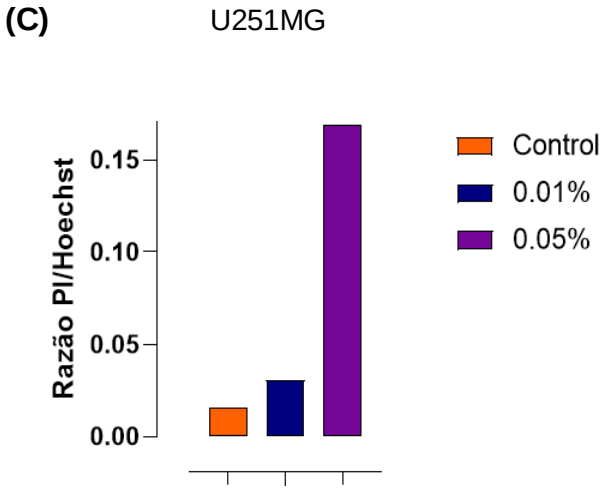
A linhagem U251MG (Figura 7A), contudo, demonstrou-se mais sensível ao tratamento de menor concentração quando comparado a linhagem U343MG (Figura 7B) o que, porém, pode ser atribuído a sua maior capacidade replicativa o que implica em um número maior de células.

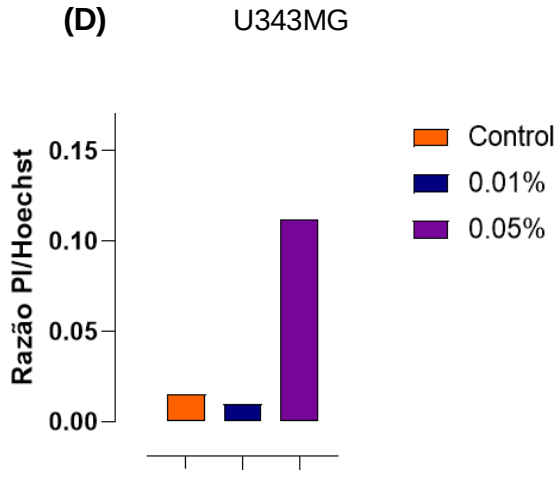
Figura 7 - Análise da dupla marcação de hoechst e Iodeto de propideo em linhagens de GBM após incubação com óleo de girassol ozonizado. As células foram incubadas por 24 horas a 37 ºC em atmosfera de CO_2 5,0 % com óleo de girassol ozonizado 0,01 e 0,05% ou com DMSO (controle). Após esse período, as células foram marcadas com Hoechst 33258 (8 μM) e PI (1,5μM) e a reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi avaliada por microscopia de fluorescência (aumento: 10x), usando o conjunto de filtros e espelhos dicróicos A4 (Ex.: 360/40, Espelho dicróico: 400 nm: Filtro BP: 470/40) e Y3 (Ex: 620/60, Espelho dicróico: 660; Filtro BP: 700/75) utilizando o software Leica Application Suite (Leica Microsystems, Germany). (A) U251MG (B) U343MG (C) gráfico representativo da razão PI/Hoechst da linhagem U251MG (D) gráfico representativo da razão PI/Hoechst da linhagem U343MG.

(A) U251MG




(B) U343MG
Hoechst
PI
Merge
Controle
0,01%
0,05%


(C)
U251MG
Razão PI/Hoechst
0.15
0.10
0.05
0.00
Control
0.01%
0.05%


(D)
U343MG
Razão PI/Hoechst
0.15
0.10
0.05
0.00
Control
0.01%
0.05%

3. DISCUSSÃO

O glioblastoma multiforme (GBM) é uma das neoplasias cerebrais mais agressivas, caracterizada por crescimento rápido e invasão de tecidos adjacentes (FERNANDES *et al.*, 2023). O prognóstico é variável devido à dificuldade de diagnóstico precoce e à resistência do câncer à TMZ. A doxorrubicina, comumente administrada em combinação com TMZ, induz estresse oxidativo em células neoplásicas, motivando o uso de óleo peroxidado por ozonização, dado o forte poder oxidante do ozônio (UYSAL, 2014; GUZAUSKAS *et al.*, 2018).

O ensaio de redução do MTT é amplamente utilizado para avaliar a viabilidade celular, pois apenas células metabolicamente ativas são capazes de reduzir o sal de tetrazólio em cristais de formazan (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015). Nosso estudo mostrou que o óleo de girassol peroxidado apresentou citotoxicidade de forma dependente da concentração nas linhagens celulares de glioblastoma, em comparação com o óleo de girassol não ozonizado. Sugerimos que o aumento da concentração de ozônio foi responsável pela diminuição da viabilidade celular, pois, segundo Izzotti *et al*. (2022), o uso de óleos ozonizados com alto teor de ozonídeos diminui a viabilidade celular das células cancerígenas, causando danos mitocondriais, liberação de cálcio intracelular e, por fim, apoptose.

Os valores de EC50 mostraram que a linhagem U251MG é mais sensível ao óleo ozonizado, com um valor de 0,030%, em comparação à linhagem U343MG, com um valor de 0,050%. No estudo de Izzotti e colaboradores (2022), foi verificado que óleos ozonizados com baixo teor de ozonídeos foram incapazes de reduzir a porcentagem de células vivas. Observamos que a redução da viabilidade celular é dependente da concentração, não havendo redução significativa para compostos muito diluídos, mas uma grande diminuição para concentrações acima de 0,05%.

Para complementar o ensaio de viabilidade celular, avaliamos a citotoxicidade do óleo de girassol ozonizado por microscopia de fluorescência, utilizando os fluoróforos Hoechst e PI. O Hoechst ultrapassa a membrana celular de todas as células, enquanto o PI é impermeável a membranas plasmáticas íntegras (GRAHAM *et al.*, 1990; CASEY *et al.*, 1993). Mostramos que o aumento da concentração de óleo ozonizado diminuiu a viabilidade celular. A linhagem U251MG apresentou maior sensibilidade ao óleo ozonizado, o que pode estar relacionado à sua maior capacidade proliferativa. No entanto, deve-se considerar a hipótese de que o óleo de girassol possa apresentar melhores resultados em subtipos específicos de glioblastoma.

O ensaio clonogênico é um método utilizado em cultura celular de glioblastoma, pois avalia a capacidade das células de formar colônias. Staffieri *et al*. (2023) mostraram que a associação

entre TMZ e Aloe Emodina, um composto natural encontrado em plantas como Aloe vera, diminuiu a formação de colônias em células de glioblastoma. Comparativamente, nosso estudo mostrou que a concentração de 0,05% de óleo ozonizado foi capaz de inibir completamente a formação de colônias em ambas as linhagens estudadas após sete dias de tratamento, além disso, levanta a possibilidade de realizar estudos associando o óleo ozonizado a TMZ.

O ensaio de migração celular é utilizado para avaliar a capacidade das células tumorais de se moverem e preencherem a área arranhada. Jin *et al*. (2009) avaliaram a capacidade do ácido hialurônico em inibir a migração celular e demonstraram que o composto inibiu mais efetivamente a linhagem U343MG em comparação com a linhagem U251MG, corroborando os resultados encontrados neste estudo. No entanto, Jin *et al*. (2009) mostraram que no ensaio de invasão celular, a linhagem U343MG apresentou menor capacidade de invasão comparada à U251MG, embora em nosso estudo este ensaio ainda não tenha sido realizado.

Ademais, a literatura carece de estudos sobre os efeitos de óleos ozonizados no câncer, sendo necessária a elaboração de estudos complementares para elucidar os efeitos e possíveis mecanismos de ação desses compostos. Isso permitirá traçar comparativos fidedignos aos resultados obtidos neste projeto e fortalecer a compreensão dos benefícios terapêuticos potenciais do óleo de girassol ozonizado no tratamento do GBM.

4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, observamos que o óleo de girassol ozonizado se demonstrou citotóxico a células cancerígenas, reduzindo a sua viabilidade. Além disso, o óleo peroxidado também diminuiu a porcentagem de migração celular e capacidade das células de formar colônias nas diferentes linhagens de glioblastoma estudadas (U251MG e U343MG), diferentemente do observado com o óleo de girassol não ozonizado, em que houve pouco ou nenhum efeito nas mesmas condições experimentais. Entretanto, mesmo com os resultados obtidos, estudos futuros são necessários desvendar o mecanismo de ação do fármaco e verificar o seu efeito em diferentes tipos de câncer.

REFERÊNCIAS

ADAMSON, C., KANU, O. O., MEHTA, A. I., DI, C., LIN, N., MATTOX, A. K., & Bigner, D. D. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, p. 1061–1083, 2009.

ALLEN NJ, LYONS DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. **Science**. 2018 Oct 12;362(6411):181-185. doi: 10.1126/science.aat0473. PMID: 30309945; PMCID: PMC6292669.

ALMUHAYAWI MS, ALRUHAILI MH, TARABULSI MK, AL JAOUNI SK, ALQURASHI AA, ALRADDADI FA, BUKHARI DA, ALBASRI HM, WAZNAH MS, SELIM S. Pharmacological activities and phytochemical evaluation of coconut crude oil and upon exposure to ozone. **AMB Express**. 2025 Jan 2;15(1):3. doi: 10.1186/s13568-024-01813-1. PMID: 39747767; PMCID: PMC11695546.

AL-RAJHI AMH, ABDELGHANY TM, ALMUHAYAWI MS, ALRUHAILI MH, SADDIQ AA, BAGHDADI AM, AL JAOUNI SK, ALBASRI HM, WAZNAH MS, ALRADDADI FA, SELIM S. Effect of ozonation on the phytochemicals of black seed oil and its anti-microbial, anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-neoplastic activities in vitro. **Sci Rep**. 2024 Dec 11;14(1):30445. doi: 10.1038/s41598-024-81157-9. PMID: 39663384; PMCID: PMC11634964.

AN Z, AKSOY O, ZHENG T, FAN QW, WEISS WA. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: Signaling pathways and targeted therapies. **Oncogene**. 2018;37:1561–1575. doi: 10.1038/s41388-017-0045-7.

BAILLIE N., CARR A.C., PENG S. The use of intravenous vitamin C as a supportive therapy for a patient with glioblastoma multiforme. **Antioxidants.** 2018;7:115. doi: 10.3390/antiox7090115.

BALOI, C., Oprita A., Semenescu L. E., Tache D. E., Popescu O. S., Staicu G. A., Dricu A. Combined Effects of Doxorubicin and Temozolomide in Cultured Glioblastoma Cells. **PubMed**, v. 48, n. 3, p. 263–269, 2023.

BARABUTIS N, SCHALLY AV, SIEJKA A. P53, GHRH, inflammation and cancer. **EBioMedicine**. 2018 Nov;37:557-562. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.10.034. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30344124; PMCID: PMC6284454.

BEGLEY S, CHEN A, SCHULDER M, GOENKA A. NCMP-11. Assessing survival outcomes of pcv-based and temozolomide-based adjuvant therapy in oligodendroglioma patients. **Neuro Oncol**. 2023 Nov 10;25(Suppl 5):v209. doi: 10.1093/neuonc/noad179.0795. PMCID: PMC10640328.

BISEROVA, K., Jakovlevs, A., Uljanovs, R., Strumfa, I. Cancer Stem Cells: Significance in Origin, Pathogenesis and Treatment of Glioblastoma. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 621, 2021.

BORGES KRA, WOLFF LAS, DA SILVA MACN, DE CARVALHO SILVA AK, CAMPOS CDL, SOUZA FS, TELES AM, VALE AÁM, PASCOA H, LIMA EM, DE SOUSA EM, NUNES ACS, GIL DA COSTA RM, FAUSTINO-ROCHA AI, CARDOSO CARVALHO R, NASCIMENTO MDDSB. Açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) Seed Oil and Its Nanoemulsion:

Chemical Characterisation, Toxicity Evaluation, Antioxidant and Anticancer Activities**. Curr Issues Mol Biol**. 2024 Apr 23;46(5):3763-3793. doi: 10.3390/cimb46050235. PMID: 38785503; PMCID: PMC11120212.

BOTA DA, ALEXANDRU-ABRAMS D, PRETTO C, HOFMAN FM, CHEN TC, FU B, CARRILLO JA, SCHIJNS VE, STATHOPOULOS A. Use of ERC-1671 Vaccine in a Patient with Recurrent Glioblastoma Multiforme after Progression during Bevacizumab Therapy: First Published Report. **Perm J**. 2015 Spring;19(2):41-6. doi: 10.7812/TPP/14-042. Epub 2015 Mar 1. PMID: 25785641; PMCID: PMC4403580.

BRAGA CQ, ZAMBRANO CG, DOS SANTOS BERMANN C, MILECH A, IANISKI LB, SOARES MP, PÖTTER L, DE AVILA BOTTON S, PEREIRA DIB. In vitro and ex vivo anti-Pythium insidiosum potential of ozonated sunflower oil. **Braz J Microbiol**. 2024 Mar;55(1):867-873. doi: 10.1007/s42770-023-01173-1. Epub 2023 Nov 24. PMID: 37999913; PMCID: PMC10920596.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes para a gestão do SUS: Manual de orientações. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: http://www.saude.gov.br/sus/diretrizes. Acesso em: 26 dez. 2024.

CAO C, YIN H, YANG B, YUE Q, WU G, GU M, ZHANG Y, FAN Y, DONG X, WANG T, WANG C, ZHU X, MAO Y, ZHANG XY, LEI Z, LI C. Intra-Operative Definition of Glioma Infiltrative Margins by Visualizing Immunosuppressive Tumor-Associated Macrophages. **Adv Sci** (Weinh). 2023 Oct;10(28):e2304020. doi: 10.1002/advs.202304020. Epub 2023 Aug 6. PMID: 37544917; PMCID: PMC10558635.

CARDOSO, I. C. C., *et al*. Potencial antimicrobiano de óleos vegetais ozonizados frente a espécies bacterianas: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e22410212451-e22410212451, 2021.

CASEY, P. J., HILLMAN, R. B., ROBERTSON, K. R., YUDIN, A. I., LIU, I. K., & DROBNIS, E. Z. (1993). Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, 14(4), 289–297. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1993.tb03367.x

CASTANEDA M, DEN HOLLANDER P, KUBURICH NA, ROSEN JM, MANI SA. Mechanisms of cancer metastasis. **Semin Cancer Biol**. 2022 Dec;87:17-31. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.10.006. Epub 2022 Oct 27. PMID: 36354098.

CATTEL, F., Giordano S., Bertiond C., Lupia T., Corcione S., Scaldaferri M., Angelone L., De Rosa F. G. Ozone therapy in COVID-19: A narrative review. **Virus Research**, v. 291, p. 198207, 2021.

CHEN J, ZHUANG YD, ZHANG Q, LIU S, ZHUANG BB, WANG CH, LIANG RS. Exploring the mechanism of cordycepin combined with doxorubicin in treating glioblastoma based on network pharmacology and biological verification. **PeerJ**. 2022 Feb 15;10:e12942. doi: 10.7717/peerj.12942. PMID: 35186504; PMCID: PMC8855715.

CHEN S, CAO Z, PRETTNER K, KUHN M, YANG J, JIAO L, WANG Z, LI W, GELDSETZER P, BÄRNIGHAUSEN T, BLOOM DE, WANG C. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to

2050. **JAMA Oncol**. 2023 Apr 1;9(4):465-472. doi: 10.1001/jamaoncol.2022.7826. PMID: 36821107; PMCID: PMC9951101.

CHENG WY, SHEN CC, LIANG YJ, CHIAO MT, YANG YC, HSIEH WY, LIN CH, CHEN JP. Polymorphism at codon 31 of CDKN1A (p21) as a predictive factor for bevacizumab therapy in glioblastoma multiforme. **BMC Cancer**. 2023 Sep 20;23(1):886. doi: 10.1186/s12885-023-11400-5. PMID: 37730565; PMCID: PMC10510274.

CRESPO I, VITAL AL, GONZALEZ-TABLAS M, PATINO MDEL C, OTERO A, LOPES MC, DE OLIVEIRA C, DOMINGUES P, ORFAO A, TABERNERO MD. Alterações moleculares e genômicas no glioblastoma multiforme. **Am J Pathol**. 2015; 185:1820–1833. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.02.023.

CZARNYWOJTEK A, BOROWSKA M, DYRKA K, VAN GOOL S, SAWICKA-GUTAJ N, MOSKAL J, KOŚCIŃSKI J, GRACZYK P, HAŁAS T, LEWANDOWSKA AM, CZEPCZYŃSKI R, RUCHAŁA M. Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques. **Pharmacology.** 2023;108(5):423-431. doi: 10.1159/000531319. Epub 2023 Jul 17. PMID: 37459849.

DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Migration and Invasion. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 70, n. 2, p. 217–228, 2004.

DE LA CRUZ-LOPEZ K.G., CASTRO-MUNOZ L.J., REYES-HERNANDEZ D.O., GARCIA-CARRANCA A., MANZO-MERINO J. Lactato na Regulação do Microambiente Tumoral e Abordagens Terapêuticas. Frente. **Oncol**. 2019;9:1143. DOI: 10.3389/fonc.2019.01143.

DHUNGEL L, ROWSEY ME, HARRIS C, RAUCHER D. Synergistic Effects of Temozolomide and Doxorubicin in the Treatment of Glioblastoma Multiforme: Enhancing Efficacy through Combination Therapy. **Molecules**. 2024 Feb 14;29(4):840. doi: 10.3390/molecules29040840. PMID: 38398592; PMCID: PMC10893495.

DÍAZ, M. F., Hernández, R., Martínez, G., Vidal, G., Gómez, M., Fernández, H., Garcés, R. Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 403–407, 2006.

DUNCAN K, ARAFAH B, ROGERS L. DDRE-41. treatment of refractory pituitary neoplasms with temozolomide in three patients. **Neuro Oncol**. 2021 Nov 12;23(Suppl 6):vi83. doi: 10.1093/neuonc/noab196.325. PMCID: PMC8598771.

FARES J, FARES MY, KHACHFE HH, SALHAB HA, FARES Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduct Target Ther**. 2020 Mar 12;5(1):28. doi: 10.1038/s41392-020-0134-x. PMID: 32296047; PMCID: PMC7067809.

FENG Y, CHEN X, ZHENG Y, LIU Q, CHEN H, CAI Y, CAO L, LAI X, PAN L, LI Y, WANG SY. Prognostic value and susceptibility of BAX rs4645878 polymorphism in cancer: A systematic review and meta-analysis. **Medicine** (Baltimore). 2018 Jul;97(29):e11591. doi: 10.1097/MD.0000000000011591. PMID: 30024563; PMCID: PMC6086507.

FERRARA N, HILLAN KJ, GERBER HP, NOVOTNY W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. **Nat Rev Drug Discov**. 2004 May;3(5):391-400. doi: 10.1038/nrd1381. PMID: 15136787.

FERNANDES, R. T., TEIXEIRA, G. R., MAMERE, E. C., BANDEIRA, G. A., MAMERE, A. E. Nova classificação das neoplasias gliais segundo a Organização Mundial da Saúde 2021, com enfoque radiológico. **Radiologia Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 157–161, jun. 2023.

GRAHAM, J. K., KUNZE, E., & HAMMERSTEDT, R. H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, 43(1), 55–64. https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.55

GITTLEMAN H., LIM D., KATTAN M.W., CHAKRAVARTI A., GILBERT M.R., LASSMAN A.B., LO S.S., MACHTAY M., SLOAN A.E., SULMAN E.P., TIAN D., VOGELBAUM M.A., WANG T.J.C., PENAS-PRADO M., YOUSSEF E., BLUMENTHAL D.T., ZHANG P., MEHTA M.P., BARNHOLTZ-SLOAN J.S., An independently validated nomogram for individualized estimation of survival among patients with newly diagnosed glioblastoma: NRG oncology RTOG 0525 and 0825. **Neuro Oncology**, 19 (5), p. 669–677, 2017.

GISINA A, KHOLODENKO I, KIM Y, ABAKUMOV M, LUPATOV A, YARYGIN K. Glioma Stem Cells: Novel Data Obtained by Single-Cell Sequencing. Int J Mol Sci. 2022 Nov 17;23(22):14224. doi: 10.3390/ijms232214224. PMID: 36430704; PMCID: PMC9694247.

GROCHANS S, CYBULSKA AM, SIMIŃSKA D, KORBECKI J, KOJDER K, CHLUBEK D, BARANOWSKA-BOSIACKA I. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. **Cancers** (Basel). 2022 May 13;14(10):2412. doi: 10.3390/cancers14102412. PMID: 35626018; PMCID: PMC9139611.

GUZAUSKAS, G. F.; SALZBERG, M.; WANG, B. C. Estimated lifetime survival benefit of tumor treating fields and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma patients. **CNS Oncology**, v. 7, n. 3, p. CNS23, 2018.

HAMBARDZUMYAN D, GUTMANN DH, KETTENMANN H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. **Nat Neurosci**. 2016 Jan;19(1):20-7. doi: 10.1038/nn.4185. PMID: 26713745; PMCID: PMC4876023.

HANAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**. 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell**. 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of cancer: the next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANGEL G, SCHMITZ-ABECASSIS B, SOLLMANN N, PINTO J, ARZANFOROOSH F, BARKHOF F, BOOTH T, CALVO-IMIRIZALDU M, CASSIA G, CHMELIK M, CLEMENT P, ERCAN E, FERNÁNDEZ-SEARA MA, FURTNER J, FUSTER-GARCIA E, GRECH-SOLLARS M, GUVEN NT, HATAY GH, KARAMI G, KEIL VC, KIM M, KOEKKOEK JAF, KUKRAN S, MANCINI L, NECHIFOR RE, ÖZCAN A, OZTURK-ISIK E, PISKIN S, SCHMAINDA KM, SVENSSON SF, TSENG CH, UNNIKRISHNAN S, VOS F, WARNERT E, ZHAO MY, JANCALEK R, NUNES T, HIRSCHLER L, SMITS M, PETR J, EMBLEM KE. Advanced MR Techniques for Preoperative Glioma Characterization: Part 2. **J Magn Reson Imaging**. 2023 Jun;57(6):1676-1695. doi: 10.1002/jmri.28663. Epub 2023 Mar 13.

Erratum in: J Magn Reson Imaging. 2024 Apr;59(4):1468. doi: 10.1002/jmri.28934. PMID: 36912262; PMCID: PMC10947037.

HANIF, F., MUZAFFAR, K., PERVEEN, K., MALHI, S. M., & SIMJEE, S. U.Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, p. 3–9, 2017.

HARRIS S. ROSE E DAVID E. GOLAN. **Farmacodinâmica.** [s.l.] UFSC, 2015.

HAUMANN R, VIDEIRA JC, KASPERS GJL, VAN VUURDEN DG, HULLEMAN E. Overview of current drug delivery methods across the blood–brain barrier for the treatment of primary brain tumors. **CNS Drugs** (2020) 34:1121–31. doi: 10.1007/s40263-020-00766-w

HERNÁNDEZ, A., VIÑALS M., ISIDORO T., VILÁS F. Potential Role of Oxygen–Ozone Therapy in Treatment of COVID-19 Pneumonia. **American Journal of Case Reports**, v. 21, 2020.

HOFMARCHER T, LINDGREN P, WILKING N, JÖNSSON B. The cost of cancer in Europe 2018. **Eur J Cancer**. 2020 Apr;129:41-49. doi: 10.1016/j.ejca.2020.01.011. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32120274.

HOUSMANN, GENEVIEVE *et al*. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769-1792, 2014.

HU J, CAO J, TOPATANA W, JUENGPANICH S, LI S, ZHANG B, SHEN J, CAI L, CAI X, CHEN M. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. **J Hematol Oncol**. 2021 Sep 28;14(1):157. doi: 10.1186/s13045-021-01169-0. PMID: 34583722; PMCID: PMC8480024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. Disponível em: 1. Acesso em: 24 dez. 2024.

ILANGO S, PAITAL B, JAYACHANDRAN P, PADMA PR, NIRMALADEVI R. Epigenetic alterations in cancer. **Front Biosci** (Landmark Ed). 2020 Mar 1;25(6):1058-1109. doi: 10.2741/4847. PMID: 32114424.

IORIO, F. B. R. D., LIBERATORE A. M. A., KOH I. H. J., OTANI C., CAMILO F. F. Ozonated Mineral Oil: Preparation, Characterization and Evaluation of the Microbicidal Activity. **Ozone: Science & Engineering**, v. 38, n. 4, p. 253–260, 2016.

IZZOTTI A. Oxidative Drugs and microRNA: New Opportunities for Cancer Prevention. **Cancers** (Basel). 2022 Dec 26;15(1):132. doi: 10.3390/cancers15010132. PMID: 36612131; PMCID: PMC9817950.

IZZOTTI, A., FRACCHIA E., ROSANO C., COMITE C., BELGIOIA L., SCIACCA S., KHALID Z., CONGIU M., COLAROSSI C., BLANCO G., SANTORO A., CHIARA M., PULLIERO A. Efficacy of High-Ozonide Oil in Prevention of Cancer Relapses Mechanisms and Clinical Evidence. **Cancers**, v. 14, n. 5, p. 1174, 2022.

JIAPAER S, FURUTA T, TANAKA S, KITABAYASHI T, NAKADA M. Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. **Neurol Med Chir** (Tokyo) (2018) 58:405–21. doi: 10.2176/nmc.ra.2018-0141

JIN SG, JEONG YI, JUNG S, RYU HH, JIN YH, KIM IY. O efeito do ácido hialurônico na invasividade de células malignas de glioma: comparação do potencial de invasão no hidrogel e matrigel do ácido hialurônico. **J Korean Neurosurg Soc**. 2009 Nov; 46(5):472-8. DOI: 10.3340/jkns.2009.46.5.472. Epub 2009 30 de novembro. PMID: 20041058; PMCID: PMC2796354.

JOMOVA K, RAPTOVA R, ALOMAR SY, ALWASEL SH, NEPOVIMOVA E, KUCA K, VALKO M. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. **Arch Toxicol**. 2023 Oct;97(10):2499-2574. doi: 10.1007/s00204-023-03562-9. Epub 2023 Aug 19. PMID: 37597078; PMCID: PMC10475008.

KHABIBOV M, GARIFULLIN A, BOUMBER Y, KHADDOUR K, FERNANDEZ M, KHAMITOV F, KHALIKOVA L, KUZNETSOVA N, KIT O, KHARIN L. Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). **Int J Oncol**. 2022 Jun;60(6):69. doi: 10.3892/ijo.2022.5359. Epub 2022 Apr 21. PMID: 35445737; PMCID: PMC9084550.

KIRI S, RYBA T. Câncer, metástase e epigenoma. **Câncer Mol**. 2 de agosto de 2024; 23(1):154. DOI: 10.1186/S12943-024-02069-W. PMID: 39095874; PMCID: PMC11295362.

KOSTKA K, SOKOLOVA V, EL-TAIBANY A, KRUSE B, PORADA D, WOLFF N, PRYMAK O, SEEDS MC, EPPLE M, ATALA AJ. The Application of Ultrasmall Gold Nanoparticles (2 nm) Functionalized with Doxorubicin in Three-Dimensional Normal and Glioblastoma Organoid Models of the Blood-Brain Barrier. **Molecules**. 2024 May 24;29(11):2469. doi: 10.3390/molecules29112469. PMID: 38893345; PMCID: PMC11173746.

LEI FJ, CHIANG JY, CHANG HJ, CHEN DC, WANG HL, YANG HA, WEI KY, HUANG YC, WANG CC, WEI ST, HSIEH CH. Cellular and exosomal GPx1 are essential for controlling hydrogen peroxide balance and alleviating oxidative stress in hypoxic glioblastoma. **Redox Biol**. 2023 Sep;65:102831. doi: 10.1016/j.redox.2023.102831. Epub 2023 Aug 5. PMID: 37572455; PMCID: PMC10428075.

LI J, FENG L, LU Y. Glioblastoma multiforme: Diagnosis, treatment, and invasion. **J Biomed Res**. 2022 Oct 28;37(1):47-58. doi: 10.7555/JBR.36.20220156. PMID: 36403983; PMCID: PMC9898042.

LI Y, PU R. Ozone Therapy for Breast Cancer: An Integrative Literature Review. **Integr Cancer Ther**. 2024 Jan-Dec;23:15347354241226667. doi: 10.1177/15347354241226667. PMID: 38258533; PMCID: PMC10807353.

LI Y, YUAN C, CHEN D, XU S, JIANG W, HUANG J, YE S, ZHANG Y, LIANG J, LIU C. Comparison of Different Head Tilt Angles in Tomotherapy and Volumetric Modulated Arc Therapy for Hippocampal-Avoidance Whole-Brain Radiotherapy. **Technol Cancer Res Treat**. 2024 Jan-Dec;23:15330338241281326. doi: 10.1177/15330338241281326. PMID: 39233627; PMCID: PMC11375751.

LI Y, YAN J, YANG P. The mechanism and therapeutic strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity: Role of programmed cell death. **Cell Stress Chaperones**. 2024 Oct;29(5):666-680. doi: 10.1016/j.cstres.2024.09.001. Epub 2024 Sep 27. Erratum in: Cell

Stress Chaperones. 2024 Dec;29(6):720. doi: 10.1016/j.cstres.2024.10.005. PMID: 39343295; PMCID: PMC11490929.

LIU DN, ZHANG WF, FENG WD, XU S, FENG DH, SONG FH, ZHANG HW, FANG LH, DU GH, WANG YH. Chrysomycin A Reshapes Metabolism and Increases Oxidative Stress to Hinder Glioblastoma Progression. **Mar Drugs**. 2024 Aug 29;22(9):391. doi: 10.3390/md22090391. PMID: 39330272; PMCID: PMC11433325.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; WESSELING, P.; BRAT, D. J.; CREE, I. A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; HAWKINS, C.; NG, H. K.; PFISTER, S. M.; REIFENBERGER, G.; SOFFIETTI, R.; VON DEIMLING, A.; ELLISON, D. W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021. DOI: 10.1093/neuonc/noab106.

MAJD NK, VO HH, MORAN CA, WEATHERS SP, SONG IW, WILLIFORD GL, RODON J, FU S, TSIMBERIDOU AM. Metastatic extraneural glioblastoma diagnosed with molecular testing. **Oncologist**. 2024 Sep 6;29(9):811-816. doi: 10.1093/oncolo/oyae115. PMID: 38837109; PMCID: PMC11379637.

MAKSIMENKO, O., MALINOVSKAYA J., SHIPULO E., OSIPOVA N., RAZZHIVINA V., ARANTSEVA D., YAROVAYA O., MOSTOVAYA U., KHALANSKY A., FEDOSEEVA V., ALEKSEEVA A., VANCHUGOVA L., GORSHKOVA M., KOVALENKO E., BALABANYAN V., MELNIKOV P., BAKLAUSHEV V., CHEKHONIN V., KREUTER J., GELPERINA S. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, p. 118733, 2019.

MICHAELSEN SR, STABERG M, PEDERSEN H, JENSEN KE, MAJEWSKI W, BROHOLM H, NEDERGAARD MK, MEULENGRACHT C, URUP T, VILLINGSHØJ M, LUKACOVA S, SKJØTH-RASMUSSEN J, BRENNUM J, KJÆR A, LASSEN U, STOCKHAUSEN MT, POULSEN HS, HAMERLIK P. VEGF-C sustains VEGFR2 activation under bevacizumab therapy and promotes glioblastoma maintenance. **Neuro Oncol**. 2018 Oct 9;20(11):1462-1474. doi: 10.1093/neuonc/noy103. PMID: 29939339; PMCID: PMC6176801.

MODREK AS, BAYIN NS, PLACANTONAKIS DG. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. **World J Stem Cells**. 2014;6:43–52. doi: 10.4252/wjsc.v6.i1.43.

MOHAMMAD RM, MUQBIL I, LOWE L, YEDJOU C, HSU HY, LIN LT, SIEGELIN MD, FIMOGNARI C, KUMAR NB, DOU QP, YANG H, SAMADI AK, RUSSO GL, SPAGNUOLO C, RAY SK, CHAKRABARTI M, MORRE JD, COLEY HM, HONOKI K, FUJII H, GEORGAKILAS AG, AMEDEI A, NICCOLAI E, AMIN A, ASHRAF SS, HELFERICH WG, YANG X, BOOSANI CS, GUHA G, BHAKTA D, CIRIOLO MR, AQUILANO K, CHEN S, MOHAMMED SI, KEITH WN, BILSLAND A, HALICKA D, NOWSHEEN S, AZMI AS. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Semin Cancer Biol**. 2015 Dec;35 Suppl(0):S78-S103. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.001. Epub 2015 Apr 28. PMID: 25936818; PMCID: PMC4720504.

MONZILLO V, LALLITTO F, RUSSO A, POGGIO C, SCRIBANTE A, ARCIOLA CR, BERTUCCIO FR, COLOMBO M. Ozonized Gel Against Four *Candida* Species: A Pilot Study and Clinical Perspectives. **Materials** (Basel). 2020 Apr 8;13(7):1731. doi: 10.3390/ma13071731. PMID: 32276304; PMCID: PMC7178640.

MORAL R, ESCRICH E. Influence of Olive Oil and Its Components on Breast Cancer: Molecular Mechanisms. **Molecules**. 2022 Jan 12;27(2):477. doi: 10.3390/molecules27020477. PMID: 35056792; PMCID: PMC8780060.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods** vol. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

OBRADOR E, MORENO-MURCIANO P, ORIOL-CABALLO M, LÓPEZ-BLANCH R, PINEDA B, GUTIÉRREZ-ARROYO JL, LORAS A, GONZALEZ-BONET LG, MARTINEZ-CADENAS C, ESTRELA JM, MARQUÉS-TORREJÓN MÁ. Glioblastoma Therapy: Past, Present and Future. **Int J Mol Sci**. 2024 Feb 21;25(5):2529. doi: 10.3390/ijms25052529. PMID: 38473776; PMCID: PMC10931797.

OMURO, ANTONIO; DEANGELIS, LISA M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **Jama**, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, 2013.

OSTROM QT, CIOFFI G, WAITE K, KRUCHKO C, BARNHOLTZ-SLOAN JS. Relatório Estatístico CBTRUS: Tumores cerebrais primários e outros tumores do sistema nervoso central diagnosticados nos Estados Unidos em 2014-2018. **Neuro Oncol**. 5 de outubro de 2021; 23(12 Suppl 2):iii1-iii105. DOI: 10.1093/neuonc/noab200. PMID: 34608945; PMCID: PMC8491279.

PAPIEŻ MA, KRZYŚCIAK W. Biological Therapies in the Treatment of Cancer-Update and New Directions. **Int J Mol Sci**. 2021 Oct 28;22(21):11694. doi: 10.3390/ijms222111694. PMID: 34769123; PMCID: PMC8583892.

ROY PS, SAIKIA BJ. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian J Cancer**. 2016 Jul-Sep;53(3):441-442. doi: 10.4103/0019-509X.200658. PMID: 28244479.

SARDI, I. Prolonged exposure to doxorubicin after radiotherapy in glioblastoma. **Future Oncology**, v. 12, n. 5, p. 581–583, 2016.

SCHAFF LR, MELLINGHOFF IK. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. **JAMA**. 2023 Feb 21;329(7):574-587. doi: 10.1001/jama.2023.0023. PMID: 36809318; PMCID: PMC11445779.

SCHNEIDER, T., MAWRIN, C., SCHERLACH, C., SKALEJ, M., & FIRSCHING, R. Gliomas in Adults. **Deutsches Arzteblatt International**, 2010.

SCONZA, C., RESPIZZI S., VIRELLI L., VANDENBULCKE F., IACONO F., KON E., DI MATTEO B. Oxygen-Ozone Therapy for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association**, v. 36, n. 1, p. 277–286, 2020.

SERRA MEG, BAEZA-NOCI J, MENDES ABDALA CV, LUVISOTTO MM, BERTOL CD, ANZOLIN AP. The role of ozone treatment as integrative medicine. An evidence and gap map. **Front Public Health**. 2023 Jan 16;10:1112296. doi: 10.3389/fpubh.2022.1112296. PMID: 36726625; PMCID: PMC9885089.

S. SELL On the stem cell origin of câncer Am. **J. Pathol. Am. Soc. Invest. Pathol**., 176 (6) (2010), pp. 2584-2594, 10.2353/ajpath.2010.091064

SIDDIQUI G, GIANNANGELO C, DE PAOLI A, SCHUH AK, HEIMSCH KC, ANDERSON D, BROWN TG, MACRAILD CA, WU J, WANG X, DONG Y, VENNERSTROM JL, BECKER K, CREEK DJ. Peroxide Antimalarial Drugs Target Redox Homeostasis in *Plasmodium falciparum* Infected Red Blood Cells. **ACS Infect Dis**. 2022 Jan 14;8(1):210-226. doi: 10.1021/acsinfecdis.1c00550. Epub 2022 Jan 5. PMID: 34985858; PMCID: PMC8762662.

SILVA, V., PEIRONE C., AMARAL J. S., CAPITA R., ALONSO-CALLEJA C., MARQUES-MAGALLANES J. A., MARTINS A., CARVALHO A., MALTEZ L., PEREIRA J. E., CAPELO J. L., IGREJAS G., POETA P. High Efficacy of Ozonated Oils on the Removal of Biofilms Produced by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from Infected Diabetic Foot Ulcers. **Molecules**, v. 25, n. 16, p. 3601, 2020.

SILVA, CHRISTIANE NAZARETH; AMOROSO, MARCELO HENRIQUE RIBEIRO; SOUSA, ANYELLE AMARO; ALVES, LETÍCIA GOMES; AMOROSO, MARCO ANTÔNIO RIBEIRO; AMARO, DANIEL SOUSA. Análise do Perfil Epidemiológico de Glioblastomas no Brasil entre 2012 e 2021: evidências e desafios para a saúde pública. **J Bras Neurocirur**, v. 35, n. 1, p. 66-74, 2024. DOI: 10.22290/jbnc.2024.350108.

SKALSKA, K., Ledakowicz S., Perkowski J., Sencio B. Germicidal Properties of Ozonated Sunflower Oil. **Ozone: Science & Engineering**, v. 31, n. 3, p. 232–237, 2009.

SOUSA, J F; CRISTOFARO, L F; SERAFIM, R B; NETTO, R P; SOUZA, F O; SOARES, C P; VALENTE, V. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida está correlacionada com a expressão de genes de reparo de DNA. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 213-218, 2015.

STAFFIERI S, RUSSO V, OLIVA MA, ALBORGHETTI M, RUSSO M, Arcella A. Aloe-Emodin Overcomes Anti-Cancer Drug Resistance to Temozolomide and Prevents Colony Formation and Migration in Primary Human Glioblastoma Cell Lines NULU and ZAR. **Molecules**. 2023 Aug 11;28(16):6024. doi: 10.3390/molecules28166024. PMID: 37630276; PMCID: PMC10458156.

STEPANENKO AA, DMITRENKO VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**. 2015 Dec 15;574(2):193-203. doi: 10.1016/j.gene.2015.08.009. Epub 2015 Aug 7. PMID: 26260013.

SUSKI JM, BRAUN M, STRMISKA V, SICINSKI P. Targeting cell-cycle machinery in cancer. **Cancer Cell**. 2021 Jun 14;39(6):759-778. doi: 10.1016/j.ccell.2021.03.010. Epub 2021 Apr 22. PMID: 33891890; PMCID: PMC8206013.

TERAIYA M, PERREAULT H, CHEN VC. An overview of glioblastoma multiforme and temozolomide resistance: can LC-MS-based proteomics reveal the fundamental mechanism of temozolomide resistance? **Front Oncol**. 2023 Apr 26;13:1166207. doi: 10.3389/fonc.2023.1166207. PMID: 37182181; PMCID: PMC10169742.

TAYLOR O.G., BRZOZOWSKI J., SKELDING K.A. Glioblastoma multiforme: An overview of emerging therapeutic targets. **Front. Oncol**. 2019;9:963. doi: 10.3389.

THORN, C. F., OSHIRO, C., MARSH, S., HERNANDEZ-BOUSSARD, T., MCLEOD, H., KLEIN, T. E., ALTMAN, R. B. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011.

TIRELLI U., CIRRITO C., PAVANELLO M., PIASENTIN C., LLESHI A., TAIBI R. Ozone therapy in 65 patients with fibromyalgia: an effective therapy. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 1786–1788, 2019.

TRESCH NS, FUCHS D, MORANDI L, TONON C, ROHRER BLEY C, NYTKO KJ. Temozolomide is additive with cytotoxic effect of irradiation in canine glioma cell lines. **Vet Med Sci**. 2021 Nov;7(6):2124-2134. doi: 10.1002/vms3.620. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34477324; PMCID: PMC8604143.

UICC GLOBAL CANCER CONTROL. [(accessed on 24 December 2024)]. Available online: https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data

UYSAL, B. Ozonated olive oils and the troubles. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 3, n. 2, p. 49–50, 2014.

VANDER HEIDEN M.G., CANTLEY L.C., THOMPSON C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. **Science**. 2009;324:1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809

WALEWSKI J. Serendypity in a chase for a cure of cancer: Origin and perspectives of immunochemotherapy from nitrogen mustard to chimeric antygen receptors. **Nowotwory**. 2015;65:96–102. doi: 10.5603/NJO.2015.0020.

WEN PY, WELLER M, LEE EQ, et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. **Neuro Oncol**. Aug 17 2020;22(8):1073–1113. doi: 10.1093/neuonc/noaa106

WENGER, K. J., WAGNER, M., YOU, S. J., FRANZ, K., HARTER, P. N., BURGER, M. C., VOSS, M., RONELLENFITSCH, M. W., FOKAS, E., STEINBACH, J. P., BÄHR, O. Bevacizumab as a last-line treatment for glioblastoma following failure of radiotherapy, temozolomide and lomustine. **Oncology Letters**, v. 14, n. 1, p. 1141–1146, 2017.

WU W, KLOCKOW JL, ZHANG M, LAFORTUNE F, CHANG E, JIN L, WU Y, DALDRUP-Link HE. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. **Pharmacol Res**. 2021 Sep;171:105780. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105780. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34302977; PMCID: PMC8384724.

YALAMARTY SSK, FILIPCZAK N, LI X, SUBHAN MA, PARVEEN F, ATAIDE JA, RAJMALANI BA, TORCHILIN VP. Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). **Cancers** (Basel). 2023 Apr 1;15(7):2116. doi: 10.3390/cancers15072116. PMID: 37046777; PMCID: PMC10093719.

YAREMENKO IA, SYROMYATNIKOV MY, RADULOV PS, BELYAKOVA YY, FOMENKOV DI, POPOV VN, TERENT'EV AO. Cyclic Synthetic Peroxides Inhibit Growth of Entomopathogenic Fungus *Ascosphaera apis* without Toxic Effect on Bumblebees. **Molecules.** 2020 Apr 22;25(8):1954. doi: 10.3390/molecules25081954. PMID: 32331472; PMCID: PMC7221740.

ZANARDI, I., BORRELLI E., VALACCHI G., TRAVAGLI V., BOCCI V. Ozone: A Multifaceted Molecule with Unexpected Therapeutic Activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 304–314, 2016.

ZHANG C, LIU J, XU D, ZHANG T, HU W, FENG Z. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. **J Mol Cell Biol**. 2020 Sep 1;12(9):674-687. doi: 10.1093/jmcb/mjaa040. PMID: 32722796; PMCID: PMC7749743.

ZIGANSHINA, A. Y., MANSUROVA E. E., VOLOSHINA A. D., LYUBINA A. P., AMERHANOVA S. K., SHULAEVA M. M., NIZAMEEV I. R., KADIROV M. K., BAKHTIOZINA L. R., SEMENOV V. E., ANTIPIN I. S. Thymine-Modified Nanocarrier for Doxorubicin Delivery in Glioblastoma Cells. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 551–551, 2023.