

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo do efeito citotóxico de nanocristais de óxido de zinco dopados com ouro em
linhagens tumorais e não tumorais

Gustavo Galli Rocha

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo do efeito citotóxico de nanocristais de óxido de zinco dopados com ouro em
linhagens tumorais e não tumorais

Gustavo Galli Rocha

Prof^a. Dra. Anielle Christine Almeida Silva
Instituto de Física

Me. Edigar Henrique Vaz Dias
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo do efeito citotóxico de nanocristais de óxido de zinco dopados com ouro em
linhagens tumorais e não tumorais

Gustavo Galli Rocha

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Prof^a. Dra. Anielle Christine Almeida Silva

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por sempre iluminar o meu caminho e me proporcionar mais essa realização.

Aos meus pais, Valtercides e Rosilene, pelo amor incondicional, dedicação, e por todas as vezes que mesmo sem entender sobre o trabalho, tentaram de alguma maneira me ajudar. Obrigado por estarem sempre juntos comigo.

Aos meus irmãos, Giovani e Guilherme, por todo carinho, amor, paciência, imenso companheirismo, por todos os momentos de alegria, diversão e de estudos juntos.

A minha orientadora, Prof^a. Dra. Anielle, obrigado pelo aprendizado e orientação proporcionada.

A meu co-orientador, Me. Edigar, por todo conhecimento passado, pelo convívio e ajuda com os experimentos.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular, por ter me acolhido e por ter sido meu habitat de trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pelo apoio financeiro a iniciação científica.

Ao pessoal da Empresa Júnior TRIBIOTEC, Bateria Virulenta e a 8^a turma de Biotecnologia, obrigado amizade, companhia e por terem feito desta fase de graduação, um momento incrível e inesquecível.

Agradeço aos membros pela disponibilidade e por terem aceitado contribuir para a minha formação acadêmica.

Agradeço aos amigos que estiveram do meu lado nos momentos mais difíceis dessa caminhada, Cassiana Maurer, Heitor Cappato, Matheus Jesus, Maria Paula e Henrique Lara. Agradeço a todos aqueles familiares e amigos, que de alguma maneira contribuíram para o meu crescimento.

RESUMO

O câncer de próstata, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), é o segundo mais incidente entre os homens. Diante os diversos efeitos adversos no tratamento da doença, novas ferramentas terapêuticas são cada vez mais estudadas. A nanotecnologia atua no desenvolvimento de nanomateriais, como por exemplo, os nanocristais (NCs) visando à aplicação antineoplásica. Neste trabalho o objetivo foi investigar o efeito citotóxico de NCs de óxido de zinco (ZnO) puro e dopados com ouro (Au) em linhagem celular tumoral e não tumoral. O efeito da citotoxicidade foi analisado pelo ensaio de MTT utilizando as linhagens celular não-tumoral (Vero) e tumoral de próstata (PC3). Os NCs de ZnO puro e dopados com 0,1% de Au apresentaram os melhores resultados de citotoxicidade para a linhagem tumoral mantendo a viabilidade celular da não tumoral. Portanto, com base nos nossos resultados, a toxicidade para a linhagem tumoral independe da dopagem de Au nos NCs de ZnO.

Palavras- Chave: Nanocristais, Câncer, Citotoxicidade, Óxido de Zinco, Ouro

ABSTRACT

Prostate cancer, according to the National Cancer Institute (INCA), is the second most incident among men. Given the various adverse effects in the treatment of the disease, new therapeutic tools are increasingly studied. Nanotechnology acts in the development of development of nanomaterials, such as nanocrystals (NCs) for antineoplastic application. In this work the objective was to investigate the cytotoxic effect of pure and gold (Au) doped zinc oxide (ZnO) NCs in tumor and non-tumor cell line. The effect of cytotoxicity was analyzed by the MTT assay using non-tumor cell lines (Vero) and prostate tumor (PC3). The pure ZnO NCs and doped with 0.1% Au showed the best cytotoxicity results for the tumor cell line maintaining the non-tumor cellular viability. Therefore, based on our results, the toxicity to the tumoral lineage is independent of the doping of Au in the ZnO NCs.

Palavras- Chave: Nanocrystals, Cancer, Cytotoxicity, Zinc Oxide, Gold

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer.....	1
1.2 Nanotecnologia e Nanobiotecnologia.....	2
1.2.1 Nanocristais Semicondutores e Metálicos.....	2
1.3 Linhagens Celulares	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Síntese e Caracterização Física dos Nanocristais	7
3.2 Ensaio Biológicos	8
3.2.1 Cultura Celular.....	8
3.2.2 Tratamento	8
3.2.3 Ensaio de Citotoxicidade	9
3.2.4 Adesão Celular.....	9
3.2.5 Análise estatística.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4.1 Caracterizações Físicas dos Nanocristais	10
4.1.1 Difração de Raios-X	10
4.1.2 Absorção Óptica.....	12
4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS	13
4.2.1 Ensaio de Citotoxicidade	13
4.2.2 Adesão Celular.....	16
5. CONCLUSÃO	17
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação dos mecanismos de citotoxicidade gerados pelos NCs de ZnO. O esquema mostra a entrada dos NCs de ZnO na célula via endocitose, pinocitose ou fagocitose. A presença desses nanocompostos no citoplasma aumentam a concentração de zinco e causam o desequilíbrio da atividade de proteínas dependentes desse íon. Fonte: (BISHT; RAYAMAJHI, 2016).....	3
FIGURA 2: Linhagem celular tumoral de próstata (PC3), densidade baixa e alta de células. Fonte: https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx#characteristics >.....	6
FIGURA 3: Linhagem celular de rim de macaco (Vero), densidade baixa e alta de células. Fonte: https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx#characteristics >.....	6
FIGURA 4: Difractogramas de Raios-X dos NCs de ZnO puro e dopados com Au a temperatura ambiente. Fonte: autor.....	11
FIGURA 5: Espectros de absorção óptica de NCs de ZnO puro e dopados com Au a temperatura ambiente. Fonte: autor.....	12
FIGURA 6: Ilustração da estrutura cristalina hexagonal do NC de ZnO (a) puro e (b) dopado com Au. Fonte: autor.....	13
FIGURA 7: Efeito da citotoxicidade dos NCs de ZnO puro e dopados com Au em células Vero e PC3. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e foi considerado o valor de $p < 0,05$ (*) como estatisticamente significativo. Fonte: autor.....	14
FIGURA 8. Inibição da adesão celular de NCs de ZnO puro e dopados com 0,1 e 5% de Au. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e foi considerado o valor de $p < 0,05$ (*) como estatisticamente significativo. Fonte: autor.....	16

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é a denominação dada a um grupo de mais de 100 doenças que possui em comum a característica do crescimento celular anormal (neoplasia) com a possibilidade de atingir outros tecidos, órgãos e alastrar-se em outras regiões do corpo por meio da migração via corrente sanguínea e linfática (INCA, 2016).

A proliferação irregular das células cancerosas e o acúmulo nos tecidos leva ao desenvolvimento de tumores. Quanto maior a velocidade de crescimento e propagação dessas células, maior é a agressividade do tumor, sendo que o potencial de se espalhar para outros lugares constitui uma das principais causas de morte por câncer em todo o mundo (INCA, 2016; WHO, 2016).

O câncer de próstata é o segundo tipo mais incidente entre os homens e é definido pelo aumento do tamanho da próstata, com consequente redução da intensidade do jato urinário e do calibre do canal uretral. É considerado como um câncer da terceira idade, visto que 75% dos casos em todo o mundo acometem homens a partir dos 65 anos. Calcula-se que somente para o ano de 2016, 61.200 novos casos de câncer de próstata surgiram no Brasil (INCA, 2016; TONON; SCHOFFEN, 2009).

Dentre as diversos tratamentos para o câncer, radioterapia e quimioterapia são os mais frequentes. Radioterapia consiste na utilização de radiação ionizante para destruir as células cancerosas. Quimioterapia se baseia na administração de substâncias químicas para inibir o tumor. Tais tratamentos podem ser realizados em combinação ou não (INCA). A consequência dos tratamentos oncológicos disponíveis são os efeitos colaterais ou secundários que eles provocam, tornando os pacientes cada vez mais sensíveis e vulneráveis.

1.2 Nanotecnologia e Nanobiotecnologia

A nanotecnologia é a aplicação dos conhecimentos científicos visando a manipulação de materiais para o desenvolvimento de estruturas em tamanho nanométrico (unidade de medida correspondente à bilionésima parte do metro) gerando novas características ao material como estabilidade, especificidade, baixo custo e alta resistência (PINA et al., 2005).

A nanobiotecnologia constitui-se dos conceitos da nanotecnologia empregados nas ciências biológicas, ou seja, o uso de estudos e técnicas referentes aos nanomateriais na descoberta de drogas, novas terapias, ferramentas de diagnóstico, melhoria de vacinas, bem como a comercialização desses produtos (PAULL et al., 2003; PINA et al., 2005).

A nanobiotecnologia surgiu com perspectivas promissoras diante a dificuldade de se estabelecer tratamentos para o câncer, e testes diagnósticos mais sensíveis para a detecção da doença. Considerando a necessidade da administração de altas doses de fármacos antineoplásicos para que possam suprimir o avanço do tumor e proporcionar a erradicação das células cancerosas, outras células de tecidos saudáveis são acometidas devido a toxicidade, gerando outras patologias e efeitos colaterais ao paciente. Com o uso da nanobiotecnologia, é possível controlar a liberação progressiva do fármaco, reduzir os efeitos colaterais, direcionar a alvos específicos, e diminuir a dosagem administrada, fornecendo um quadro de melhora ou uma maior qualidade de vida ao paciente (DURÁN; DE AZEVEDO, 2003; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012).

1.2.1 Nanocristais Semicondutores e Metálicos

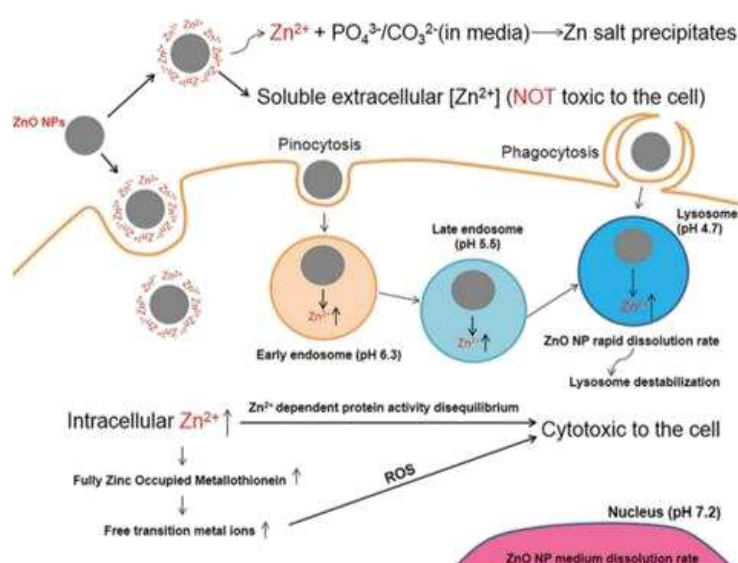
A redução do tamanho de uma partícula para a nanoescala pode modificar suas características químicas, mecânicas, elétricas, estruturais, morfológicas e ópticas. As nanopartículas interagem com biomoléculas e estruturas celulares, com isso tendo diversas aplicações biomédicas como a multifuncionalidade, devido a quantidade maior de átomos

que ligam-se na sua superfície, potencializar o efeito terapêutico de fármacos, diagnóstico de doenças, quimioterapia direcionada, entrega e biodisponibilidade de drogas (KRÓL et al., 2017).

Os nanocristais (NCs) inorgânicos, como o óxido de zinco (ZnO), são capazes de provocar toxicidade seletiva em células cancerosas e justifica o crescente número de pesquisas nessa área (VINARDELL; MITJANS, 2015).

O zinco é um metal de transição importante para a homeostase celular, atuando como cofator de mais de 300 enzimas em mamíferos, as quais desempenham papéis na defesa do hospedeiro contra o princípio e a progressão do câncer. Portanto, a deficiência de zinco pode contribuir para a instabilidade celular e propensão ao câncer, sendo uma condição importante para evolução e malignidade da doença (HO, 2004).

FIGURA 1: Representação dos mecanismos de citotoxicidade gerados pelos NCs de ZnO. O esquema mostra a entrada dos NCs de ZnO na célula via endocitose, pinocitose ou fagocitose. A presença desses nanocompostos no citoplasma aumentam a concentração de zinco e causam o desequilíbrio da atividade de proteínas dependentes desse íon. Fonte: (BISHT; RAYAMAJHI, 2016)



O mecanismo de ação dos NCs de ZnO (Figura 1) é promover o aumento da concentração de zinco dentro da célula e levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerando citotoxicidade. A concentração elevada deste mineral causa instabilidade na homeostase celular, visto que afeta a atividade de proteínas dependentes de zinco, causa estresse oxidativo, dano ao material genético e morte celular (BISHT; RAYAMAJHI, 2016).

Os NCs de ouro (Au) apresentam propriedades únicas devido seu tamanho pequeno, estabilidade, área superficial e cristalinidade, dentre elas a biocompatibilidade que possibilita diversas aplicações biológicas. Os NCs de Au são bastante utilizados na ciência médica pois estão envolvidos em processos fototerápicos, diagnósticos por imagem de tecidos e também na identificação imunocromatográfica (CHITHRANI et al., 2010; LEE et al., 2010).

A associação de NCs de Au com a radioterapia podem ajudar na inibição e progressão do câncer. A irradiação de luz com comprimento de onda entre 800 a 1200 nanômetros sob tais NCs causam aquecimento local e podem gerar a destruição de tumores. Ainda, quando elas estão sob a conformação de cascas, cujo objetivo é blindar alguma molécula de interesse como droga, a irradiação possibilita a ruptura desse revestimento e promove a liberação da droga para dentro da célula tumoral (TOMAR; GARG, 2013). A possibilidade de conjugar NCs de Au com biomoléculas permite o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas para o tratamento do câncer como a liberação específica e programada de fármacos no tecido canceroso. Estudos validam que NCs de Au reduzem efeitos colaterais quando são associados com medicamentos usuais (KHAN et al., 2014; LAN et al., 2013).

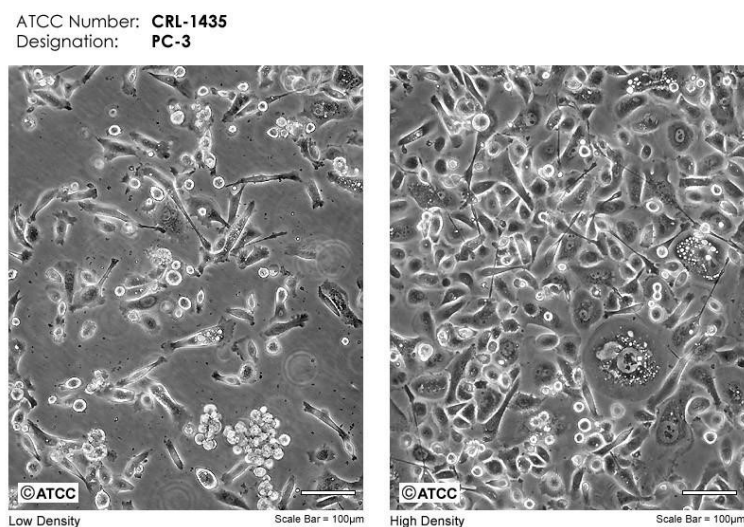
Os NCs de Au também são utilizados como ferramentas para supressão de tumores visto que atuam diretamente disputando sítios neoplásicos impedindo o avanço do câncer. A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos que está ligado à instalação e progressão do câncer, a qual é estimulada por mitógenos endoteliais específicos, como os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), de fibroblastos (bFGF) e derivado de plaquetas (PDGF). Estudos apontam que os NCs de Au apresentam caráter anti-angiogênico, pois competem ativamente pelo sítio de ligação à heparina, domínio ao qual tais mitógenos se ligam para desencadear a sinalização celular da angiogênese no tumor. Além disso, a conjugação de Au com anticorpos anti-VEGF induzem a apoptose dose dependente em tumores de leucemia (LIM et al., 2011).

Considerando as atividades citotóxicas independentes das NCs de ZnO e Au a conjugação de ambas pode auxiliar no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (BHATTACHARYYA et al., 2010). FEMI et al. (2011), demonstraram que nanocompostos de ZnO dopados com Au apresentam atividade antimicrobiana, porém não foi encontrado registros na literatura da associação desses NCs em sistemas celulares de linhagens cancerosas.

1.3 Linhagens Celulares

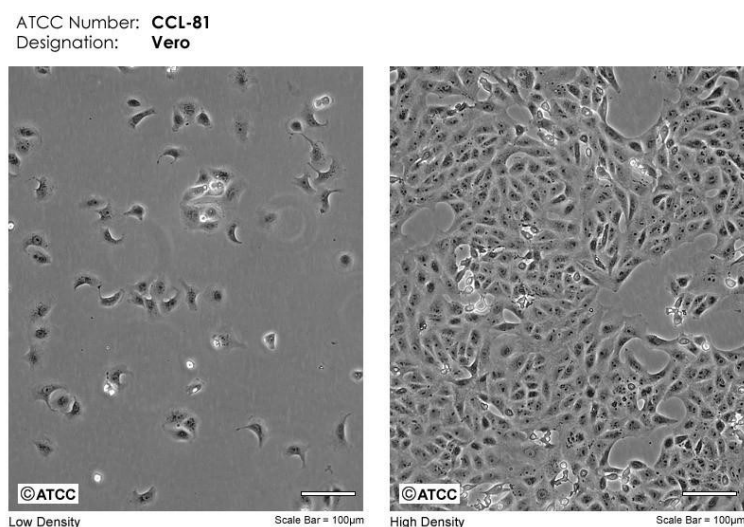
Para realização dos ensaios biológicos foram utilizadas a linhagem celular tumoral de próstata (PC3) e a linhagem celular não tumoral (Vero) como objetos de estudo.

FIGURA 2: Linhagem celular tumoral de próstata (PC3), densidade baixa e alta de células. Fonte: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx#characteristics>>.



A linhagem celular PC3 (Figura 2) representa um dos tipos de células mais estudados para câncer de próstata. São utilizadas para avaliar a resposta a agentes quimioterapêuticos e na investigação das alterações bioquímicas nas células avançadas deste tipo de câncer (KAIGHN, 1979).

FIGURA 3: Linhagem celular de rim de macaco (Vero), densidade baixa e alta de células. Fonte: <https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx#characteristics>>.



A linhagem Vero (Figura 3) proveniente de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*, um dos tipos celulares mais recomendados para avaliar toxicidade de substâncias químicas in vitro, utilizados para detecção de doenças e produção de vacinas para uso humano (TAKATA et al., 1994).

Diante disso, investigou-se o efeito citotóxico de NCs de ZnO puro e dopados com Au visando o desenvolvimento de uma nova ferramenta terapêutica contra o câncer de próstata.

2. OBJETIVOS

- Sintetizar NCs de ZnO puro e dopados com Au
- Investigar as propriedades estruturais e ópticas dos NCs
- Comparar a citotoxicidade de NCs de ZnO dopados com Au em linhagem celular tumoral de próstata e não tumoral de Vero.
- Analisar a influência dos NCs de ZnO dopados com Au sob a adesão celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese e Caracterização Física dos Nanocristais

Os NCs de ZnO puros e dopados com Au foram sintetizados via coprecipitação no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia.

As propriedades estruturais e ópticas dos NCs foram investigadas pelas técnicas experimentais de difração de Raios-X (DRX) e absorção óptica (AO).

As medidas de DRX foram realizadas no Laboratório de Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. As medidas de DRX

foram realizadas utilizando um difratômetro de Raios-X (DRX- 6000) da marca Shimadzu, com radiação monocromática Cu-K $_{\alpha 1}$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) e passo angular de 0.02° na faixa, modo fixo, 2 segundos de 20° a 80° .

Os espectros de absorção óptica foram realizados no LNMIS utilizando um espectrofotômetro UV-VIS-NIR da marca Shimadzu, modelo UV-3600, usando o modo de refletância.

3.2 Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LABMOC), do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, coordenado pelo Prof. Dr. Fábio de Oliveira.

3.2.1 Cultura Celular

Células derivadas do câncer de próstata (PC3) e do rim de macaco (Vero) foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (25mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 μ g/ml), L-glutamina (2mM), bicabornato de sódio (3mM) e soro fetal bovino (SFB) a 2%. Foram cultivadas em garrafas de 25 cm² e mantidas a 37°C , atmosfera úmida a 5% de CO₂.

As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços em uma densidade de 1×10^5 células/poço. Em seguida, foram incubadas por 24 horas nas mesmas condições para adesão celular.

3.2.2 Tratamento

Os NCs utilizados, ZnO e ZnO dopados com 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0% de Au foram diluídos em PBS por agitação ultrassônica. Após o período de aderência, o

meio de cultura foi removido e foi adicionado 200 μ L de RPMI a 2% de SFB suplementado com 25 μ g/mL de nanocristais seguido de incubação por 24h a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. Como controle negativo as células foram incubadas apenas com meio RPMI suplementando com 2% de SFB e PBS.

3.2.3 Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] de acordo com Mosmann (1983). Após o período de incubação, foi retirado o sobrenadante e adicionado 50 μ L/poço de MTT (2 mg/mL) seguido de incubação por 1h a 37°C sob proteção da luz. Logo após, o MTT foi removido e adicionou-se 100 μ L/poço de DMSO. A absorbância de cada poço foi medida em espectrofotômetro a 560 nm.

A viabilidade e citotoxicidade foram calculadas pelas seguintes fórmulas:

Viabilidade (%) = Absorbância / (Média das Absorbâncias do controle celular) *100

Citotoxicidade (%) = 1 – Viabilidade.

3.2.4 Adesão Celular

Para este ensaio, 2x10⁴ células/poço foram previamente incubadas por 30 minutos com os NCs de ZnO puro e dopados com 0,1 e 0,5% de Au a uma concentração de 25 μ g/mL/poço em microtubos de 1mL a 37°C. Após esse período, foram transferidas para placa de 96 poços e incubadas por 3 horas em atmosfera úmida, a 5% CO₂. Após esse tempo realizou-se o ensaio de MTT previamente descrito.

A adesão celular e sua inibição foram calculadas pelas seguintes fórmulas:

Adesão celular = [Absorbância *100 / (Média das Absorbâncias do controle celular)];

Inibição da adesão celular = 1 - Adesão celular.

3.2.5 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicatas de experimentos independentes. Utilizou-se o modelo estatístico *Two-way* ANOVA para análise de variância e pós-teste de *Bonfferoni's Multiple Comparision Test*, comparando o controle com as amostras tratadas com as NCs. A análise estatística foi gerada pelo *software GraphPad Prism 5.0*. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterizações Físicas dos Nanocristais

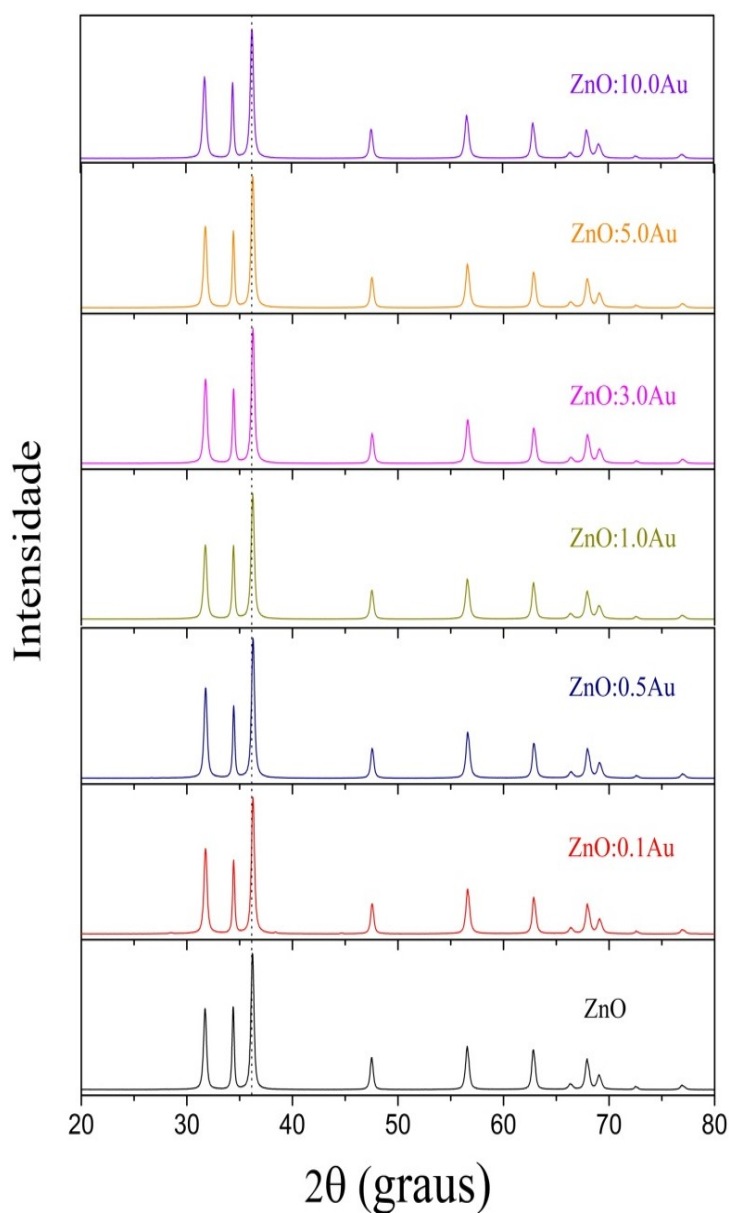
4.1.1 Difração de Raios-X

As propriedades estruturais das amostras foram investigadas utilizando a técnica de difração de Raios-X (DRX). Os difratogramas de DRX são comparados com os cartões padrões e podemos afirmar o tipo de cristal formado e estrutura cristalina. O tamanho médio do cristalito é determinado realizando um ajuste no pico principal e a equação de Scherrer.

Nos difratogramas de DRX (Figura 4) observam-se picos de difração de Bragg bem intensos e estreitos, isso indica que as amostras são bem cristalinas, além disso, esses picos estão em excelente acordo com o padrão de difração do ZnO com estrutura cristalina hexagonal (JCPDS:36-1451).

FIGURA 4: Difratomogramas de Raios-X dos NCs de ZnO puro e dopados com Au a temperatura ambiente.

Fonte: autor.

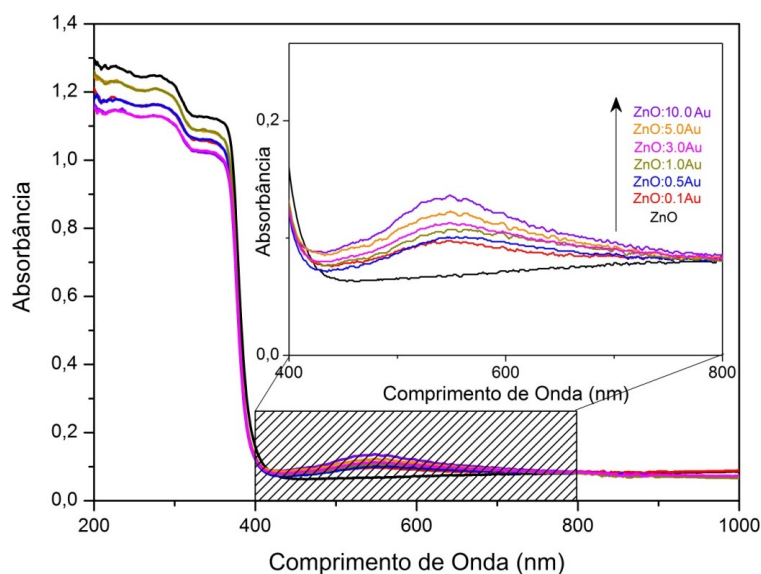


Na Figura 4, observa-se, também, que mesmo com o aumento da concentração de Au os difratogramas apresentam os mesmos picos de difração de Bragg, não observando a presença de picos adicionais. Isso indica que todos os íons de Au foram incorporados na estrutura cristalina do ZnO, não ocorrendo a formação de cristais de Au ou outros tipos de cristais. O tamanho médio dos NCs de ZnO puros e dopados com Au são em torno de 20 nm.

4.1.2 Absorção Óptica

Os dados de difração de Raios-X confirmaram que sintetizamos NCs de ZnO (nanopartículas cristalinas) e que com o aumento da concentração de Au não ocorreu a formação de cristais de Au ou outros tipos de cristais. Assim, a fim de confirmar a presença de íons de Au nos NCs de ZnO foram realizadas as medidas de absorção óptica. Na medida de absorção óptica observa as faixas de absorção dos materiais, bem como as absorções características dos íons dopantes.

FIGURA 5: Espectros de absorção óptica de NCs de ZnO puro e dopados com Au a temperatura ambiente. Fonte: autor.

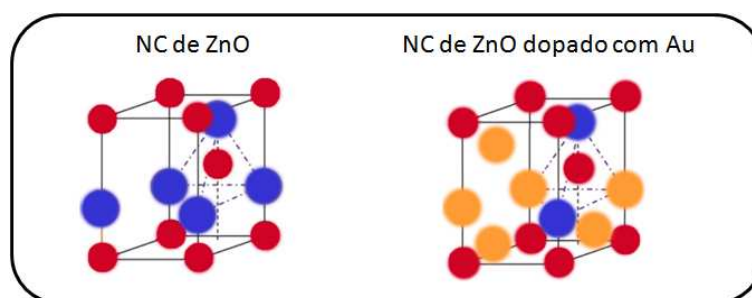


A Figura 5 mostra os espectros de absorção óptica dos NCs de ZnO puro e dopados com Au. Observa-se no espectro dos NCs de ZnO uma banda larga na faixa de 200-400 nm característica da absorção do ZnO. Nas amostras dopadas com Au observa-se uma banda na faixa de 500-700 nm (veja o zoom) característica de íons de Au. Além disso, verifica-se que na região próximo a 450 nm (veja o zoom) ocorreu um deslocamento para menores comprimentos de onda com a concentração de Au. Assim, esses resultados confirmam a presença dos íons de Au dentro dos NCs de ZnO.

Portanto, com base nos resultados de AO e DRX pode-se construir uma figura ilustrativa da estrutura dos NCs de ZnO puro e dopados com Au. Os íons de Au estão dopados tanto substitucionalmente (substituindo os íons de zinco na estrutura cristalina) como intersticial na rede cristalina do ZnO.

FIGURA 6: Ilustração da estrutura cristalina hexagonal do NC de ZnO (a) puro e (b) dopado com Au.

Fonte: autor



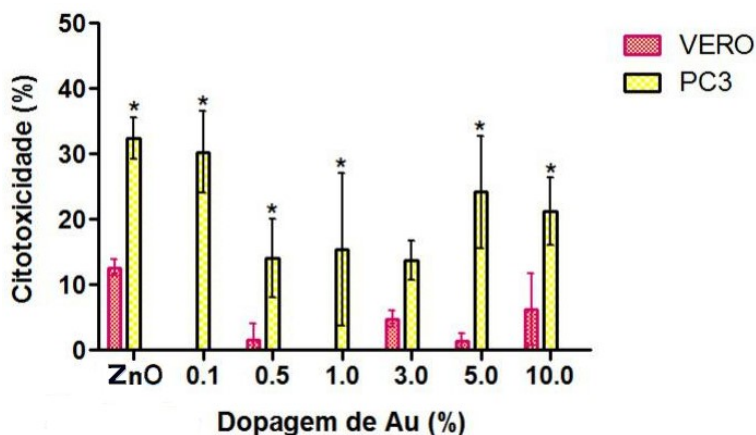
A Figura 6 mostra a estrutura cristalina hexagonal do NC de ZnO (a) puro e (b) dopado com Au. Os átomos de oxigênio, zinco e Au correspondem, respectivamente, as bolas de coloração vermelha, azul e alaranjada. É importante ressaltar que as dimensões das bolas não estão na mesma escala que os raios iônicos dos correspondentes íons.

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.2.1 Ensaio de Citotoxicidade

Nesse estudo foi investigado o efeito citotóxico dos NCs de ZnO e ZnO dopados com Au em linhagens celulares não tumoral (Vero) e tumoral de próstata (PC3). Para examinar o efeito citotóxico dos NCs foi realizado o ensaio de MTT, no qual as células foram tratadas com concentração de 25µg/mL de NCs incubadas por 24h. Ensaios anteriores foram realizados com concentrações maiores do tratamento, contudo o efeito citotóxico não foi visualizado, visto que os NCs cobriram a superfície das células, caracterizando “efeito tapete”.

FIGURA 7: Efeito da citotoxicidade dos NCs de ZnO puro e dopados com Au em células Vero e PC3. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e foi considerado o valor de $p < 0,05$ (*) como estatisticamente significativo. Fonte: autor.



Nas células de câncer de próstata, verificou-se que os valores de citotoxicidade dos NCs de ZnO puro e dopados com 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10% apresentaram citotoxicidade com significância, diferentemente da dopagem de 3%. Pode-se notar que as dopagens de 0,0%, 0,1% e 5% demonstraram os maiores valores significativos de citotoxicidade, correspondendo a 32,45%, 30,29%, 24,23% respectivamente (Figura 7).

Na Figura 7, observa-se, também, que as dopagens de 0,1 e 1% não causaram toxicidade nas células Vero, entretanto as dopagens de 0,0, 0,5, 3, 5, e 10% causaram uma baixa citotoxicidade, sendo que nenhum dos resultados para este tipo de célula mostrou seletividade por células tumorais. De acordo esses resultados, sugere que o efeito não foi dopagem-dependente, visto que crescentes concentrações de Au no nanocristal de ZnO não interferem no acréscimo do efeito citotóxico nas células PC3 e Vero. Pode-se supor que quanto menor a concentração de dopagem de Au nos nanocristais de ZnO, maior a toxicidade celular.

A concentração de dopagem de 0,1% apresentou o segundo maior valor com significância de citotoxicidade para a linhagem tumoral de próstata (PC3) e não apresentou citotoxicidade para a linhagem não tumoral (Vero), sendo assim foi

escolhida para mais testes posteriores a fim de esclarecer os mecanismos de ação desses NCs em células.

Ostrovsky et al (2009), observaram que os NCs de ZnO (810 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram citotoxicidade em células saudáveis de astrócitos humanos e em linhagem normal de próstata (RWPE-1). Em contrapartida, o efeito de morte celular foi significativo para células tumorais de próstata (PC3) e glioma (tumor de células gliais). É importante ressaltar que a concentração utilizada neste trabalho (25 $\mu\text{g/mL}$) é bem menor que a utilizada por Ostrovsky et al (2009).

Em outro estudo, Selvakumari et al (2015), avaliaram a citotoxicidade causada por ZnO (31,2 $\mu\text{g/mL}$) em linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) e de pulmão (A549). Foi visualizado uma redução da viabilidade celular devido à citotoxicidade destes NCs. Pode-se ponderar que a concentração de ZnO utilizada por Selvakummurai et al, 31,2 $\mu\text{g/mL}$ é da mesma ordem de grandeza utilizada neste trabalho.

Estudos foram realizados com NCs de ZnO que mostram sua capacidade de causar morte celular em células tumorais via estresse oxidativo e ativação de caspases. É também de conhecimento que o zinco é necessário para manter a homeostase celular visto que ele atua como cofator de diversas enzimas, sua ausência desestabiliza a maquinaria celular e pode agravar o quadro patológico, propiciar evolução e avanço do câncer (HO, 2004).

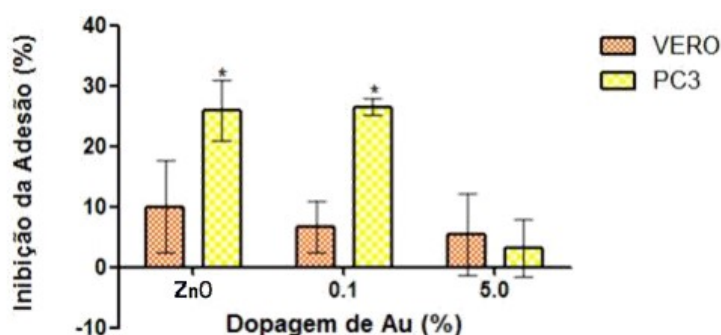
Devido à característica de biocompatibilidade que o NC de Au apresenta, este pode ser um facilitador para a entrada de moléculas intracelulares, visto que ele atua também na entrega direcionada de drogas. Pode-se sugerir que a dopagem de Au no ZnO favorece a entrada do NC para dentro da célula, ocasionando o efeito citotóxico (KHAN et al., 2014; LAN et al., 2013).

Assim, nota-se que nossos resultados estão de acordo com os mostrados na literatura. As linhagens tumorais de próstata, mama e pulmão descritas na literatura demonstram redução da viabilidade celular devido ao efeito citotóxico dos NCs de ZnO.

4.2.2 Adesão Celular

O processo de adesão celular é importante ser elucidado devido ao impacto que a interação entre matriz celular e célula, proporciona ao tecido, influenciando aspectos como o processo de morfogênese, diferenciação e proliferação celular (FERRAZ; FERNANDEZ, 2014). Com base nos resultados da figura 7 os valores de inibição da adesão dos NCs de ZnO e das dopagens de 0,1% e 5% foram significativos para citotoxicidade de células tumorais de próstata e portanto foram selecionadas para o ensaio de adesão celular a fim de verificar a ação dos NCs de ZnO puro e dopados na inibição da aderência das células de linhagens tumoral e não tumoral.

FIGURA 8. Inibição da adesão celular de NCs de ZnO puro e dopados com 0,1 e 5% de Au. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e foi considerado o valor de $p < 0,05$ (*) como estatisticamente significativo. Fonte: autor.



A figura 8 mostra o efeito da dopagem de Au na inibição da adesão celular. Observa-se que os valores de inibição de adesão para os NCs de ZnO puro e dopado com 0,1% de Au são significativos na linhagem PC3, correspondendo aos valores de 25,95% e 26,47%, respectivamente. Contudo, os resultados dos NCs de ZnO dopados

com 5% de Au não foi estatisticamente significativo para inibição de adesão das células PC3 e Vero.

Podemos sugerir mais testes para os NCs de ZnO dopado com 0,1% de Au, visto que apresentou maior significância na inibição da adesão celular da linhagem tumoral (PC3) e o segundo menor valor de inibição da adesão celular da linhagem não tumoral (Vero).

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os NCs de ZnO puro e dopados com Au possuem atividade citotóxica para células tumorais (PC3) em comparação com células não tumorais (Vero), e que a toxicidade independe da dopagem com concentrações crescentes de Au. Assim, como os NCs de ZnO apresentaram o efeito citotóxico nas células tumorais maior do que as dopadas com Au, esse NC é promissor como ferramenta em tratamentos anti-tumorais. Supõe-se que um dos possíveis mecanismos de ação das NPs seria interferir no processo adesão celular, apoptose e estresse oxidativo, impedindo a sobrevivência das células cancerosas. Entretanto, são necessários novos estudos *in vitro* e *in vivo* para comprovar e elucidar todo o efeito potencial antitumoral destes NCs.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a citotoxicidade de NCs de ZnO com concentrações maiores de Au.
- Investigar mecanismos de ação dos NCs por testes específicos de necrose e apoptose.
- Testar os NCs com linhagem normal de próstata.
- Realizar ensaios de migração celular.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHATTACHARYYA, S. et al. Inorganic Nanoparticles in Cancer Therapy. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.237-259, 23 nov. 2010.

BISHT, G.; RAYAMAJHI, S. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. **Nanobiomedicine**, [s.l.], v. 3, p.9-20, jan. 2016.

CHITHRANI, D. B. et al. Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.161-169, fev. 2010.

DURÁN, N.; DE AZEVEDO, M. M. M. O que é nanobiotecnologia? Atualidades e perspectivas. Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica, Unicamp, Campinas, São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.ifi.unicamp.br/extensao/arq_down/nanobiotecnologia.doc>. Acesso em: 9 de dezembro de 2017.

FARIA-TISCHER; TISCHER. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.1, p. 32-53, 2012.

FEMI, V. et al. Anti bacterial effect of ZnO-Au nanocomposites. **Int. J. Biotechnol. Eng.** 1, 1-8, 2011.

FERRAZ, F. B.; FERNANDEZ, J. H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. **Revista Científica da Fmc**, Campos dos Goytacazes, v. 9, n. 2, p.25-34, abr. 2014.

HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 15, n. 10, p.572-578, out. 2004.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016 – Incidência do câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 9 de dezembro de 2017.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA. O que é câncer? Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 9 de dezembro de 2017.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Tratamento do câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso em: 9 de dezembro de 2017.

KAIGHN et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Invest Urol**, p. 17:16–23. 1979.

KHAN, A. et al. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. **Tropical Journal Of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 13, n. 7, p.1169-1178, 18 set. 2014.

KRÓL, A. et al. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. **Advances In Colloid And Interface Science**, [s.l.], v. 249, p.37-52, nov. 2017.

LAN, M. et al. Induction of apoptosis by high-dose gold nanoparticles in nasopharyngeal carcinoma cells. **Auris Nasus Larynx**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.563-568, dez. 2013.

LEE, K. et al. Heparin immobilized gold nanoparticles for targeted detection and apoptotic death of metastatic cancer cells. **Biomaterials**, [s.l.], v. 31, n. 25, p.6530-6536, set. 2010.

LIM, Z. J. et al. Gold nanoparticles in cancer therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s.l.], v. 32, n. 8, p.983-990, 11 jul. 2011.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

OSTROVSKY, S.; KAZIMIRSKY, G.; GEDANKEN, A.; BRODIE, C. Selective cytotoxic effect of ZnO nanoparticles on glioma cells. **Nano Res.**, v. 2, p. 882–890, 2009.

PAULL et al. “Investing in nanotechnology”, **Nature Publishing Group**, v. 21, n. 10, pp.1144-1147, 2003.

PINA et al. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. XXV Encontro Nac. de Eng. de Produção – Porto Alegre, RS, Brasil, 29 out a 01 de nov de 2005.

SELVAKUMARI, R. et al. Anti cancer activity of ZnO nanoparticles on MCF7 (breast cancer cell) and A549 (lung cancer cell). **Asian Res. Publishing Network J. Engg. Appl. Sci.**, vol. 10, pp. 5418-5421, 2015.

TAKATA, C. S. et al. Suscetibilidade da linhagem de células Vero a cepas vacinais do vírus do sarampo. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.209-212, jun. 1994.

TOMAR, A.; GARG, G. Short Review on Application of Gold Nanoparticles. **Global Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 34-38, 2013.

TONON, A. C. T.; SCHOFFEN, F. P. J. CÂNCER DE PRÓSTATA: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 403-410, set./dez. 2009.

VINARDELL, M.; MITJANS, M. Antitumor Activities of Metal Oxide Nanoparticles. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.1004-1021, 9 jun. 2015.

WHO Organização Mundial da Saúde (World Health Organization). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 9 de dezembro de 2017.