

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

ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZNO E PRATA DOPADOS COM EURÓPIO EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS, CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS (MC3T3-E1) E CÉLULAS TUMORAIS DA PRÓSTATA (PC-3).

Paloma Soares de Castro

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

Uberlândia - MG

Junho - 2018

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

ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZNO E PRATA DOPADOS COM EURÓPIO EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS, CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS (MC3T3-E1) E CÉLULAS TUMORAIS DA PRÓSTATA (PC-3).

Paloma Soares de Castro

Prof^ª. Dr^ª. Leticia de Souza Castro Filice

Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart

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

Uberlândia - MG

Junho - 2018

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

ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZNO E PRATA DOPADOS COM EURÓPIO EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS, CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS (MC3T3-E1) E CÉLULAS TUMORAIS DA PRÓSTATA (PC-3).

Paloma Soares de Castro

Prof^ª. Dr^ª. Leticia de Souza Castro Filice

FAMED

Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart

IBTEC

Homologado pela coordenação do

Curso de Biotecnologia em __/__/__

Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia–MG

Junho – 2018

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

ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZNO E PRATA DOPADOS COM EURÓPIO EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS, CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS (MC3T3-E1) E CÉLULAS TUMORAIS DA PRÓSTATA (PC-3).

Paloma Soares de Castro

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Profª Drª Letícia de Souza Castro Filice

Uberlândia, de de

LISTA DE ABREVIATURAS

1. CTM-TAs	Célula-tronco mesenquimal do tecido adiposo
2. DMSO	Dimetilsulfóxido
3. ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
4. Eu	Európio
5. PC-3	Linhagem celular tumoral da próstata
6. MC3T3-E1	Linhagem de célula pré-osteoblástica
7. μg	Micrograma
8. μl	Microlitro
9. mL	Mililitro
10. MTT	(3- (4,5-Dimetiltiazol- 2-yl) -2,5- difeniltetrazol brometo)
11. nm	Nanômetro
12. NPs	Nanopartículas
13. AgO	Óxido de prata
14. ZnO	Óxido de zinco
15. PBS	Phosphate buffered saline
16. Ag	Prata
17. SFB	Soro Fetal Bovino

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Letícia de Souza Castro Filice, por me aceitar como sua aluna, pelos ensinamentos, confiança, disponibilidade e amizade;

A minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart, aos conhecimentos que me transmitiu, o incentivo, atenção e carinho;

Ao laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia pela colaboração e auxílio que permitiu o desenvolvimento deste estudo;

Aos meus pais Suzana e Geraldo, pelo apoio, paciência e amor;

Ao meu namorado Charles, por estar sempre ao meu lado, me motivando;

As minhas colegas e amigas Cristiane Angélico Duarte e Isabela Lemos de Lima, pela ajuda, encorajamento e generosidade. Sem vocês dificilmente teria concluído este trabalho;

A todos do grupo de estudo e pesquisa em células-tronco (GEP-CT), que contribuíram de alguma forma para este trabalho e minha formação, minha sincera gratidão!

RESUMO

As nanopartículas (NPs) representam área ativa de pesquisa e possuem várias aplicações. As NPs de prata (Ag) e o Óxido de Zinco (ZnO) têm chamado atenção por apresentarem propriedades antibacterianas e baixa toxicidade. Porém, ainda existem problemas e desafios em relação a toxicidade das NPs em sistemas biológicos pois seres humanos estão expostos a elas através de diferentes meios, o que causa preocupação com relação ao seu impacto na saúde e meio ambiente. Diante disso, este trabalho avaliou o efeito da viabilidade celular das NPs de ZnO e Ag dopadas com Európio através do ensaio de MTT, utilizando as CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3, que foram tratadas com NPs em diferentes concentrações e tempos. As células PC-3 cultivadas com NPs de ZnO:AgO:0.3 Eu e as NPs ZnO:Ag, na concentração de 100µg/mL, apresentaram baixa viabilidade. Além disso, as células MC3T3-E1 também indicaram menor viabilidade quando incubadas com NPs ZnO:Ag nos tempos de 24 e 48 hrs e as NPs ZnO:Eu em 24h nas concentrações de 50 e 100µg/mL. Assim, é necessária a realização de mais ensaios para melhor avaliar esse comportamento.

Palavras-chave: Nanopartículas, Citotoxicidade, CTM-TAs, MC3T3-E1, PC-3.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
2-OBJETIVOS	4
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
3.1- Síntese e Caracterização das Nanopartículas.....	4
3.2- Isolamento do método não-enzimático das CTM-TAs humano.....	5
3.3- Caracterização das CTM-TAs humano por Citometria de Fluxo.....	5
3.4- Cultura de CTM-TAs humano, MC3T3-E1 e PC-3.....	6
3.5- Dispersão das nanopartículas.....	7
3.6- Ensaio de viabilidade celular.....	7
3.7- Análise Estatística.....	9
4-RESULTADOS.....	9
4.1-Isolamento e Caracterização das CTM-TAs humano pelo método não-enzimático ...	9
4.2- Ensaio de viabilidade celular.....	10
5- DISCUSSÃO.....	17
6- CONCLUSÃO.....	20
7- REFERÊNCIAS.....	21

1 INTRODUÇÃO

Novos biomateriais envolvendo nanopartículas em suas matrizes estão sendo descobertos. A nanociência e a nanotecnologia retratam uma nova fase, na qual os biomateriais apresentam tamanho que variam na escala de 0,1 a 100 nm, o que tem permitido novas aplicações em comparação aos materiais que apresentam escala macroscópica, devido às suas propriedades químicas e físicas as quais têm grande influência no modo como interagem com o meio ambiente e com os componentes biológicos, assim como na forma que se movimentam, acumulam e se degradam no corpo. (CARREIRA et al., 2009; SYAMA et al., 2014).

O desenvolvimento de NPs ocasionou grandes mudanças, principalmente na área biomédica, onde as nanopartículas podem ser usadas na liberação de fármacos, bioimagem, biodeteção e fins terapêuticos. Além disso, as NPs estão constantemente presentes em soluções aquosas, onde grande área de superfície específica e pressão superficial elevada ajudam nas interações celulares e na sua adsorção. Os seres humanos são expostos a nanopartículas através de diferentes meios, por possuírem aplicações médicas, além de serem usadas em tintas, embalagens de alimentos, produtos cosméticos, nanosensores, etc. (AUFFAN et al., 2006; SYAMA et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

O crescente uso de NPs em produtos industriais e de consumo indica preocupação global em relação ao seu potencial impacto na saúde humana e no meio ambiente. Embora tenha ocorrido vários estudos sobre os efeitos das NPs, ainda existem muitos problemas e desafios encontrados quando se trata da toxicidade das NPs em sistemas biológicos. O entendimento sobre as interações nano-bio poderá ajudar a criar novas aplicações de NPs e impedir possíveis efeitos prejudiciais para os sistemas biológicos causados por elas (XU, M et al., 2012).

Dentre todas as nanopartículas, as de propriedades metálicas têm chamado atenção em virtude da existência de aplicações potenciais nos campos optoeletrônicos, catalíticos e biomédicos. Dos diversos elementos metálicos, a prata (Ag) é conhecida por apresentar

propriedades antibacterianas com pequena toxicidade para humanos e animais. Além disso, ela é de fácil obtenção e baixo custo, e seus íons liberados das nanopartículas são capazes de agir no fosfato das moléculas de DNA, ocasionando a inativação da sua replicação (CARREIRA et al., 2009; KOGA et al., 2009).

Assim como a prata, o óxido de zinco (ZnO) tem como principais características a baixa toxicidade e biodegradabilidade. As nanopartículas de ZnO são muito utilizadas em produtos industrializados, e, portanto, sua biocompatibilidade e toxicidade são assuntos muito importantes para investigar. O ZnO é considerado semicondutor do grupo II-VI, possui estrutura de cristal wurtzito hexagonal, tem grande banda de energia e alta energia de ligação, além de apresentar alta estabilidade térmica e mecânica (SILVA et al., 2017).

O ZnO consegue se desfazer lentamente, tanto em ambiente ácido (em células tumorais) quanto em ambientes básicos, caso a superfície esteja em contato direto com a solução. Além disso, as nanopartículas de ZnO possuem grande detecção química e condutividade elétrica, além de ter propriedades de dispersão ultravioleta e antimicrobiana. Por esses motivos, as nanopartículas de ZnO e Ag são de grande interesse para aplicações biomédicas (KRÓL et al., 2017; ZHANG et al., 2013).

A limitada quantidade de informações acerca dos efeitos tóxicos celulares dos nanomateriais faz com que a nanomedicina enfrente várias questões regulatórias em um processo complexo e dispendioso, mas necessário, independentemente do nanomaterial ou aplicação (ALMEIDA, R. J., 2011).

A partir dessas informações, os estudos da toxicidade dessas nanopartículas são importantes, visto que existem vários fatores que contribuem para esse efeito de citotoxicidade, tais como o seu tamanho, forma, composição química e presença de impurezas (SYAMA et al., 2014).

As células-tronco mesenquimais são células indiferenciadas e definidas por sua capacidade de autorrenovação e diferenciação para diversos tipos celulares, tais como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos, hepatócitos e células neuronais (BYDŁOWSKI et al., 2009). Além da medula óssea, o tecido adiposo destaca-se como fonte de células-tronco. Este tecido oferece mais vantagens em comparação a outras fontes por apresentar baixo risco para doadores, pois a coleta do tecido é feita por métodos menos invasivos, possui alto rendimento, além de proporcionarem fácil isolamento e expansão em cultura, e por ser capaz de manter seu potencial proliferativo de oito a dez passagens sem qualquer deterioração detectável em sua capacidade de autorrenovação, além da ausência de rejeição imunológica. Devido a essas características, as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TAs) tornam-se fonte atraente para terapias celulares, sendo considerada nova ferramenta terapêutica para reparação ou regeneração de órgãos danificados (GHORBANI et al., 2013; ZUK et al., 2002).

Assim como as CTM-TAs, as células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 são excelentes fontes para terapias celulares e têm a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos e osteócitos *in vitro*. Com isso, nanomateriais são testados para as células se ligarem, proliferarem e diferenciarem para substituírem o tecido ósseo danificado ou ajudar na restauração da funcionalidade prejudicada, em casos de doenças ósseas como artrite, artrose e câncer (GEORGOPOULOU et al., 2018).

Outro tipo celular com grande potencial para testes é a PC-3, uma linhagem de célula tumoral da Próstata que foi estabelecida em 1979 (KAIGHN ME et al., 1979). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostrou que o câncer de próstata é o segundo mais comum entre os homens. Normalmente, o câncer é tratado com cirurgias, quimioterapias e radiação, que destroem as células cancerígenas mas também atingem as células normais. No entanto, a nanomedicina está se desenvolvendo para substituir o método convencional do tratamento do câncer usando as nanopartículas, que conseguem agir somente nas células tumorais e possuem

benefícios como alta solubilidade, biodisponibilidade, biocompatibilidade e multifuncionalidade. Portanto, várias NPs estão sendo pesquisadas com o intuito de também serem usadas para terapias antineoplásicas (BISHT et al., 2016).

Assim, para avaliar as possíveis aplicações das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) associadas à prata (Ag) faz-se necessária a análise da citotoxicidade dessas nanopartículas com diferentes concentrações em cultura celular, podendo-se utilizar como modelo estes tipos celulares: CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a avaliação da biocompatibilidade das nanopartículas de óxido de zinco dopadas com óxido de prata e európio em cultura de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TAs), linhagem de célula pré-osteoblástica (MC3T3-E1) e linhagem de célula tumoral da próstata (PC-3).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese e caracterização das Nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas e caracterizadas pela Prof^a. Dr^a. Anielle Christine Almeida Silva no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores localizado no Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia.

As nanopartículas são de ZnO dopado com prata e 54% de óxido de prata (AgO). Além disso, em todas as concentrações de európio (Eu) os íons de európio estão dentro das nanopartículas de ZnO, em uma concentração de wurzita. Essas nanopartículas estão sendo patenteadas, o que pode ser verificado pelo código: BR 10 2018 007714 7.

3.2 Isolamento do método não-enzimático das CTM-TAs humano

As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TAs) foram obtidas através da lipoaspiração humana, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética (CEP- UFU nº 1.776680).

O material lipoaspirado foi levado ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, e ficou em repouso por 1 hora para que ocorresse a sua decantação, resultando na parte superior líquido oleoso, no meio o tecido adiposo e na parte inferior as células sanguíneas. Posteriormente, 15 mL do tecido adiposo foram retirados através de seringa e colocados em um tubo falcon de 50 mL acrescentado de 15 mL de soro fetal bovino (SFB) para lavagem, e em seguida centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, ocorreu a separação e somente o tecido adiposo foi recolhido novamente para realização dos mesmos passos anteriores.

Depois da terceira centrifugação, fragmentos do tecido adiposo foram coletados e colocados no canto inferior de garrafas de cultura de 25cm² e cobertos com SFB. Após 24 horas, foi inserido meio DMEM baixa glicose suplementado com 20% de SFB e 0,1 % de Gentamicina a 50 µg/mL. As células permaneceram na incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO₂ e até atingirem 80-90% de confluência, o meio foi trocado a cada dois dias.

3.3 Caracterização das CTM-TAs humano por Citometria de Fluxo

O Comitê de Células-Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy) estabeleceu quatro critérios para caracterização das CTM-TAs humano, que são:

- 1- Devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições padrão de cultura;
- 2- Devem possuir capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica, e condrogênica;

3- Devem expressar CD73, CD90 e CD105;

4- Não devem expressar marcadores de linhagem hematopoiéticas; CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 alfa, e antígeno leucocitário humano (HLA)-DR (DOMINICI, M, et al., 2006).

Os marcadores utilizados neste trabalho foram: CD11b APC, CD 45 FTIC, CD34 PerCP e CD73 PE (todos da Beckman Coulter). As amostras foram analisadas no citômetro BD LSRFortessa (BD) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de Salvador - BA, utilizando os softwares BD FACSDiva e o FlowJo.

3.4 Cultura de CTM-TAs humano, MC3T3-E1 e PC-3

As CTM-TAs foram isoladas mediante protocolo não enzimático e cultivadas em garrafas de cultura de 150 cm² com 20 mL de meio de cultura DMEM baixa glicose e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB).

A linhagem de MC3T3-E1 foi obtida através do Banco de Células do Rio de Janeiro, cultivadas em garrafas de cultura de 75cm² com 10mL de meio α -MEM suplementado com 2,2g/L de bicarbonato de sódio; 0,1 % de Gentamicina a 50 μ g/mL e 10% de SFB.

Para a célula PC-3, derivada de câncer de próstata, foram usadas garrafas de cultura de 75cm² cultivada com meio RPMI suplementado com 2,0g/L de bicarbonato de sódio; 0,1 % de Gentamicina a 50 μ g/mL e 10% de SFB.

Durante todo o tempo de cultivo, todas as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e os meios trocados a cada 2 dias. Após confluência de 90%, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com tripsina a 0,25% e contadas na câmara de Neubauer. Em seguida, foram plaqueadas 2 x 10⁴ células/poço, em placas de poliestireno de 96 poços e cultivadas por 24, 48 e 72 horas. A progressão da cultura foi avaliada por microscópio de luz invertido (Evos®).

3.5 Dispersão das nanopartículas

Foram preparadas soluções estoque com sete diferentes NPs (ZnO:AgO:0.3Eu; ZnO:AgO:1Eu, ZnO:AgO:5Eu, ZnO:AgO:10Eu, ZnO:AgO:20Eu, ZnO:Ag, ZnO:Eu) em água ultrapura em concentração de 2 mg/mL. Em seguida, as NPs foram dispersas com sonicador Hilscher Ultrasound Technology em banho de gelo para resfriar as suspensões, controlando a temperatura das amostras. Foi feita então a sonicação utilizando 50% de amplitude e 32W de potência no tempo de 10 minutos, tendo duração de um pulso *ON* por 8 segundos e um *OFF* por 2 segundos. Posteriormente, foi feita a preparação da solução estoque de todas as NPs através da diluição estoque de 2 mg/mL em meio de cultura, relativo a cada célula utilizada (CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC3), suplementado com 10% de SFB e 1,25 µl/ml de albumina (BSA), utilizada como agente estabilizador, evitando a agregação das NPs. As concentrações estabelecidas foram de 10µg/mL, 20µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL.

3.6 Ensaio de viabilidade celular

As culturas foram avaliadas quanto à viabilidade celular e citotoxicidade das NPs utilizando o ensaio MTT (3- (4,5-Dimetiltiazol- 2-yl) -2,5- difeniltetrazol brometo). Este ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium em cristais de formazan, de cor púrpura. Para isso, as células foram cultivadas em placa de 96 poços *overnight* para aderência. Após esse prazo, o meio de cultura foi substituído pelo meio correspondente às 7 diferentes NPs em quatro concentrações diferentes 10µg/mL, 20µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL (conforme figura 1) e analisadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas. Além das concentrações, neste experimento foi estabelecido três controles: o branco que possui apenas o meio correspondente a cada tipo celular, com 10% de SFB; o controle positivo que contém célula e meio a 10% de SFB e o controle negativo com

células e 50% de DMSO. Cada teste (concentração e controles) foi realizado em triplicata para fazer a estatística e diminuir a possível margem de erro dos resultados.

	[10]ug/mL	[20]ug/mL	[50]ug/mL	[100]ug/mL
0.3 Eu				
1 Eu				
5 Eu				
10 Eu				
20 Eu				
Sem Eu				
Eu				
Controle				

Figura 1: Layout da placa de 96 poços para realização do ensaio de MTT.

Após o tempo indicado (24, 48 e 72 hrs), o meio foi retirado e adicionado 100 µL de PBS 1x para lavagem. Em seguida, o PBS foi removido e adicionado 10 µL da solução de MTT (5mg/mL) com 90 µL de meio sem soro e a placa ficou incubada por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e em seguida adicionados 100 µL de DMSO à temperatura ambiente. Após a solubilização dos cristais, a quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm e os resultados da densidade óptica foram obtidos e expressos em triplicata. Depois, foi realizado o cálculo da viabilidade celular utilizando a seguinte fórmula.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs Branco}}{\text{Abs Controle} - \text{Abs Branco}} \times 100$$

$$\text{Abs Controle} - \text{Abs Branco}$$

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos dos experimento foram analisados pelo programa GraphPad Prism- versão 5.0 pelo método one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e caracterização das CTM-TA humano pelo método não-enzimático

Após o processo de isolamento e início do cultivo celular, as células apresentaram formato fibroblastóide em monocamada, que correspondem aos primeiros requisitos para caracterização das CTMs, que é a morfologia e aderência ao plástico. (Fig 2).

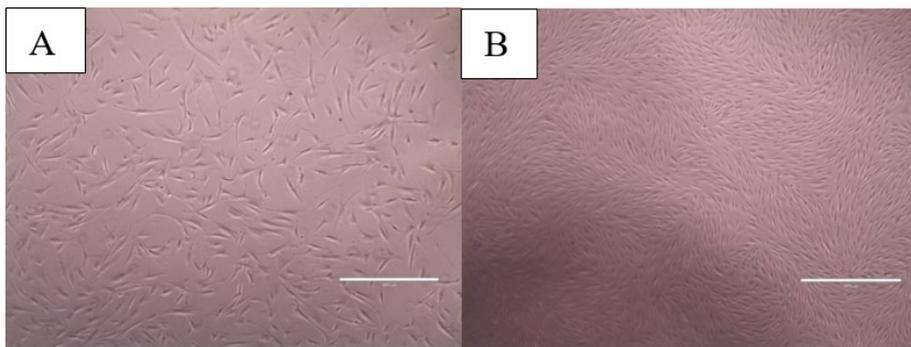


Figura 2 - CTM-TA em segunda passagem, evidenciando suas características de adesão à garrafa e distribuição em monocamada, bem como sua morfologia fibroblastóide. Fotomicrografias com aumentos de 10x (A) e 4x (B), respectivamente. (Fonte: GEP-CP, laboratório de nanotecnologia- UFU).

Após análise por citometria de fluxo (BD LSRFortessa) a homogeneidade da população de CTM-TAs pode ser observada no gráfico FSC (ângulo de dispersão frontal, que detecta o tamanho celular) e SSC (ângulo de dispersão lateral, que detecta a composição celular, granulosidade) (Fig.3).

Características Morfológicas

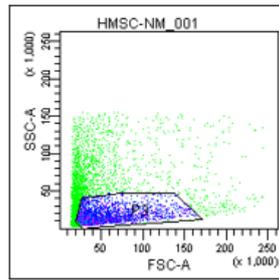


Figura 3– Análise do SSC e FSC da população de CTM-TA por citometria de fluxo.

Depois de encontrar, delimitar e validar qual a quantidade das células isoladas eram a população de CTM-TAs, foram avaliados marcadores de superfície negativos CD45, CD34 e CD11b e marcador positivo CD73 (Fig. 4).

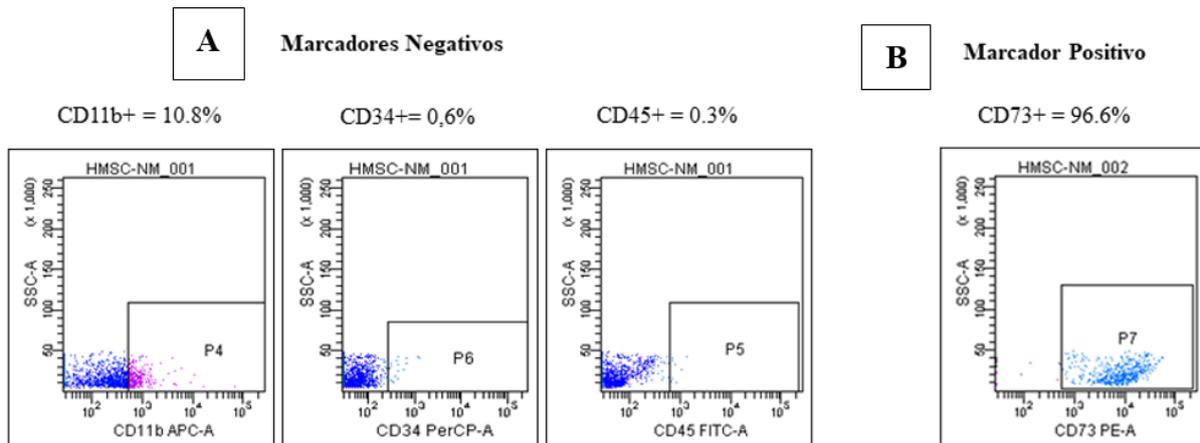


Figura 4– Análise dos marcadores de superfície das CTM-TAs por citometria de fluxo: A) Marcadores negativos: CD11b, CD34 e CD45 e B) marcador positivo: CD73.

Estes resultados mostram que as células isoladas apresentaram os critérios determinados pela ISTC para caracterização de população de CTMs (DOMINICI, M, et al., 2006).

4.2 Ensaio de Viabilidade Celular

As NPs ZnO:AgO:0.3Eu não apresentaram efeito citotóxico significativo para as CTM-TAs e MC3T3-E1 em nenhuma das condições testadas. Porém, para a linhagem tumoral da próstata

(PC-3), na concentração de 100µg/mL, as células apresentaram baixa viabilidade nos tempos de 24, 48 e 72 hrs, obtendo -53,30%; -56,72% e -29,38%, respectivamente (fig. 5).

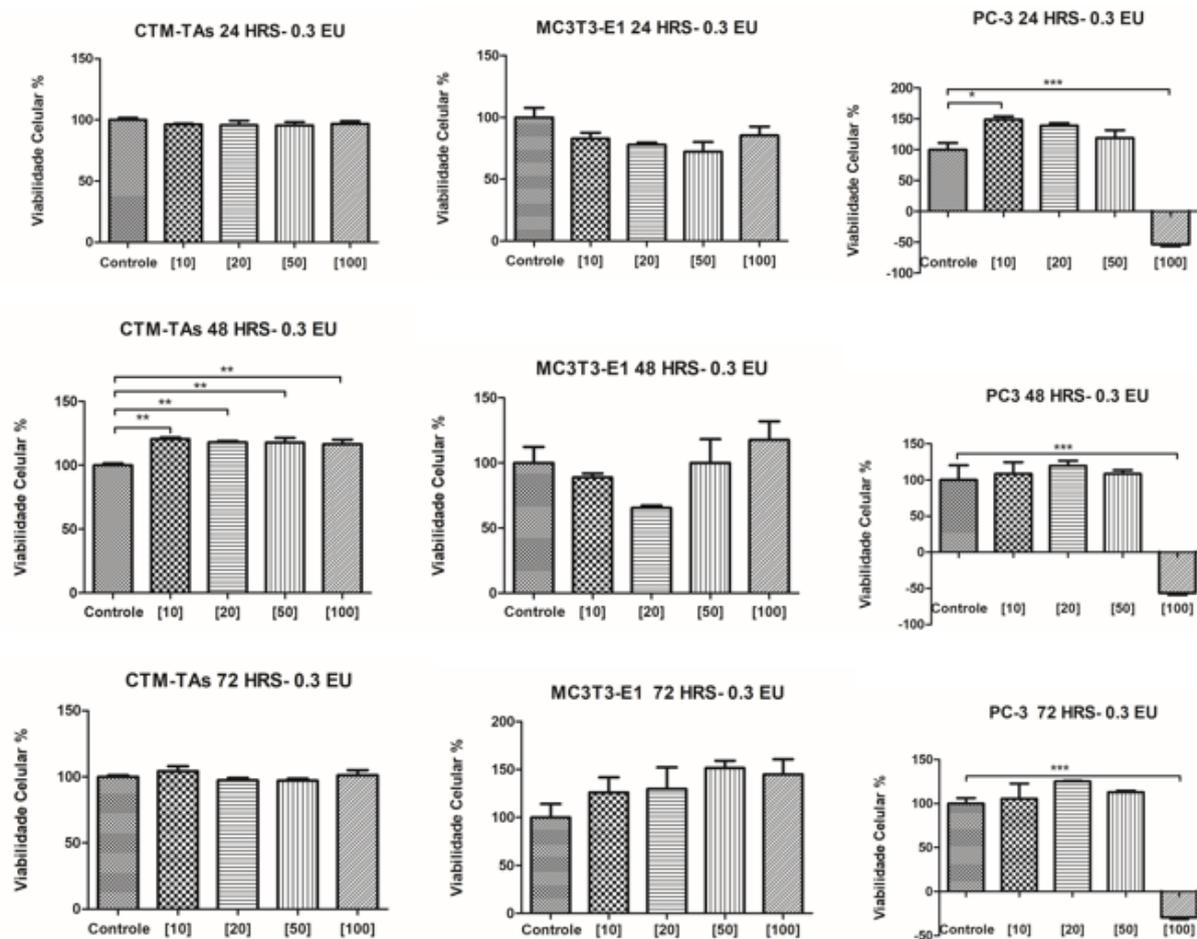


Figura 1: Efeito das NPs de ZnO:AgO:0.3 Eu na viabilidade das CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3. Todas as células foram tratadas com diferentes concentrações de NPs (10, 20, 50 e 100 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A citotoxicidade das NPs foi determinada usando o ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em média+ DP. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005.

Já as NPs de ZnO:AgO:1Eu, não apresentaram redução significativa da viabilidade em nenhuma condição testada. (fig. 6).

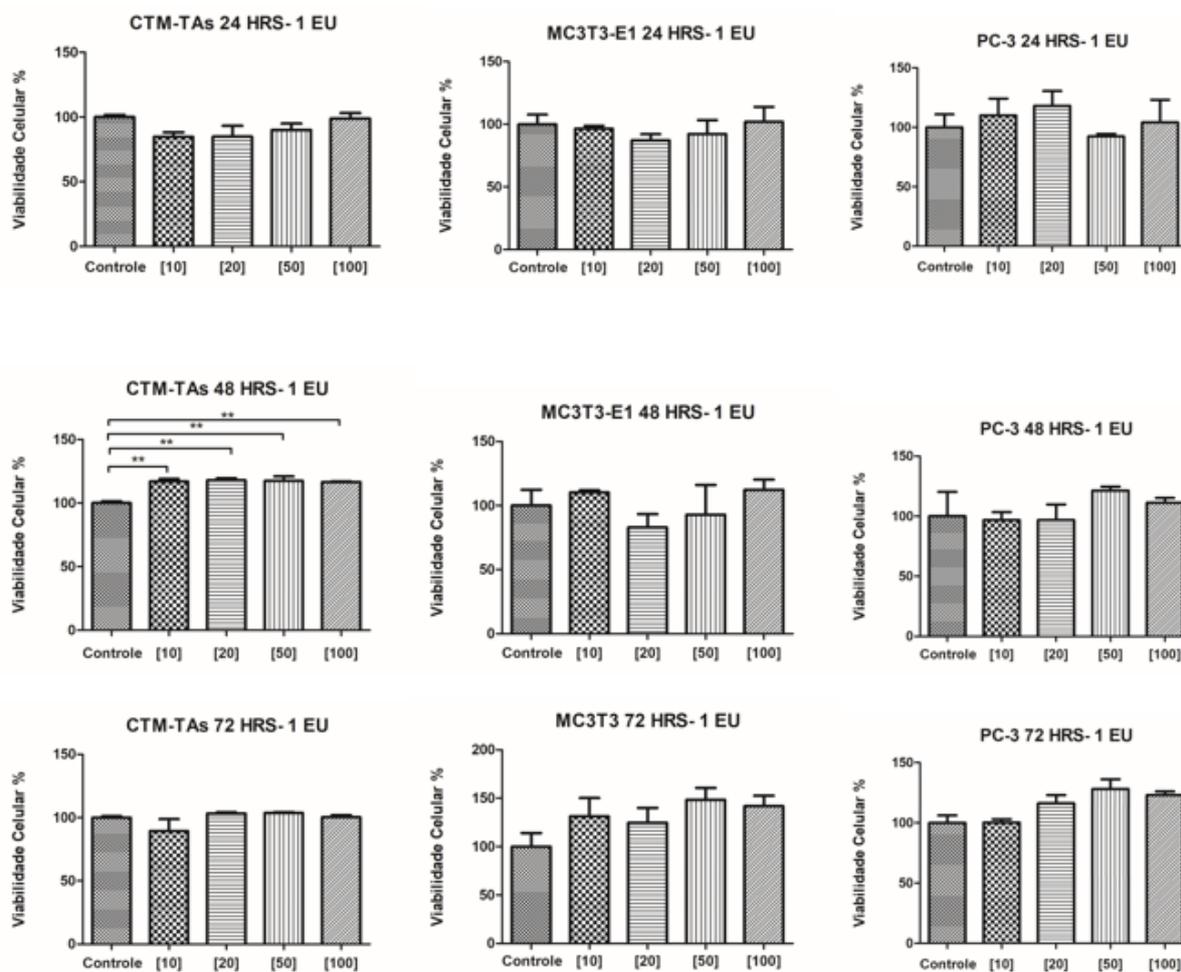


Figura 6: Efeito das NPs de ZnO:AgO:1 Eu na viabilidade das CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3. Todas as células foram tratadas com diferentes concentrações de NPs (10, 20, 50 e 100 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A citotoxicidade das NPs foi determinada usando o ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em média+ DP. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005.

As NPs ZnO:AgO:5Eu, além de não ter demonstrado citotoxicidade significativa em nenhuma das células utilizadas, no tempo de 48 hrs nas CTM-TAs exibiram alta viabilidade nas concentrações de 10, 20 e 50µg/mL. Da mesma maneira, no tempo de 72 hrs nas concentrações de 20,50 e 100µg/mL houve estímulo de crescimento das células PC-3 (fig. 7).

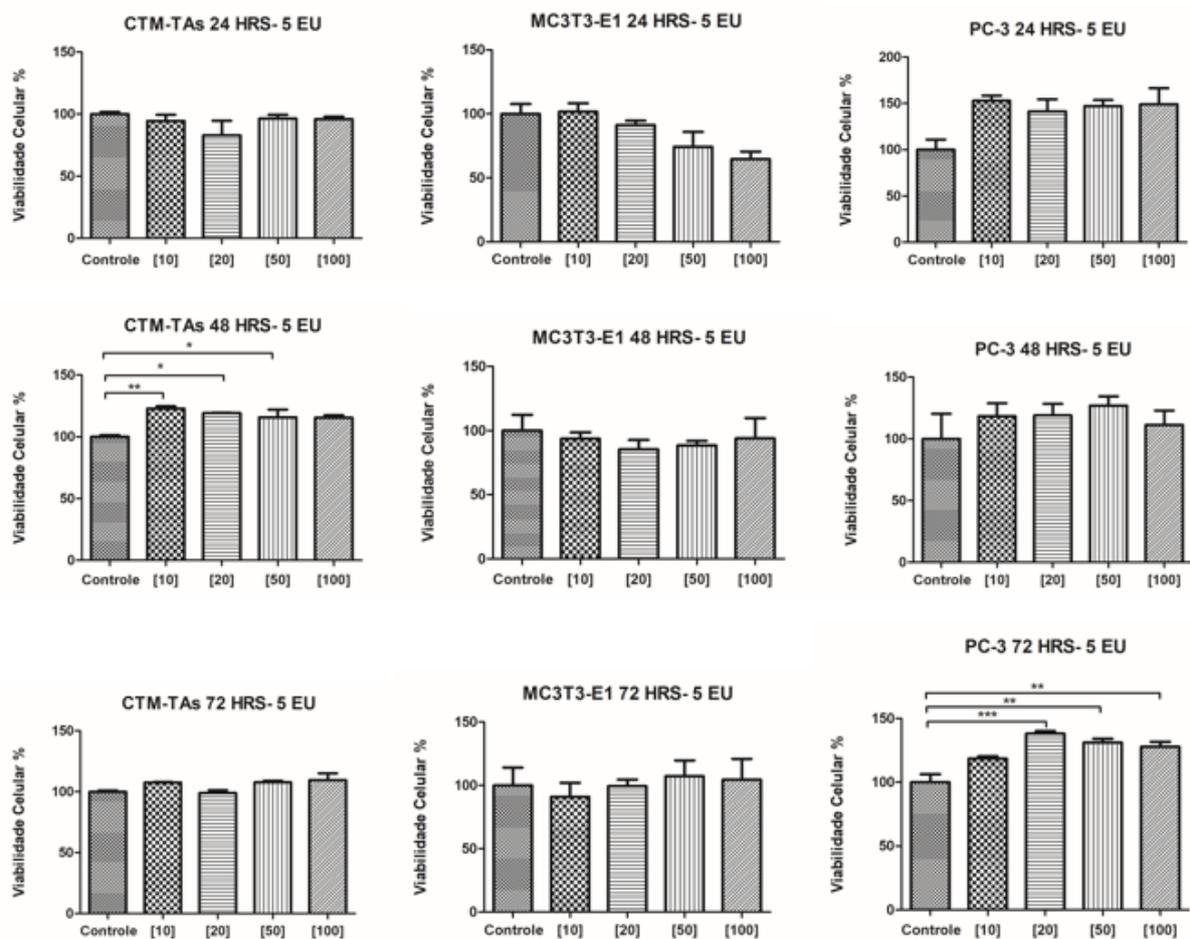


Figura 7: Efeito das NPs de ZnO:AgO:5 Eu na viabilidade das CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3. Todas as células foram tratadas com diferentes concentrações de NPs (10, 20, 50 e 100 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A citotoxicidade das NPs foi determinada usando o ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em média+ DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

Da mesma forma, as NPs ZnO:AgO:10Eu não demonstraram citotoxicidade para CTM-TAs, MC3T3-E1 e nem para a PC-3. Ao invés disso, foi demonstrado que houve estímulo de crescimento celular no tempo de 48 hrs para as CTM-TAs em todas as concentrações, e no tempo de 72 hrs nas concentrações de 50 e 100µg/mL (fig. 8).

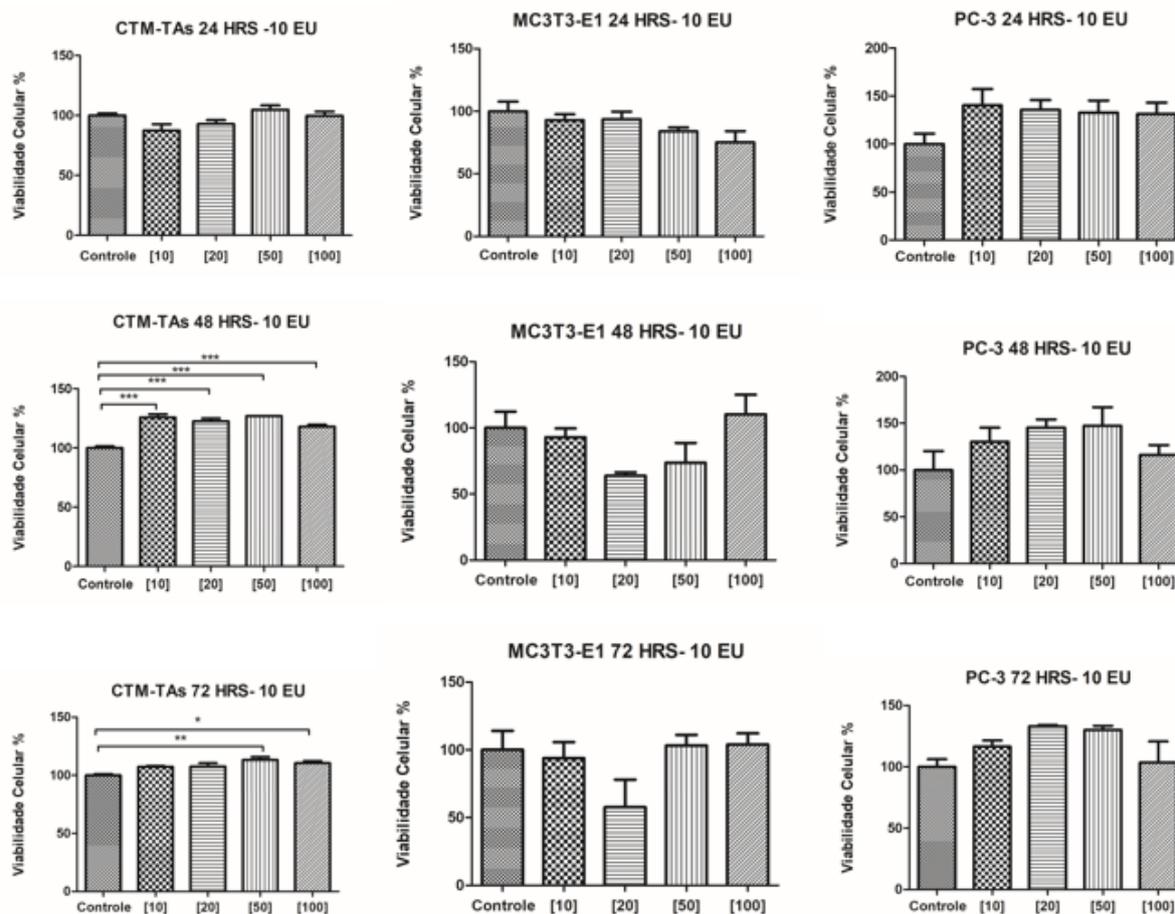


Figura 8: Efeito das NPs de ZnO:AgO:10 Eu na viabilidade das CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3. Todas as células foram tratadas com diferentes concentrações de NPs (10, 20, 50 e 100 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A citotoxicidade das NPs foi determinada usando o ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em média+ DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

As NPs ZnO:AgO:20Eu estimularam as células PC-3 no tempo de 24 hrs nas concentrações de 10, 20 e 50µg/mL e no tempo de 72 hrs nas concentrações de 20, 50 e 100 µg/mL. Já as CTM-TAs foram estimuladas no tempo de 48 hrs em todas as concentrações testadas (fig. 09).

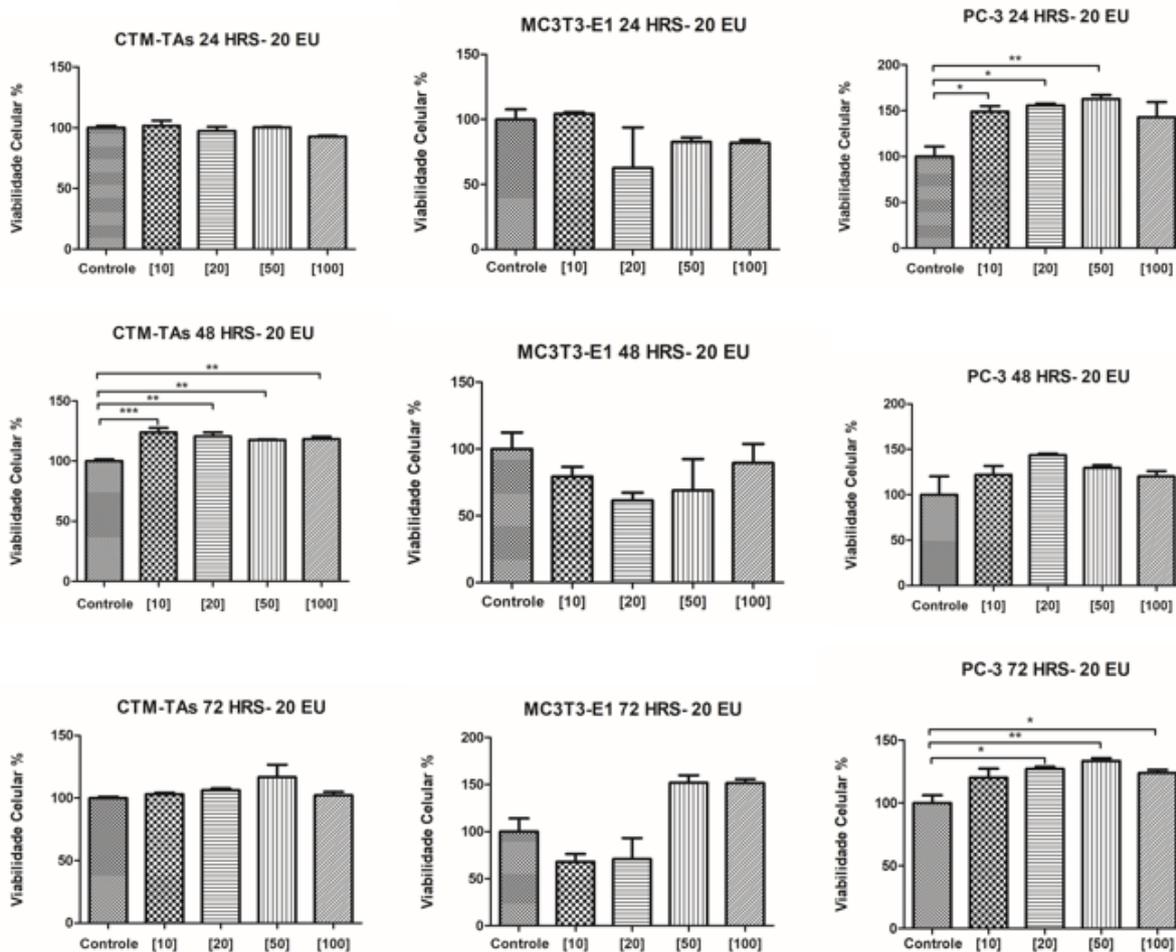


Figura 9: Efeito das NPs de ZnO:AgO:20 Eu na viabilidade das CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3. Todas as células foram tratadas com diferentes concentrações de NPs (10, 20, 50 e 100 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A citotoxicidade das NPs foi determinada usando o ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em média+ DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

As células cultivadas com NPs ZnO:Ag, que não contêm Európio demonstraram comportamento diferente em relação a viabilidade celular. Para as CTM-TAs foi verificado estímulo na viabilidade celular no tempo de 72 hrs na concentração de 100 µg/mL. Já para a linhagem pré-osteoblástica MC3T3-E1 ocorreu redução significativa na viabilidade celular nos tempos de 24 e 48 hrs para as concentrações de 50 e 100µg/mL. E para a PC-3, na concentração de 100µg/mL em todos os tempos testados, foi exibido citotoxicidade significativa (fig. 10).

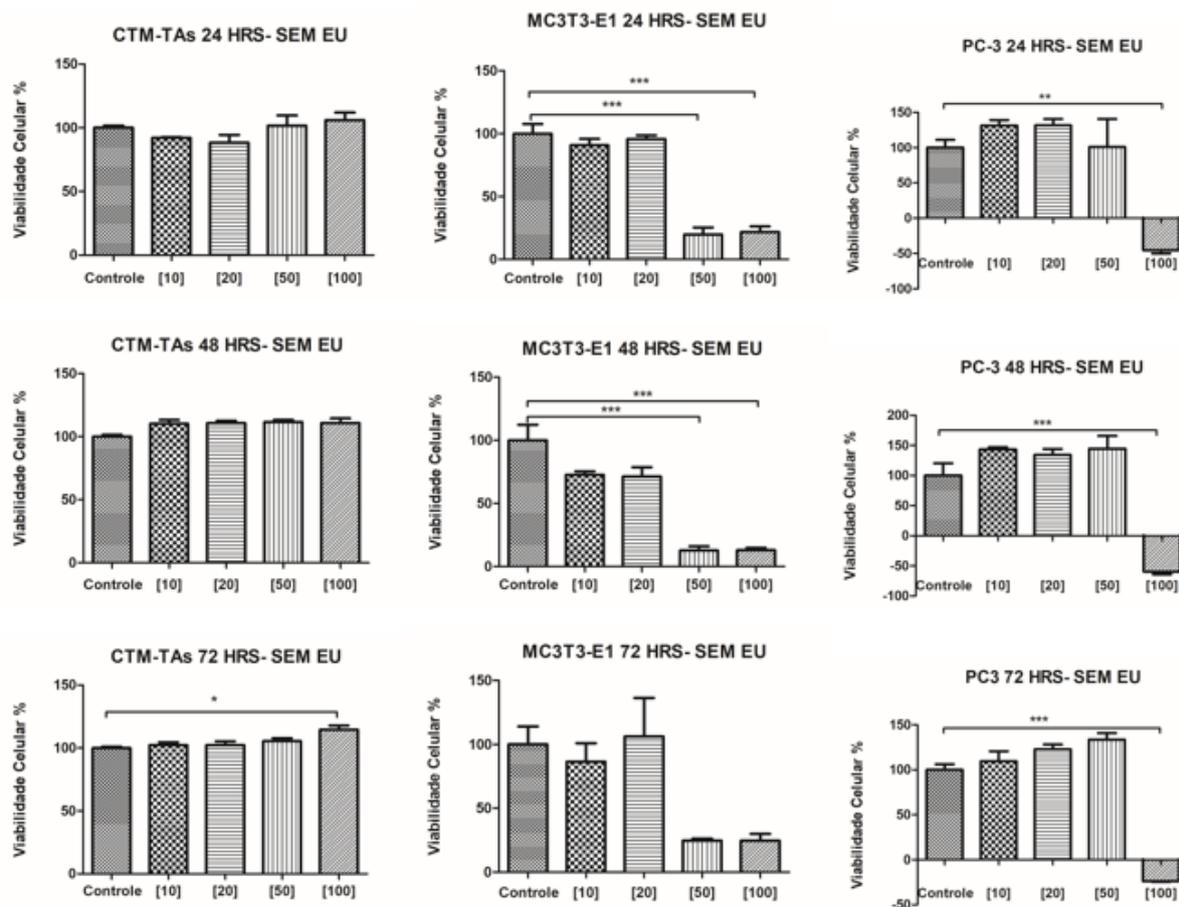


Figura 10: Efeito das NPs de ZnO:Ag na viabilidade das CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3. Todas as células foram tratadas com diferentes concentrações de NPs (10, 20, 50 e 100 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A citotoxicidade das NPs foi determinada usando o ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em média+ DP. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005.

Por último, as NPs ZnO:Eu mostraram baixa viabilidade apenas para as MC3T3-E1 no tempo de 24 hrs nas concentrações de 50 e 100µg/mL. Para as CTM-TAs nos tempos de 48hrs na concentração de 50µg/mL e 72 hrs na concentração de 50 e 100µg/mL teve estímulo na viabilidade celular. E para a PC-3, somente na concentração de 100µg/mL no tempo de 24 hrs que foi observado aumento significativo na viabilidade celular (fig.11).

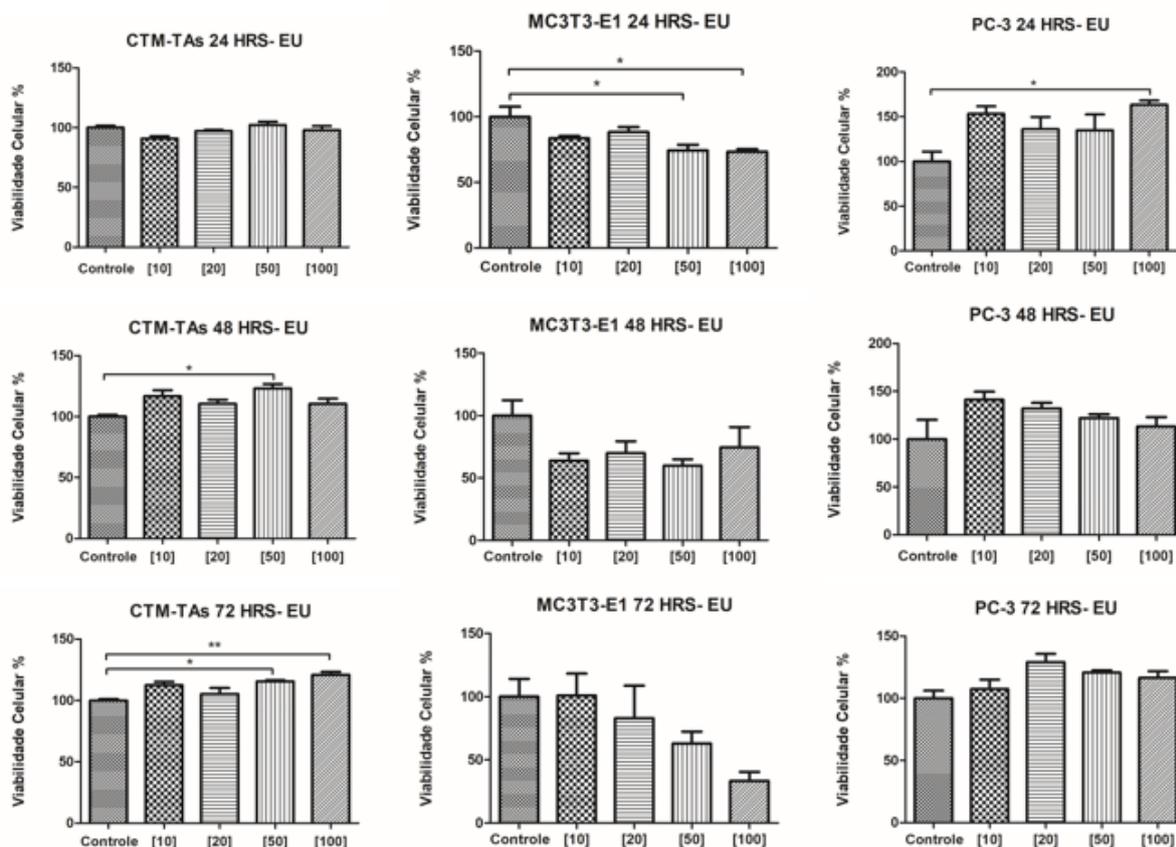


Figura 11: Efeito das NPs de ZnO:Eu na viabilidade das CTM-TAs, MC3T3-E1 e PC-3. Todas as células foram tratadas com diferentes concentrações de NPs (10, 20, 50 e 100 µg/mL) por 24, 48 e 72h. A citotoxicidade das NPs foi determinada usando o ensaio de MTT. Os resultados estão expressos em média+ DP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi pesquisado a biocompatibilidade das NPs de ZnO dopadas com Ag, 54% de AgO e concentrações crescentes de Európio (0,3, 1, 5, 10, 20); NPs de ZnO dopadas somente com Ag e NPs de ZnO dopadas somente com Európio; em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TAs), linhagem de célula pré-osteoblástica MC3T3-E1 e linhagem de célula tumoral da próstata PC-3. Para avaliar o efeito citotóxico dessas nanopartículas, foi feito o ensaio de MTT, onde as células foram tratadas com as NPs nas concentrações de 10, 20, 50 e 100µg/mL e nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

As NPs ZnO:AgO:0.3Eu, apresentaram efeito citotóxico na linhagem tumoral de próstata (PC-3) na concentração de 100µg/mL, enquanto que nas CTM-TAs e MC3T3-E1 não foi constatado nenhum efeito citotóxico. Esses resultados corroboram com estudos que indicam que NPs de ZnO induzem a morte de células tumorais e não possuem efeito citotóxico em células normais. HANLEY et al. (2008) demonstraram que NPs de ZnO não possuem efeito em células normais, porém são tóxicas para células T cancerígenas, demonstrando maior sensibilidade às NPs de ZnO do que as células saudáveis. OSTROVSKY et al. (2009) confirmam que para as células tumorais, as NPs de ZnO prolongam seu efeito citotóxico, o que não acontece para células normais. Esse mecanismo de atividade antitumoral pode estar associado a geração de espécies reativas de oxigênio, onde as nanopartículas induzem maior produção de ROS em células cancerígenas do que em células normais, resultando em apoptose (KRÓL et al., 2017). As NPs de Ag também possuem efeito sobre células cancerígenas. RAMAN et al. (2015), demonstraram que as NPs de Ag inibiram significativamente a viabilidade celular de células PC-3, induzindo morte celular dependente da dose após 24 horas de tratamento. Constataram que concentrações superiores a 10µg/mL foram significativamente tóxicas para as células. Contudo, nossos resultados mostraram que somente na concentração de 100µg/mL as nanopartículas surtiram efeito citotóxico para a PC-3, e contrariamente, no tempo de 48 horas de exposição ao estímulo, para as CTM-TAs foi observado aumento na viabilidade em todas as concentrações testadas.

Do mesmo modo, as NPs de ZnO:Ag apresentaram efeito citotóxico para as células tumorais da próstata (PC-3) na concentração de 100µg/mL. Entretanto, diferentemente do resultado das NPs de ZnO:AgO:0.3Eu, as células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) mostraram redução significativa na viabilidade celular em todos os tempos, nas concentrações de 50 e 100µg/mL. Observa-se também que as NPs de ZnO:Eu demonstraram efeito citotóxico para as MC3T3-E1 no tempo de 24 hrs de tratamento nas concentrações de 50 e 100µg/mL. SOENEN et al (2012),

aborda que as nanopartículas podem ser vistas como materiais estranhos para a célula, e devido a isso, geram espécies reativas de oxigênio (ROS) que é um fenômeno bastante comum à essa citotoxicidade. Quando as células passam por algum tipo de estresse, elas geram moléculas quimicamente ativas contendo oxigênio. Porém, os níveis de ROS e a indução de efeitos tóxicos é dependente da célula e ainda não está muito bem definido. Além disso, a indução de ROS é considerado efeito transitório, que atinge níveis máximos aproximadamente 24 h após a internalização das NPs na célula e depois diminui ao longo de um período de 72 hrs. As ROS que são induzidas por NPs podem afetar a atividade da enzima mitocondrial e assim perturbar os ensaios de MTT.

Interessantemente, para as NPs de ZnO:AgO:1Eu; ZnO:AgO:5Eu, ZnO:AgO:10Eu e ZnO:AgO:20Eu, não houve efeito significativo de citotoxicidade para nenhuma das células utilizadas em nenhum dos tempos testados, e sim estímulo da viabilidade principalmente em CTM-TAs no tempo de 48 horas de tratamento. Além das NPs de ZnO e Ag não apresentarem citotoxicidade para as células normais, também não foi observado inibição da viabilidade nas células tumorais da próstata, o que é curioso pois essas nanopartículas demonstraram mecanismo antitumoral como visto anteriormente.

Por outro lado, as células tumorais têm características específicas e com isso alteram as vias de sinalização intracelular que regulam positivamente a proliferação e mantêm a viabilidade celular, o que as tornam menos propensas a alguns efeitos citotóxicos causados por nanopartículas (SOENEN et al.,2012). Esses resultados podem ter se dado dessa forma também por influência de uma maior quantidade dos íons de Európio que possuem certa fluorescência e com isso podem interferir na leitura ou até mesmo interagir com os componentes do ensaio.

Também, existe necessidade de padronizar os protocolos utilizados a fim de melhorar a comparação dos dados gerados e melhorar o entendimento da citotoxicidade induzida pelas nanopartículas. Como por exemplo para tipo específico de nanopartícula, saber qual o tipo de

célula usada, o intervalo de concentrações e tempos de incubação utilizados, pois diferentes tipos de células podem agir de maneira diferente utilizando a mesma nanopartícula (SOENEN et al.,2012).

6 CONCLUSÃO

As células tumorais da próstata (PC-3) cultivadas com NPs de ZnO:AgO:0.3Eu e ZnO:Ag na concentração de 100µg/mL apresentaram diferentes padrões de viabilidade em todos os tempos (24, 48 e 72h), indicando possível efeito antineoplásico dessas NPs. Além disso, as NPs de ZnO:Ag nos tempos de 24 e 48h e as NPs de ZnO:Eu no tempo de 24h, induziram redução na viabilidade em células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1).

Porém, na maioria das concentrações e tempos dos experimentos, as NPs estimularam viabilidade, indicando possível utilização nas células testadas, principalmente as CTM-TAs, em medicina regenerativa. Apesar disso, é necessária para melhor comparação e validação dos dados, a realização de mais ensaios.

7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Ronaldo José. Síntese e caracterização de nanocristais de TiO₂. Avaliação de sua biocompatibilidade através de implantes intraósseos. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
- AUFFAN, Melanie et al. In Vitro Interactions between DMSA-Coated Maghemite Nanoparticles and Human Fibroblasts: A Physicochemical and Cyto-Genotoxicity Study †. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 40, n. 14, p.4367-4373, jul. 2006. American Chemical Society (ACS).
- BISHT, Gunjan; RAYAMAJHI, Sagar. ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent. **Nanobiomedicine**, [s.l.], v. 3, p.1-9, jan. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.5772/63437>.
- BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F. L. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v. 31, p. 23-35, 2009.
- CARREIRA, C. M., et al. "Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias." Artigo apresentado no XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação—Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos (2009).
- DOMINICI, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
- GEORGOPOULOU, Anthie et al. Osteogenic Potential of Pre-Osteoblastic Cells on a Chitosan-graft-Polycaprolactone Copolymer. **Materials**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.490-14, 26 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ma11040490>.
- GHORBANI, A.; JALALI, A. S.; VAREDI, M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: A non-enzymatic method. *Tissue and Cell*. 2013.
- HANLEY C, Layne J, Punnoose A, Reddy KM, Coombs I, Coombs A, et al. *Nanotechnology*2008;19:295103.
- KAIGHN ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW.1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology* 17:16–23.
- KERN, Susanne et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. **StemCells**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.1294-1301, maio 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>.

KOGA, Hirotaka; KITAOKA, Takuya; WARIISHI, Hiroyuki. In situ synthesis of silver nanoparticles on zinc oxide whiskers incorporated in a paper matrix for antibacterial applications. **Journal Of Materials Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 15, p.2089-2260, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC).

KRÓL, P. Pomastowski, K. Rafińska, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. **Advances in Colloid and Interface Science**. p.37–52. 2017

OSTROVSKY S, Kazimirsky G, Gedanken A, Brodie C. *Nano Res* 2009;2002:882–90.

RAMAN, Jegadeesh et al. Mycosynthesis and characterization of silver nanoparticles from *Pleurotus djamor* var. *roseus* and their in vitro cytotoxicity effect on PC3 cells. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.140-147, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.11.003>.

SILVA, Anielle Christine Almeida et al. Functional Nanocrystals: Towards Biocompatibility, Nontoxicity and Biospecificity. **Advances in Biochemistry & Applications in Medicine**. Open Access Ebooks, 2017. Cap. 2. p. 1-27. Disponível em: <<http://openaccessebooks.com/biochemistry-applications-in-medicine.html>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

SOENEN, Stefaan J. et al. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. **Nano Today**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.446-465, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2011.08.001>.

SYAMA, S. et al. Zinc oxide nanoparticles induced oxidative stress in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. **Toxicology Mechanisms And Methods**, [s.l.], v. 24, n. 9, p.644-653, 3 set. 2014. Informa UK Limited.

XU, M. et al. Formation of Nano-Bio-Complex as Nanomaterials Dispersed in a Biological Solution for Understanding Nanobiological Interactions. *Sci. Rep.*2, 406; DOI:10.1038/srep00406. 2012.

ZHANG, Yin et al. “Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials.” **Current molecular medicine** 13.10 (2013): 1633–1645.

ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, December 1, 2002, p. 4279-4295. 2002.