

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Annelise Arantes Rocha

Estudo do efeito de nanocristais de Simonkolleite e Óxido de Zinco na produção de espécies reativas de oxigênio e citotoxicidade frente ao tratamento em linhagens tumorais de câncer de mama *in vitro*.

Uberlândia

12/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Estudo do efeito de nanocristais de Simonkolleite e Óxido de Zinco na produção de espécies reativas de oxigênio e citotoxicidade frente ao tratamento em linhagens tumorais de câncer de mama *in vitro*.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Uberlândia como requisito
para obtenção do título de Graduada em
Biomedicina.

**Orientada pelo Profº: Drº. Mrº. Marcelo José
Barbosa Silva|**

Uberlândia-MG

12/2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me apoiaram principalmente o pessoal do laboratório de Imunologia e Parasitologia da UFU, minha família e meu namorado, por sempre estarem do meu lado.

Uma coisa que sempre levo comigo não só em experimentos e faculdade, mas para a vida é
“Nunca desista dos seus sonhos” - Augusto Cury

DEDICATÓRIA

As pessoas não seriam nada sem o conhecimento, o saber e o ensinamento que move o mundo e faz serquem eu sou, um eterno aprendiz

RESUMO

Neste estudo, investigou o efeito citotóxico de nanocristais de Simonkolleite e Óxido de Zinco (ZnO) bem como seus nanocompósitos (NCT), em células tumorais. Este estudo abrangeu experimentos biológicos com as linhagens de células tumorais MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231. Nanocristais de ZnO apresentam efeito antitumoral e já são bastante estudados, já os nanocristais Simonkolleite vêm sendo investigados na área de dispositivos e seus efeitos físicos e químicos, e não foi encontrado estudos biológicos e oncológicos. Simonkolleite é um composto hidróxido de cloreto de zinco monohidratado, naturalmente encontrado em minas Alemães. Visando investigar os efeitos citotóxicos desses nanocristais sozinhos e misturados (compósitos), foram sintetizados esses nanocristais em laboratório. Estes experimentos tiveram como resultados a alta incidência de morte celular em altas concentrações de nanocristais (NCs) Simonkolleite e que em baixas concentrações notou-se a produção de espécies reativas de oxigênio, para ter o mesmo efeito esperado de citotoxicidade e produção de espécies reativas de oxigênio a concentração foi muito mais alta do ZnO e NCT que nos NCs de Simonkolleite. O Simonkolleite induz a produção de ROS nas células tumorais e o mesmo parece estar associado aos eventos de apoptose observados nesses experimentos.

Palavras-chave: Simonkolleite, Câncer de mama, Espécies reativas de oxigênio, citotoxicidade.

ABSTRACT

In this study, we investigated the cytotoxic effect of nanocrystals of Simonkolleite and Zinc Oxide (ZnO) as well as their nanocomposites (NCT) on tumor cells. This study is about biological experiments with MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 tumor cell lines. Nanocrystals of ZnO have an antitumor effect and are already well studied, since the nanocrystals Simonkolleite have been investigated in the area of devices and their physical and chemical effects, and no biological and oncological searches have been found. Simonkolleite is a hydrochloride compound of zinc chloride monohydrate, naturally found in German mines. Aiming to investigate the cytotoxic effects of these single and mixed nanocrystals (composites), these nanocrystals were synthesized in the laboratory. These experiments resulted in the high incidence of cell death at high concentrations of Simonkolleite nanocrystals (NCs) and that at low concentrations the production of reactive oxygen species was observed to have the same expected effect of cytotoxicity and the production of reactive species of oxygen concentration was much higher at ZnO and NCT than at the NCs at Simonkolleite. Simonkolleite induces the production of ROS in tumor cells and it seems to be associated with the apoptosis events observed in these experiments.

Key words: Simonkolleite, Breast cancer, Reactive oxygen species, cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figu1	pg. 8
Figu2	pg. 9
Figu3	pg.10
Figu4	pg.11
Figu5	pg.12
Figu6	pg. 13

LISTA DE ABREVIATURA

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DCFH2-DA- Diacetato.de.2',7'diclorodihidrofluoresceína

ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática

FITC- Fluoresceína

FD- Fator de diluição

MCF-7- Michigan Cancer Foundation-7

MTT- Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium

NPs-Nanopartículas

PBS- Tampão fosfato-salino

RPMI- Roswell Park Memorial Institute nome da sigla e onde desenvolveu

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SBF-Soro bovino fetal

ZnO- Óxido de zinco

NCT-nanocompósitos

NCs- Nanocristais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificativa	3
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo específico	4
3 METODOLOGIA	5
3.1 Cultura de células	5
3.2 Determinação da densidade celular	5
3.3 Obtenção das nanocristais	6
3.4 Ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular	6
3.5 Produção de espécies reativas de oxigênio	7
3.6 Análise estatística	8
3.7 Financiamento	8
4. RESULTADOS	9
5. DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO	19

1. INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de morte e um dos maiores problemas de saúde encontrados ao redor do mundo atualmente, por conter vários fatores de riscos os quais influenciam, por exemplo, fatores ambientais, culturais, genéticos e socioeconômicos. Entre diversos tipos de tumores malignos, os mais frequentes são de mama, próstata, pulmão e colorectal. (8,6%) (DE OLIVEIRA et al., 2015) (ESMAEILBEIG; KOUHPAYEH; AMIRGHOFRAH, 2015) .

O câncer de mama mais usual em mulheres dos EUA, com cerca de 61.000 casos de doença *in situ* e 246.660 casos de doença invasiva em 2016. Já no Brasil foram diagnosticados 600 mil novos casos, exceto o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), dentre eles 28,1% registrados no Brasil são de mulheres com câncer de mama, com base Instituto Nacional de Câncer e Sistema de Informações sobre Mortalidade. Portanto, menos de uma das seis mulheres diagnosticadas com câncer de mama vão a óbito; os homens representam 1% dos casos de câncer de mama e mortes por câncer de mama. Na última década, as mulheres as quais abandonaram o uso de hormônios pós-menopáusicos, a incidência de câncer de mama reduziu, mas não aos níveis observados antes do uso generalizado da mamografia de rastreamento. (Breast Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version, 2002)(INCA)

Os fatores de riscos mais frequentes para a progressão do câncer de mama são o histórico de câncer de mama na família(genético), mutação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* e outros genes do câncer da mama de maior susceptibilidade, ingestão de álcool ou fumante, menarca precoce, uso de terapia hormonal de estrogênio combinado com progestina, idade mais avançada e exposição à radiação nas mamas. As mutações no gene *BRCA1* usualmente exibem um fenótipo basal, caracterizado pela ausência da expressão proteica do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e/ou receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), essas supressões ou amplificações dos receptores são vistos em testes de prognósticos, como histologia convencional e imuno-histoquímica para seleção da terapia correta para determinado tipo de câncer de mama (Breast Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version, 2002) .

De acordo com a mutação nos receptores o câncer de mama pode ser classificado em três: luminal A, luminal B, HER-2 / + e o triplo negativo (ER, PR e HER2 /-)(CHAVEZ;

GARIMELLA; LIPKOWITZ, 2010) (Breast Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version, 2002).

Atualmente há um aumento dos esforços de pesquisa explorando o sistemas de nanopartículas (NP), exibindo materiais criados com efeitos terapêuticos promissores para o tratamento de vários tipos de câncer em um único “nanodrug”. Os NPs incluem aqueles com núcleos fundamentais de moléculas orgânicas (por exemplo, dendrímeros, DNA, lipídios, vírus e micelas), moléculas inorgânicas (por exemplo, óxido de ferro, ouro, pontos quânticos, nanotubos de carbono e fullerenos) ou um híbrido de dois ou mais destes componentes (REVIA; ZHANG, 2016).

Nanopartículas podem ser amorfas ou cristalinas, depende do grau de cristalinidade, tendo como consequencia efeitos biológicos diferentes. Sponó et al., demonstraram que nanopartículas amorfas são mais genotóxicas que as cristalinas(REIS; et al., 2015). Assim neste trabalho estaremos utilizando nanopartículas cristalinas, também denominadas como nanocrsitaís (Ncs)

Nanocristaís são cristaís na escala nanométrica (10⁻⁹ metro) com propriedades estruturais dos cristaís macroscópicos (ângulos e distâncias das ligações atômicas) (JIN; et al., 1995)

O Simonkolleite ($\text{Zn}_5(\text{OH})_8\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), é considerado um nanocristal inorgânico e foi obtido a partir do precursor de cloreto de zinco em 50% de metanol, resultado do intempérie natural gerados nas escórias de mina de Zinco (Zn) na região alemã de Michelsdorf, conhecido também de hidróxido de cloreto de zinco monohidratado; é um produto da corrosão do zinco e forma cristaís hexagonais,tendo sua ação vista na área de dispositivos, anti-bacteriana,mas não oncológica (LEE; KIM; KIM, 2017; MONIEM et al., 2015).

Os nanocristaídeos ZnO foram sintetizados por um método sonoquímico simples a partir de um precursor de zinco (cloreto de zinco, acetato de zinco ou nitrato de zinco), nesse caso derivado do NCs Simonkolleite, porém este Ncs já foi estudado anteriormente como um alvo antibacteriano e anti cancerígeno promissor, por ter efeitos citotóxicos e na produção de espécies reativas de oxigênio, e por não ser tóxico às células humanas saudáveis, enquanto que o NCs Simonkolleite ainda não foi estudado sua citotoxicidade as células humanas (GUNJAN; SAGAR, 2016; SIRELKHATIM; et al., 2015).

Com base nas vantagens dos nanocristaís de ZnO e ausência de estudos biológicos de Simonkolleite, neste estudo será investigado o efeito citotóxico desses nanocristaís, bem como seus nanocompósitos (NCT) em células tumorais.

1.1 Justificativa

Uma vantagem importante do tratamento do tumor alvo é a redução da citotoxicidade e genotoxicidade da substância ativa para células saudáveis. Portanto, novas modalidades de tratamento e com nanopartículas, se tornando cada vez mais importantes na terapia moderna contra o câncer e começam a se destacar entre as terapias tradicionais contra o câncer, como a radiação de quimioterapia e a cirurgia (GUNJAN; SAGAR, 2016).

Com a busca de novos tratamentos mais eficazes e seguros, se deu o interesse em estudar o Simonkolleite, por não ter sido estudado anteriormente como tratamento oncológico, sendo um grande desafio na pesquisa termoterapêutica pré-clínica de nanocristais. O desenvolvimento de NPs para uso terapêutico de doenças oncológicas mostrou grande progresso nas últimas duas décadas (REVIA; ZHANG, 2016; BOGDAN; et al., 2017).

Por não ter sido analisado os seus efeitos em células tumorais e somente em efeitos físicos e químicos, e compara-lo com outras NP como ZnO, já estudado em outros artigos, mas não comparado a outros NPs, se deu essa importância a ao Simonkolleite para os estudos de novas formas de tratamento oncológico (FENG; et.al., 2016).

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos citotóxicos dos NCs de Simonkolleite, ZnO, bem como seus nanocompósitos em células tumorais mamárias *in vitro*.

2.1 Objetivo específico

1. Avaliar os efeitos citotóxicos de NCs de Simonkolleite e de ZnO bem como seus nanocompósitos nas linhagens células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 e MCF-10A.
2. Avaliar produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no tratamento com NCs Simonkolleite ou ZnO e nanocompósitos em células *in vitro* .

3. METODOLOGIA

3.1 Cultura de células

Nesse estudo, foram utilizadas duas linhagens de células epiteliais tumorais de mama humana, a MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) que é uma linhagem tumoral invasiva e MCF-7 (ATCC® HTB-22™) que é uma linhagem tumoral pouco invasiva e uma linhagem não tumoral de célula epitelial mamária MCF-10A.

MDA-MB-231 com origem de *Homo sapiens*, de glândula mamária, derivado do local metastático de derrame pleural, do tipo epitelial, cresce em meio semi-sólido, aderente e em camundongos nude e BALB /C (Sigma-Aldrich). No seu cultivo foi usado meio DMEM, suplementados com 5% de soro fetal bovino (SFB) sem exossomos, 100 unidades/mL penicilina, 78 unidades/mL estreptomicina e 1.2 mg/mL bicarbonato de sódio.

MCF-7 de origem de *Homo sapiens*, glândula mamária, derivado do local metastático: derrame pleural do adenocarcinoma de humanos, célula aderente (Sigma-Aldrich). Esta linhagem células foi suplementada com meio RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino (SFB) sem exossomos, 100 unidades/mL penicilina, 78 unidades/mL estreptomicina e 1.2 mg/mL bicarbonato de sódio.

MFC-10A são células epiteliais de mama imortalizadas não-tumorigênicas, em condições de cultura de tecido que imitam o ambiente tumoral. Vem de origem *Homo sapiens*, célula do tipo epitelial de tecido de glândula mamária, de doença fibroquística, cresce em meio semi-sólido sendo aderente (Sigma-Aldrich). Sua cultura foi feita com meio DMEM F12 com 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 unidades/mL penicilina, 78 unidades/mL estreptomicina, 1.2 mg/mL bicarbonato de sódio, hidrocortisona (0,5 µg/ml), insulina (10 µg/ml) e fator de crescimento - EGF (20 ng/ml).

3.2. Determinação da densidade celular

A contagem de células foi observada utilizando a técnica de exclusão de azul

trypan, na qual as células não viáveis adquirem uma coloração azulada. O experimento foi realizado antes do plaqueamento para considerar somente a densidade de células viáveis. Para tal, recolheu-se uma amostra de célula em suspensão e diluiu em azul trypan a um tubo de eppendorf com diluição de 1:1, tendo assim um fator de diluição (FD) de 2x. A mistura depois de homogeneizada foi colocada na câmara de Neubauer observada ao microscópio óptico. A determinação da densidade celular pelo método de exclusão de azul trypan foi feita através da expressão definida pela seguinte equação:

$$\text{Densidade celular} = \frac{4 \text{ campos de células contadas} \times FD}{4} \times 10^4$$

3.3 Síntese e caracterização dos nanocristais e nanocompósitos

Os nanocristais ou nanocompósitos foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), Instituto da Física, Universidade Federal de Uberlândia, 38408-100 Uberlândia, MG, Brasil; em uma concentração de 1,2 mg/ml. Foram sintetizados três tratamentos: 1) Nanocristais Simonkolleite apresentam tamanhos de 24nm, usadas para tratamento de células tumorais em mama, 2) Nanopartícula NCT, apresenta a maior parte de nanocristais de 20% Simonkolleite e pequena parte de nanocristais de óxido de zinco; também para estudos do efeito nas células tumorais e 3) Nanopartícula ZnO, apresenta apenas nanocristais de óxido de zinco de tamanho maior de 55nm.

Foram realizada as concentrações finais desses NCs e nanocompósitos: 120µg/ml, 60µg/ml, 30µg/ml e 15µg/ml com o meio RPMI ou DMEM com 2,8% de soro bovino fetal para os experimentos.

3.4 Ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular

Ensaios de citotoxicidade ou viabilidade celular têm o objetivo de testar a atividade citotóxica de vários tipos de compostos, soluções e materiais em diferentes tipos celulares. O teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular, por meio

da metabolização desse composto pelas mitocôndrias, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, refletindo no estado funcional da cadeia respiratória.

Para o preparo da solução, 5 mg da solução em pó MTT (SIGMA) será diluída em 1 mL de PBS.

No primeiro dia, as células foram semeadas em placas de 96 poços utilizando uma densidade 1×10^4 /poço e incubadas por 24 horas em 200 μ L de meio de cultura mais 2,8% de soro bovino fetal.

Depois de incubadas, foi feito o controle (sem adição de nanocristais) e foi aplicado o tratamento como descrito no tópico 3.3 com 20 μ L de tratamento em 180 μ L de meio de cultura mais 2,8% de soro bovino fetal, deixando em uma placa por 48 horas e em outra por 72 horas, mantidas em umidade relativa a 37 ° C com 5% de CO₂. Cada concentração das nanocristais foram em triplicado.

Após 48 e 72 duas horas, removeu-se o controle e o tratamento com o meio com as nanocristais e adicionou 90 μ L de meio com 10% de soro bovino fetal, e 10 μ L de MTT (5 mg/ml), foi colocado na estufa com papel alumínio revestindo a placa por 4 horas a 37 °C. Posteriormente, foi retirado esse meio com MTT e adicionado 100 μ L de SDS com CDMF.

Foi analisado no aparelho GloMax, em leitor de placa de ELISA, com comprimento de onda de 560nm.

A concentração de inibição de crescimento de 50% (IC₅₀) foi calculado a partir de uma curva de dose-resposta representada graficamente pelo programa GraphPad Prisma.

3.5 Produção de espécies reativas de oxigênio

A produção intracelular de ROS foi medida utilizando a sonda diacetato de 2',7'diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA) com o método sugerido pelo fabricante (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). As células foram plaqueados em placa de 12 poços com 1×10^5 células/poço em 800 μ L com RPMI suplementado com 2,8% SFB e foram estimuladas com o tratamento como descrito em 3.3, foi feito o branco, os controles positivos sem tratamento com células vivas, todos em triplicata.

Após 48 e 72 horas armazenou o sobrenadante em um ependorf os poços foram tripsinizadas e as células desaderidas foram aliquotadas no mesmo ependorf com o sobrenadante, para análise de células em ROS. Em seguida, foram adicionados 90 μ l de PBS contendo 10 μ M DCFH2-DA no ependorf por 60 min. a 37°C, no escuro. Depois do tempo de incubação da sonda, a leitura da intensidade de fluorescência foi analisada no Citometro Cytoflex. As células foram excitadas no laser 488 nm e a fluorescência emitida em 525 nm no canal FITC.

3.6 Análise estatística

O processamento e a análise de dados foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Para correlacionar as concentrações aos controles e as características tumorais foram utilizados o Teste Anova one-way. E realizou o teste t para analisar as variáveis em cada grupo.

3.7. Financiamento

Este estudo recebeu suporte financeiro da FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS (FAPEMIG). Além disso, o estudo será realizado no Laboratório de Imunologia e Parasitologia.

4. RESULTADOS

Observou-se que a viabilidade celular no tratamento com Simonkolleite e suas concentrações, foram estatisticamente significativas e com porcentagens de viabilidade menores que ao compararmos ao controle, conseqüentemente as concentrações tem uma citotoxicidade maior, observa-se maior está diferença entre controle e a maior concentração 120 µg/ml (Fig. 1 e 2)

Além disso, ao compararmos as concentrações entre si, a concentração 15µg/ml também foi estatisticamente significativa ao compararmos ao controle, e obteve maior porcentagem de viabilidade celular ao compararmos com as concentrações 60 e 120 µg/ml, concluindo que a citotoxicidade é proporcional ao aumento da concentração de Simonkolleite (Fig. 1, 2 e 3).

Com o intuito de determinar a citotoxicidade, realizou-se experimentos com 72 horas com diluições seriadas do Simonkolleite e nanocompostos 120µg/ml, 60µg/ml 30µg/ml e 15µg/ml, sendo que a concentração de 120µg/ml foi a que mais reduziu a viabilidade celular com tratamento do Simonkolleite, comparada ao controle. No caso da de 15µg/ml obteve-se uma maior diferença estatística de viabilidade celular entre os tratamentos. Na análise ANOVA one-way sobre a citotoxicidade das nanopátulas revelou um efeito principal significativo da exposição ao Simonkolleite ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo controle. A administração de diferentes doses de Simonkolleite (120µg/ml, 60µg/ml, 30µg/ml e 15µg/ml) apresentou efeito significativo quando comparado com o grupo controle. A administração de 1000 não houve diferença significativa ($p > 0,05$), porém o 250 nos tratamentos de 120µg/ml, 60µg/ml e 30µg/ml, houveram diferença significativa ($p = 0,0005$). Demonstrando no gráfico essa diferença de valores entre as

concentrações(Fig.1).

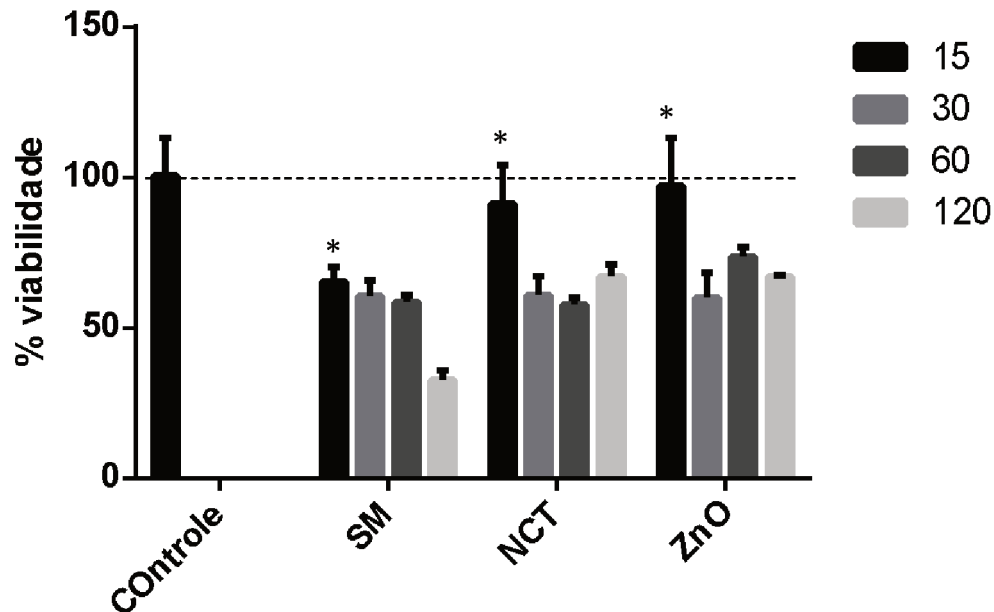


Figura 1: Padronização do ensaio de citotoxicidade (MTT) em linhagem celular de MCF-7 durante 72 horas, tratados com Simonkolleite, ZnO e NCT, com concentrações como descrito em 3.3.

Legenda:*, $p < 0,05$ entre o tratamento SM e ZnO e SM e NCT em $15\mu\text{g/ml}$; SM, Tratamento com a nanopartícula Simonkolleite; NCT, tratamento com Simonkolleite e pequena parte de nanocristais de óxido de zinco; ZnO, tratamento de apenas nanocristais de óxido de zinco de tamanho maior; em concentrações $120\mu\text{g/ml}$, $60\mu\text{g/ml}$, $30\mu\text{g/ml}$, $15\mu\text{g/ml}$, demonstrando a % de viabilidade celular após esse tratamento de 72 horas.

Com o propósito de determinar a citotoxicidade, realizou-se experimentos com diluições seriadas do Simonkolleite e nanocompostos $120\mu\text{g/ml}$, $60\mu\text{g/ml}$, $30\mu\text{g/ml}$ e $15\mu\text{g/ml}$, sendo que a concentração de $120\mu\text{g/ml}$ foi a que mais reduziu a viabilidade celular com tratamento do Simonkolleite, comparada ao controle. No caso da de $30\mu\text{g/ml}$ obteve-se uma maior diferença estatística de viabilidade celular entre os tratamentos. Na análise ANOVA one-way sobre a citotoxicidade das nanopátículas revelou um efeito principal significativo da exposição ao Simonkolleite ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle. A administração de diferentes doses de Simonkolleite ($120\mu\text{g/ml}$, $60\mu\text{g/ml}$, $30\mu\text{g/ml}$ e $15\mu\text{g/ml}$) apresentou

efeito significativo quando comparado com o grupo controle. A administração de 1000 e 250, não houveram diferença significativa com $p < 0,05$, das concentrações comparadas ao controle. Em 48 horas de tratamento não revelou diferença significativa (Fig.2)

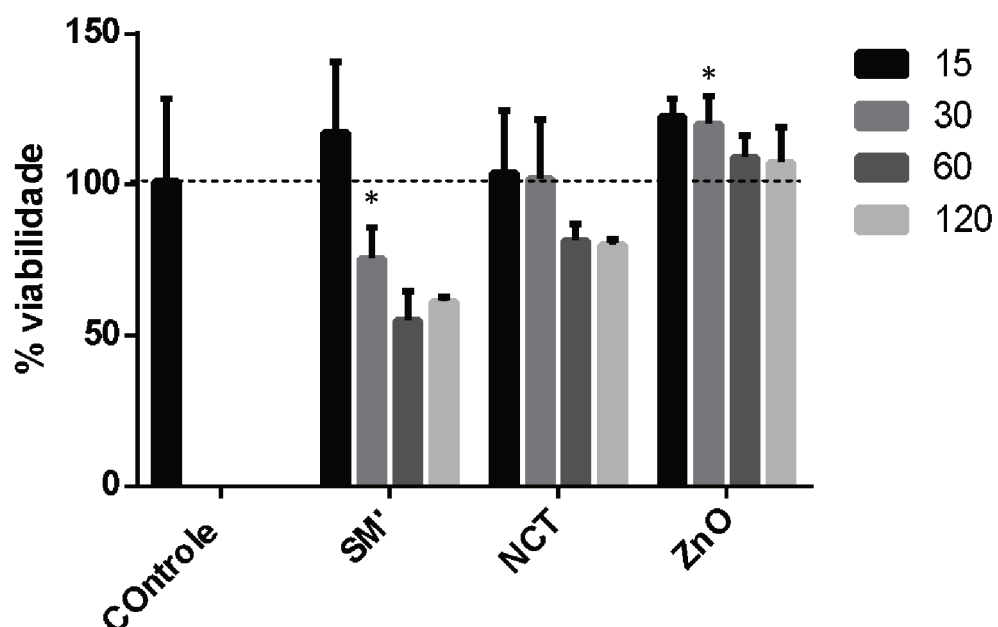


Figura 2: Padronização do ensaio de citotoxicidade (MTT) em linhagem celular de MDA-MB 231 durante 72 horas, tratados com Simonkolleite, ZnO e NCT, com concentrações como descrito em 3.3.

Legenda: *, $p < 0,005$ entre o tratamento SM e ZnO e em 30 µg/ml ; SM, Tratamento com a nanopartícula Simonkolleite; NCT, tratamento com Simonkolleite e pequena parte de nanocristais de óxido de zinco; ZnO, tratamento de apenas nanocristais de óxido de zinco de tamanho maior; em concentrações 120 µg/ml, 60 µg/ml, 30 µg/ml, 15 µg/ml, demonstrando a % de viabilidade celular após esse tratamento de 72 horas.

Com a intenção de determinar a citotoxicidade, realizou-se experimentos com diluições seriadas do Simonkolleite e nanocompostos 120µg/ml, 60µg/ml 30µg/ml e 15µg/ml, sendo que a concentração de 120µg/ml foi a que mais reduziu a viabilidade celular com tratamento do Simonkolleite, comparada ao controle. No caso da de 15µg/ml obteve-se uma maior diferença estatística de viabilidade celular entre os tratamentos. Na análise ANOVA one-way sobre a citotoxicidade das nanopátículas revelou um efeito principal significativo da exposição ao Simonkolleite ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo controle. A administração de diferentes doses de Simonkolleite (120µg/ml, 60µg/ml, 30µg/ml e 15µg/ml) apresentou efeito significativo quando comparado com o grupo controle. A administração de 1000 não houve diferença significativa ($p > 0,05$), porém o 250 nos tratamentos de 120µg/ml, 60µg/ml e 30µg/ml, houve diferença significativa ($p = 0,0005$). Demonstrando no gráfico essa diferença de valores entre as concentrações.

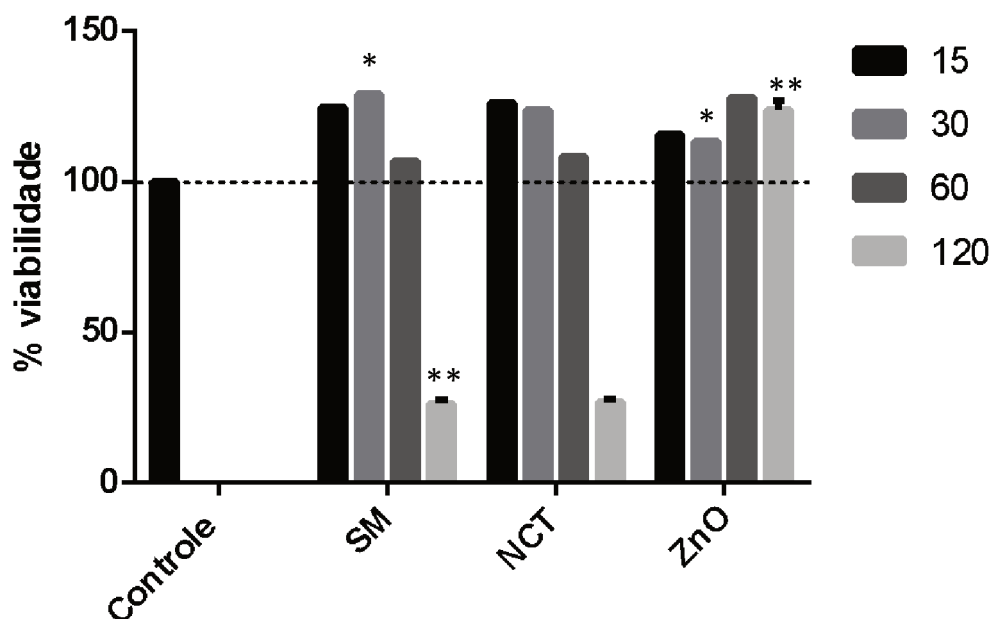


Figura 3: Padronização do ensaio de citotoxicidade (MTT) em linhagem celular de MCF-10A durante 72 horas, tratados com Simonkolleite, ZnO e NCT, com concentrações como descrito em 3.3.

Legenda: **, $p < 0,0001$; *, $p < 0,05$; SM, Tratamento com a nanopartícula Simonkolleite; NCT, tratamento com Simonkolleite e pequena parte de nanocristais de óxido de zinco; ZnO,

tratamento de apenas nanocristais de óxido de zinco de tamanho maior; em concentrações 120µg/ml, 60µg/ml, 30µg/ml, 15µg/ml, demonstrando a % de viabilidade celular após esse tratamento de 72 horas.

Na figura a seguir mostra o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem celular MCF-7 tratados com os nanocristais por 48 horas, com concentrações como descrito em 3.3. A análise ANOVA unidirecional sobre os níveis de espécies reativas ao oxigênio revelou um efeito significativo da exposição aos NP Simonkolleite, ZnO e NCT ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo controle, tendo mais produção de ROS significativamente nas concentrações 15µg/ml para NCs de Simonkolleite, 120µg/ml para a NCT e 120µg/ml e 30µg/ml para NCs de ZnO (Fig. 4).

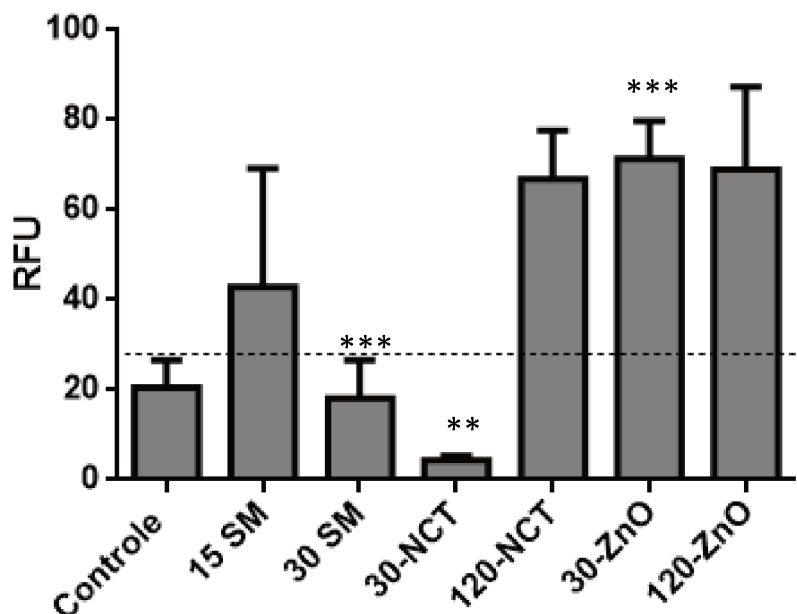


Figura.4 Nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem celular MCF-7 tratados com a nanopartícula Simonkolleite por 48 horas.

Legenda:**, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$; SM, Tratamento com a nanopartícula Simonkolleite; NCT, tratamento com Simonkolleite e pequena parte de nanocristais de óxido de zinco; ZnO, tratamento de apenas nanocristais de óxido de zinco de tamanho maior ; em concentrações 120µg/ml, 30µg/ml, 15µg/ml, demonstrando a unidades relativas de fluorescência relativa da espécie reativa de oxigênio

Já na figura 5 mostra também a produção de ROS, porém em linhagens de MDA-MB 231. A análise ANOVA unidirecional sobre os níveis de espécies reativas ao oxigênio revelou um efeito significativo a exposição aos NP's Simonkolleite, ZnO e NCT ($p = 0,0004$) em comparação com o grupo controle, sendo a produção maior de ROS significativamente estatística nas concentrações 120 μ g/ml para Simonkolleite, 120 μ g/ml e 30 μ g/ml para a NCT e 30 μ g/ml para NCs ZnO.

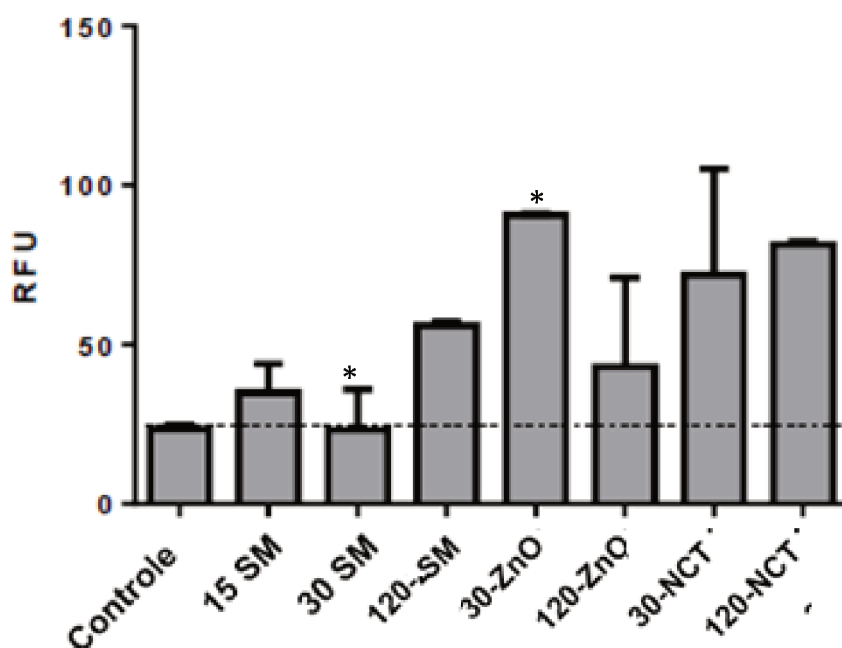


Figura 5. Nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem celular MDA-MB 231 tratados com a nanopartícula Simonkolleite por 48 horas.

Legenda:*, $p < 0,05$; SM, Tratamento com a nanopartícula Simonkolleite; NCT, tratamento com Simonkolleite e pequena parte de nanocristais de óxido de zinco; ZnO, tratamento de apenas nanocristais de óxido de zinco de tamanho maior ; em concentrações 120 μ g/ml, 30 μ g/ml, 15 μ g/ml, demonstrando a unidades relativas de fluorescência relativa da espécie reativa de oxigênio.

A análise ANOVA one-way sobre os níveis de espécies reativas ao oxigênio revelou um efeito de alta produção de ROS significativamente na exposição aos NCs de Simonkolleite,

NCT e ZnO ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo controle, sendo significativamente maior a produção de ROS nas concentrações 15µg/ml e 30µg/ml para Simonkolleite, 30µg/ml para a NP 250 e 120µg/ml e 30µg/ml para NP 1000.

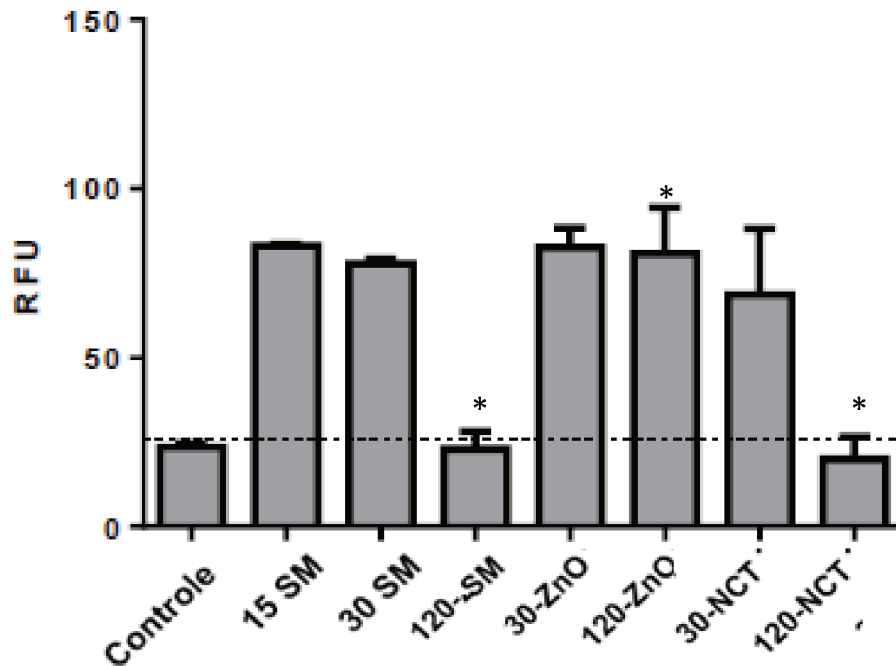


Fig.6 Mostra o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem celular MDA-MB-231 tratados com a nanocristais de Simonkolleite, NCT e ZnO por 72 horas

Legenda: SM, Tratamento com a nanopartícula Simonkolleite; NCT, tratamento com Simonkolleite e pequena parte de nanocristais de óxido de zinco; ZnO, tratamento de apenas nanocristais de óxido de zinco de tamanho maior ; em concentrações 120µg/ml, 30µg/ml, 15µg/ml, demonstrando a unidades relativas de fluorescência relativa (RFU) da espécie reativa de oxigênio.

5. DISCUSSÃO

Experimentos de artigos relataram que os NCs de ZnO exerceram efeito citotóxico em várias linhas celulares de glioma humano (A172, U87, LN2308, LN18 e LN229), o que também foi visto nesse estudo, mas com células MCF-7 e MDA-MB 231, sendo a MCF-7 mais sensível aos tratamentos, porém nota-se que as células foram mais sensíveis as NCs Simonkolleite, que nos outros tratamentos, o somente com ZnO e NCT (OSTROVSKY et al., 2009).

Moratin et al., 2017 também fizeram estudos com ZnO, seus resultados mostraram uma redução significativa na viabilidade celular, bem como o aumento dependente da dose e do tempo de células apoptóticas após o tratamento com nanocristais.

Em Estudos de Akhtar et.al mostraram a interferência do ZnO na viabilidade celular através da morte células cancerosas, mas isso não ocorre em células normais. No nosso estudo ocorreu a morte de células não tumorais MCF-10A, porém somente em altas concentrações e com a NCs Simonkolleite pela alta citotoxicidade comparado ao ZnO (Fig.3). No entanto, em ensaio de MTT os resultados com Ncs de Simonkolleite, os quais foram transformados em ZnO não obtiveram tanto resultado significativo a citotoxicidade que ao compararmos com o NCs de Simonkolleite, demonstrado assim, que o Simonkolleite tem maior eficácia contra o tumor do que o ZnO, porém mais citotóxico às células saudáveis, sendo necessário reduzir a concentração para ter uma citotoxicidade as células tumorais, mas não as não tumorais, encontrando assim nas análises um valor de 50% de letalidade das células tumorais.

Além da citotoxicidade analisou o índice de letalidade de 50% das células,

notando que as células de linhagem MCF-7 com o tratamento, por ser mais sensível a droga precisa de uma concentração entre 28µg/ml e 50µg/ml de NCs de Simonkolleite para matar 50% das células em 72 horas, porém com os outros tratamentos não se atingiu um valor esperado e sim maior que 200µg/ml.

Na MDA-MB 231 por ser menos sensível ao tratamento e mais invasiva obtivemos um valor de IC50 maior que da MCF-7, de 140 á 171 µg/ml.

Em células não tumorais o IC 50 do NCs de Simonkolleite foi bem maior que das células tumorais 249 e 235µg/ml para 48 horas de tratamento e 270 e 237µg/ml para 72 horas de tratamento, mostrando que o NCs de Simonkolleite não é tão danoso às células não tumorais, podendo assim usar um valor a baixo do IC50 das células não tumorais, que não irá prejudicá-las, mas que cause a morte ou apoptose das células tumorais

A eficácia terapêutica com nanocristais anticancerígenos como NCs de Simonkolleite é limitada devido à sua toxicidade evidente na linhagem MCF-10A (não tumoral). Sendo assim crucial desenvolver uma concentração similar ao IC50 das células tumorais, mas que seja possível matar tanto as células MDA-MB 231 quanto MCF-7, sem ser danoso a linhagem não tumoral.

Wahab et al. relataram que as células MCF-7 que foram tratadas com NP ZnO mostraram uma indução significativa da apoptose. Isto foi demonstrado pelo fato de que aproximadamente 26% das células tratadas apareceram na fase sub-G 1 do ciclo celular, em comparação com 2,8% das células de controle não tratadas. O aumento da concentração de nanocristais melhorou o grau de apoptose.

Os desenvolvimentos atuais na pesquisa do câncer sugerem que uma série de estímulos apoptóticos compartilham caminhos mecânicos comuns caracterizados pela geração de ROS através do estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio mais comumente produzidas são, o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxilo (OH), o que causa danos aos componentes celulares, incluindo DNA e proteína. (AKHTAR et al., 2012).

Em estudos de Akhtar (2012) o NP ZnO induziu níveis de oxidantes ROS, sugerindo que os NP de ZnO induzem a apoptose em células cancerosas, como mostrado no nossos experimentos (Fig. 4,5, e 6).

No presente estudo, as NP de ZnO e NCT alteraram significativamente o estado oxidante / antioxidante das células de câncer MCF-7, porém em altas concentrações, a combinação de NP.

ZnO e NCs de Simonkolleite foi significativamente maior que os controles somente em 120µg/ml, e no tratamento de cristais de ZnO a produção de ROS foi aumentada proporcionalmente a concentração, sendo assim mais quantidade de ROS em 120µg/ml que em 30µg/ml, nos tratamentos com NCs de Simonkolleite, nota-se um aumento significativo de ROS em concentrações menores de NCs de Simonkolleite (15µg/ml). Confirmando assim a produção de ROS, mais eficaz da NCs Simonkolleite, pois 15µg/ml da NP já seria o suficiente para produção de ROS, conseqüentemente, induzindo apoptose de células tumorais (Fig.4).

Por ser menos sensível aos NCs e mais invasiva, foi feito 48 horas e 72 horas de tratamento para MDA-MB 231, para notar se há diferenças em dose-tempo. Observa-se que, os resultados de produção de ROS de 48 horas foram mais significativos as NCs de NCT e somente ZnO sozinho, os quais, a menor de 30µg/ml de concentração de NCs já seria necessário para produzir ROS, porém isso não ocorreu com a NCs de Simonkolleite, o Ncs de Simonkolleite precisou de uma concentração maior de 120µg/ml para induzir ROS (Fig.5). Os resultados de 72 horas de tratamentos foram mais significativos para todos os tratamentos, sendo a produção de ROS mais significativa em 30µg/ml para todos os tratamentos (Fig.6), não havendo grande diferença entre os tratamentos nessa concentração, mas comparando entre os tratamentos, a concentração 120µg/ml foi significativamente diferente entre os tratamentos, reduzindo a produção de ROS de acordo com o aumento da concentração para 120µg/ml, com exceção do tratamento que apresenta somente ZnO.

No nosso estudo ainda não tem a via esclarecida, o qual o ROS atua para induzir apoptose. Por artigos estudarem mais sucintamente qual via atuam as NCs, se planeja futuramente em experimentos, realizar estudos com anticorpo anti-caspase e anti-Bax ou anti-Bcl-2 para se descobrir a via em que a NCs atua.

6. CONCLUSÃO

Nesse presente estudo, notou-se maior citotoxicidade e maior produção de ROS na linhagem MCF-7, sendo considerada mais sensível ao tratamento de Simonkolleite. Porém na linhagem tumoral MDA-MB 231, notou também uma citotoxicidade e aumento de ROS, todavia, em um maior tempo com o tratamento, e a produção de ROS, não foi tão discrepante entre os tratamentos ao comparar o NCs de Simonkolleite as outras variações de tratamento.

Concluimos que o resultado esperado de citotoxicidade e produção maior de ROS foi obtido, porém na linhagem menos sensível aos NCs de Simonkolleite não atingiu as expectativas de aumentar o ROS e ter uma alta citotoxicidade maior que das outras variáveis de tratamento.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AKHTAR, M. J. et al. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 845-57, 2012.

BOROUMAND MOGHADDAM, A. et al. Eco-Friendly Formulated Zinc Oxide Nanoparticles: Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in the MCF-7 Cancer Cell Line. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 10, Oct 20 2017.

BOGDAN, J., et al., "Nanoparticles of Titanium and Zinc Oxides as Novel Agents in Tumor Treatment: a Review." **Nanoscale Res Lett** 12(1): 225, 2017

Breast Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. In: (Ed.). **PDQ Cancer Information Summaries**. Bethesda (MD), 2002.

CHAVEZ, K. J.; GARIMELLA, S. V.; LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. **Breast Dis**, v. 32, n. 1-2, p. 35-48, 20

DE OLIVEIRA, M. M. et al. Estimated number of people diagnosed with cancer in Brazil: data from the National Health Survey, 2013. **Rev Bras Epidemiol**, v. 18 Suppl 2, p. 146-57, Dec 2015.

DE MELO REIS, É., DE REZENDE, A. A. A., SANTOS, D. V., DE OLIVERIA, P. F., NICOLELLA, H. D., TAVARES, D. C., ... & SPANÓ, M. A. "Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic mutation and recombination test." **Food and Chemical Toxicology** 84(Supplement C): 55-63, 2015

ESMAEILBEIG, M.; KOUHPAYEH, S. A.; AMIRGHOFRAH, Z. An Investigation of the Growth Inhibitory Capacity of Several Medicinal Plants From Iran on Tumor Cell Lines. **Iran J Cancer Prev**, v. 8, n. 5, p. e4032, Oct 2015.

LEE, Soo-Keun; KIM, Ayoung; KIM, Sang Wook. Controle de Forma ZnO Usando Método Sintético Sonoquímico e Sua Atividade Fotocatalítica. **Letras de Nanociência e Nanotecnologia** , v. 9, n. 6, p. 969-974, 2017.

JACOBO-HERRERA, N. J. et al. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. **J Ethnopharmacol**, v. 179, p. 391-402, Feb 17 2016.

MORATIN, H. et al. Toxicological characterization of ZnO nanoparticles in malignant and non-malignant cells. **Environ Mol Mutagen**, Nov 18 2017

OSTROVSKY, S., KAZIMIRSKY, G., GEDANKEN, A., & BRODIE, C.
Selective cytotoxic effect of ZnO nanoparticles on glioma cells. **Nano Research**,
2(11), 882-890, 2009

REDDY, K. M. et al. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. **Appl Phys Lett**, v. 90, n. 213902, p. 2139021-2139023, May 24 2007.

REVIA, R. A.; ZHANG, M. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances. **Mater Today (Kidlington)**, v. 19, n. 3, p. 157-168, Apr 2016.

SIRELKHATIM, A., MAHMUD, S., SEENI, A., KAUS, N. H. M., ANN, L. C., BAKHORI, S. K. M., ... & MOHAMAD, D. "Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism." **Nano-Micro Letters** 7(3): 219-242, 2015

WAHAB, R. SIDDIQUI, M. A. SAQUIB, Q. DWIVEDI, S. AHMAD, J. MUSARRAT, J. AL-KHEDHAIRY, A. A. SHIN, H. S. "ZnO nanoparticles induced oxidative stress and apoptosis in HepG2 and MCF-7 cancer cells and their antibacterial activity." **Colloids Surf B Biointerfaces** 117, 2014

Estimativa para o câncer em 2016 Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>Acessado em:20/062017

<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21003-inca-estima-que-havera-596-070-novos-casos-de-cancer-em-2016>>Acessado em:20/062017