



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**CAMILA MIORELLI GIRONDI**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO-ALL-TRANS-  
RETINOICO INCORPORADO A NANOFIBRAS POLIMÉRICAS  
E SEUS EFEITOS SOBRE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA**

2018

**CAMILA MIORELLI GIRONDI**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO-ALL-TRANS-RETINOICO  
INCORPORADO A NANOFIBRAS POLIMÉRICAS E SEUS EFEITOS  
SOBRE CÉLULAS DE OSTEOSSARCOMA HUMANAS**

Dissertação Apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Adj. Estela Kaminagakura Tango

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Girondi, Camila Miorelli

Síntese e caracterização de ácido-all-trans-retinóico incorporado a nanofibras poliméricas e seus efeitos sobre células de osteossarcoma / Camila Miorelli Girondi. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Estela Kaminagakura Tango.

1. Ácido all-trans-retinoico. 2. Nanofibras. 3. Policaprolactona. 4. Eletrofiação. 5. Osteossarcoma. I. Kaminagakura Tango, Estela, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Adj. Estela Kaminagakura Tango** (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Felipe Eduardo de Oliveira**

Universidade Brás Cubas

Campus de Mogi das Cruzes

São José dos Campos, 02 de Maio de 2018.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 Síntese das Nanofibras (NF)</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2 Técnica de Eletrofiação</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3 Caracterização Morfológica das NF</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4 Caracterização química das NF</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4.1 Estudo do espectro de infravermelho da transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5 Teste de molhabilidade através da técnica de ângulo de contato da   superfície do material</b> .....	<b>18</b>
<b>3.6 Taxa de degradação</b> .....	<b>19</b>
<b>3.7 Cultivo e manutenção celular</b> .....	<b>20</b>
<b>3.8 Ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)</b> .....	<b>21</b>
<b>3.9 Teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)</b> ..	<b>22</b>
<b>3.10 Teste de Micronúcleos (MN)</b> .....	<b>23</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 Síntese das NF</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 Caracterização morfológica</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2.1 Aspecto macroscópico</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2.2 MEV</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2.3 Análise do diâmetro médio das NF</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3 Estudo do espectro de infravermelho da transformada de Fourier (FTIR)</b>	<b>30</b>
<b>4.4 Ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4.1 Interleucina 1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>)</b> .....	<b>32</b>

<b>4.4.2 Interleucina (IL-6).....</b>	<b>33</b>
<b>4.4.3 Fator de necrose tumoral - <math>\alpha</math> (TNF- <math>\alpha</math>).....</b>	<b>34</b>
<b>4.5 Teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)..</b>	<b>35</b>
<b>4.6 Micronúcleos .....</b>	<b>39</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

## AGRADECIMENTOS

Toda a minha gratidão às pessoas, que de forma direta ou indireta são responsáveis por eu ter chegado até aqui.

À Deus, pelo dom da Vida.

Agradeço à Universidade Júlio de Mesquita Filho – Unesp- ICT, por ter me acolhido como casa desde a graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, e todos os docentes que fazem parte deste. Responsáveis por tudo o que eu aprendi. Por terem me transmitido conhecimento para dar mais esse passo no âmbito da Patologia Bucal.

Agradeço a minha Orientadora Profa. Adj. Estela Kaminagakura Tango, por ter tido tanta paciência, por ter sido a pessoa que mais acreditou na minha capacidade, muitas vezes mais do que Eu mesma. Obrigada professora por ter me dado a oportunidade de trabalhar ao seu lado, por ter me incentivado a superar meus limites e me ensinado a sempre “ter certeza”.

Ao Professor Alexandre Luiz Souto Borges, por ter cedido, não só o laboratório GEBAO, mas a disponibilidade de testar, pesquisar e ensinar tudo sobre a técnica de eletrofiação.

À Professora Luciane Dias de Oliveira, coordenadora do programa de Pós-graduação, por ter nos acolhido, junto da ideia desse trabalho, por ser sempre tão solícita, por toda sua dedicação na tarefa de ensinar. Sempre pronta a ouvir e esclarecer todas as dúvidas nesse meu caminhar.

Agradeço a Professora Cristiane Koga Ito, por ter me orientado durante a iniciação científica por toda a graduação, pelo carinho, dedicação e amor em tudo o que faz. Por nunca esquecer o significado da palavra ensinar, obrigada professora por ter me apresentado ao mundo da pesquisa e da ciência. Se eu cheguei até aqui, devo isso a você.

A Professora Ana Lia Anbimder, que dedicou tardes no microscópio a me ensinar patologia. Muito obrigada por me mostrar que vale a pena não ficar só no raso, o que vale é mergulhar de cabeça. Obrigada por ter me incentivado a procurar soluções para todas as dificuldades. Afinal, o que vale é o caminho percorrido.

Ao Professor Felipe Eduardo Oliveira, meu grande amigo Fê, a quem eu tenho a sorte de poder chamar de AMIGO, no mais puro significado da palavra. A quem eu devo não só muito das vivências dentro do LEIC, mas também das prozas da tarde, até das vezes que você ameaçou “bater na minha cara”.

As grandes amizades que eu tive a sorte de encontrar nesse caminho, e que eu tenho a honra de poder levar para a minha vida.

Vivian Narana, obrigada pelas terças feiras de proza em dobro, pelos cafezinhos do desabafo.

Victor Bernardes, obrigada pela compreensão, empatia e companheirismo.

Fernanda Herrera, obrigada por ser essa pessoa que você é, sempre solicita, ajudando até mesmo quando não é possível ajudar, é um grande orgulho te-la em minha vida.

Ligia Tavares, obrigada, poucas as pessoas que tem o prazer de conhecer gente tão boa quanto você.

Obrigada a todos os amigos do Grupo Evidências Científicas, por estarem sempre prontos pra qualquer situação, desde resolver problemas de laboratório até “negar as aparências e disfarçar as evidências”. Obrigada, Elis, Milagros, Noala, Jaqueline, Renatinha e Christian.

Obrigada ao Thiago Versiani, pelo Companheirismo, pela compreensão, empatia, amizade, conselhos, descontração, e, sobretudo, à interpretação dos dados numéricos.

Obrigada a Carmem Lúcia, por ter me mostrado que os sonhos não envelhecem e por ter cedido a oportunidade de voltar a dançar.

Obrigada ao Teatro da rua Eliza. Sim, a arte salva. Ou consola. Ou torna pelo menos suportável.

Ao Rafael Lodi e ao Guilherme Nizzola. Meus melhores amigos.

A Jessica Dias, minha Grande amiga, por ser sempre tão amiga. Por ter dividido cafés e a vida comigo desde a Graduação. E por ter me ajudado em toda a síntese e caracterização das Fibras.



“Quando não souberes pra onde vai, lembra-te de onde veio.” À minha Família, pelo apoio e confiança.

Agradeço aos meus primos, a Primaiada, por saberem o que significa família.

Obrigada Vó Cida, que nunca vai entender por que eu nunca termino de estudar, pelo carinho e orgulho que deposita em mim.

Obrigada Gu, meu irmão, meu ídolo, meu porto.

Obrigada José Raul, meu pai, por todas as oportunidades que tem me apresentado, por me dar a honra de poder trabalhar ao seu lado.

À minha Mãe, Sônia Miorelli, a vida da minha vida.

*“É preciso força pra sonhar, e perceber que a estrada vai além do que se vê.”*

*Los hermanos*

Girondi CM. Síntese e caracterização de ácido-all-trans-retinoico incorporados a nanofibras poliméricas e seus efeitos sobre células de osteossarcoma [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

## RESUMO

As nanofibras (NF) podem ser sintetizadas por meio de eletrofiação, um método simples que permite incorporação de fármacos em biopolímeros que apresentam a vantagem de serem liberados de forma gradual. Policaprolactona (PCL) apresenta a vantagem de poder ser eletrofiada permitindo a incorporação de fármacos. Os ácidos retinoicos são fármacos empregados no tratamento de osteossarcoma, mas, apresentam efeitos colaterais. O ATRA (all-trans-retinoic-acid) é o mais comum entre os retinoides. Os objetivos deste estudo foram: sintetizar e caracterizar NF, incorporar o fármaco a elas e verificar a liberação ao meio de cultura; realizar testes de citotoxicidade e genotoxicidade tais como: crescimento, integridade, viabilidade e micronúcleo de células MG63 tratadas com NF incorporada com ATRA e analisar a secreção das citocinas pró inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  por meio do teste ELISA. As NF sintetizadas por meio da eletrofiação foram caracterizadas morfológicamente e bioquimicamente por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e estudo do espectro de infravermelho da transformada de Fourier (FTIR): Os testes *in vitro* foram realizados utilizando uma linhagem de células imortalizadas de osteossarcoma, MG63. Os ensaios incluídos nesse estudo foram divididos em grupos compostos por: [C (controle puro), ATRA (controle positivo), NF (controle negativo) e NF + ATRA (grupo experimental).] Em todos os grupos foram realizados testes de viabilidade celular (MTT), micronúcleo e ELISA sob os tempos de 3, 7 e 14 dias. A liberação do fármaco através do sistema de NF+ATRA foi comprovada pelo FTIR. Os demais resultados encontrados foram avaliados através do teste ANOVA *one-way*, no qual o método apresentou-se eficiente, mostrando diferença estatística de  $p=0,00$ , sendo significativa para todos os períodos de tempo nos testes de MTT e MN, além de ser verificada a secreção de citocinas próinflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6, comprovando os efeitos citotóxicos e genotóxicos sob células MG63 mostrando a efetividade da técnica. Podendo ser uma alternativa para o tratamento.

Palavras-chave: Ácido all-trans-retinoico. Eletrofiação. Nanofibras. Policaprolactona. Cultura de células. Osteossarcoma.

*Girondi CM. Sintesis and characterization of all-trans-retinoic-acid incorporated to polymers Nanofibers under human osteosarcoma cells [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.*

#### **ABSTRACT**

*Nanofibers (NF) can be synthesized by electro-spinning, a simple method that allows incorporation of drugs into biopolymers that have the advantage of being released gradually. Polycaprolactone (PCL) has the advantage that it can be electrophied allowing the incorporation of drugs. Retinoic acids are drugs used in the treatment of osteosarcoma, but have side effects. ATRA (all-trans-retinoic-acid) is the most common retinoid. The objectives of this study were: to synthesize and characterize NF, to incorporate the drug to them and to verify the release to the culture medium; perform cytotoxicity and genotoxicity tests such as: growth, integrity, viability and micronucleus of N63-treated NF-treated cells with ATRA and to analyze the secretion of pro-inflammatory cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  by the ELISA . The NF synthesized by electrophilation were characterized morphologically and biochemically by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectrum (FTIR) study: In vitro tests were performed using an immortalized osteosarcoma cell line, MG63. The trials included in this study were divided into groups composed of: C (pure control), ATRA (positive control), NF (negative control) and NF + ATRA (experimental group). All groups were tested for cell viability (MTT), micronucleus and ELISA under the times of 3, 7 and 14 days. Release of the drug through the NF + ATRA system was confirmed by FTIR. The other results were evaluated using the one-way ANOVA test, in which the method was efficient, showing a statistical difference of  $p = 0.00$ , being significant for all time periods in the MTT and MN tests, besides the secretion of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6, proving the cytotoxic and genotoxic effects under MG63 cells, showing the effectiveness of the technique. It may be an alternative to treatment.*

*Keywords: All-trans-retinoic acid. Electrospray. Nanofibres. Polycaprolactone. Culture of cells. Osteosarcoma.*

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a nanotecnologia apresenta-se emergente e as técnicas de fabricação de nanomateriais têm sido aprimoradas por grupos de pesquisa em todo o mundo (Haider et al., 2015; Fonseca et al., 2018; Ding et al., 2018). Dentre suas aplicações estão a incorporação de substâncias que as fazem servir de arcabouço para a administração, permitindo a liberação controlada de substâncias, tais como fármacos (Loquercio et al., 2015).

Os sistemas de incorporação oferecem benefícios relevantes, pois protegem o princípio ativo das interpéries ambientais, assim como reações de deterioração, além de promoverem a camuflagem do sabor, cheiro e a liberação controlada da substância (Gosh, 2006). A síntese de sistemas de nanocarregadores com fármacos apresenta limitações fisicoquímicas e fisiológicas porque os sistemas devem ser biocompatíveis e biodegradáveis a metabólitos inerentes ao organismo (Tan et al., 2005).

A eletrofiação desperta interesse pois possibilita fabricar nanoestruturas com propriedades distintas, como grande superfície de contato e porosidade fibrosa. As propriedades mecânicas das fibras aumentam quando o diâmetro interno da fibra for diminuído (Tan et al., 2005). A eletrofiação forma mantas poliméricas formadas a partir da propriedade de arraste na solução, onde sob forças eletrostáticas formam fibras interconectadas, que são captadas sob um anteparo (Santos, 2017).

A eletrofiação é um dos métodos mais simples para a preparação de nanofibras e oferece uma nova perspectiva para os biopolímeros, pois permite reduzir o diâmetro das estruturas para a ordem de grandeza de nanômetros, aumentando assim, a relação entre superfície, volume e massa, além de possibilitar alterações nas propriedades mecânicas do polímero em questão (Hiep, Lee, 2010).

A Policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático, hidrofóbico, cristalino, que degrada lentamente e não libera resíduos ácidos ou tóxicos ao meio (Woodruff, Hutmacher, 2010; Dash, Konkimalla, 2012; Tiwari et al., 2016; Yao et al., 2017). Apresenta propriedades mecânicas adequadas, amplamente utilizadas em bioengenharia, principalmente em engenharia de tecidos onde serve como arcabouço ou dispositivos para estruturação de vasos sanguíneos, pele e tendões pois é biocompatível e biodegradável. (Baker et al., 2016). É um polímero versátil que possibilita diversas formas de síntese, inclusive a formação de nanofibras (NF) (Orive et al., 2003; Sinha et al., 2004). Além disso, fármacos podem ser dissolvidos junto ao polímero dando origem a uma mistura capaz de passar pelo processo de eletrospinning, permitindo sistemas de entrega de drogas (Raijzer et al., 2013; Sultanova et al., 2016) de liberação lenta, aumentando a meia-vida do fármaco e, conseqüentemente reduz a frequência de administração, motivando a adesão do paciente à terapia medicamentosa (Orive et al., 2003; Sinha et al., 2004). Um dos exemplos, é o tratamento para osteossarcoma, embora ácidos retinoicos (derivados da vitamina A) sejam eficazes e bem tolerados, podem desenvolver alguns problemas clínicos resultantes das altas doses que podem ser tóxicas levando a efeitos colaterais como a síndrome da “hipervitaminose A” (Kong et al., 2005) e a síndrome do ácido retinoico caracterizada por febre, aumento de peso, dificuldade respiratória, infiltrado pulmonar intersticial e pleural e pericárdico, hipotensão episódica e insuficiência renal aguda (Tariq et al., 2014), levando o indivíduo à resistência ao uso do medicamento (Dozza et al., 2012).

Os derivados da vitamina A desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário e manutenção de funções de órgãos vitais em adultos (Yang et al., 2012). Estes regulam a diferenciação e metabolismo ósseo, ativando o receptor de ácido retinoico (RAR) que se liga no receptor retinoide X (RXR) como um heterodímero (Yang et al., 2012). O sinal retinoico é identificado por marcadores celulares específicos através de receptores nucleares: o receptor

de ácido retinoico (RAR) e o receptor X retinoico (RXR). Os retinoides que possuem ligantes RXR denominam-se Rexinoides (Altucci et al., 2006; Kong et al., 2005) e são efetivos na redução do crescimento, diferenciação e apoptose tumoral que possuem ligantes de RAR. Os Retinoides se aliam aos fatores de transcrição e complexo ligante-receptor promovendo a regulação de sua expressão, induzindo ou suprimindo a transcrição genica (Brito et al., 2010).

O ATRA (all-trans-retinoic-acid) é mais comum entre os retinoides e tem demonstrado resultados satisfatórios no tratamento de vários tipos de tumores (Germain et al., 2006) pois, inibe a proliferação e induz a apoptose em células de osteossarcoma. Para melhorar o prognóstico de pacientes com esta enfermidade, é necessário explorar novas estratégias de tratamento (Yang et al., 2012) reduzindo os seus efeitos colaterais e, conseqüentemente melhorando a qualidade de vida dos pacientes acometidos.

Estabeleceu-se assim, com dados da literatura, a hipótese de que ATRA associada as NF será capaz de se biodegradar em meio de cultura e promover liberação do fármaco em quantidade suficiente para induzir apoptose *in vitro*.

## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar NF, verificar se ATRA foi impregnado às NF, e se o sistema de entrega (NF+ATRA) é capaz de induzir apoptose em células de osteossarcoma da linhagem MG63.

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram:

- Sintetizar, caracterizar e comparar NF e NF impregnadas com ATRA;
- Avaliar se ATRA foi incorporado em NF e liberado no meio de cultura;
- Realizar testes de citotoxicidade e genotoxicidade tais como: crescimento, integridade, viabilidade e micronúcleo das células MG63 tratadas com NF impregnada com ATRA;
- Analisar a secreção das citocinas pró inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  por meio do teste ELISA.

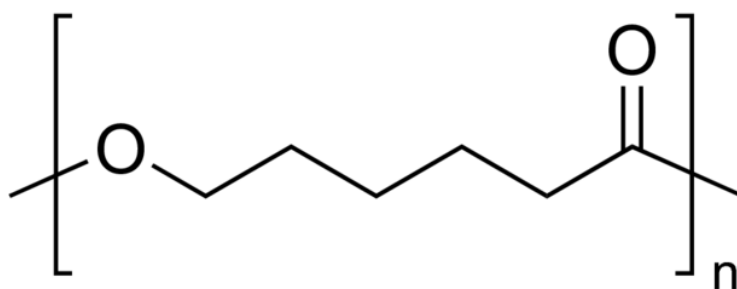


### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Síntese das Nanofibras (NF)

Para a síntese das nanofibras foi utilizado o polímero policaprolactona (PCL) (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA/ lote: MKBX1062V) que se apresenta comercialmente sob forma de flocos ou pedaços de coloração branca ou esbranquiçada, dissolvido em acetona (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA), sob variação de temperatura de 26,2 à 27,7 °C, umidade de 27 à 31% e pressão atmosférica de 1 atm. Para cada 5 mL de acetona foram acrescentados 0,6 g de PCL, para que a solução alcançasse a concentração de 12%. A solução permaneceu sob agitação magnética por 48 horas para que fosse homogeneizada e em seguida eletrofiada.

Figura 1- Fórmula linear da Policaprolactona

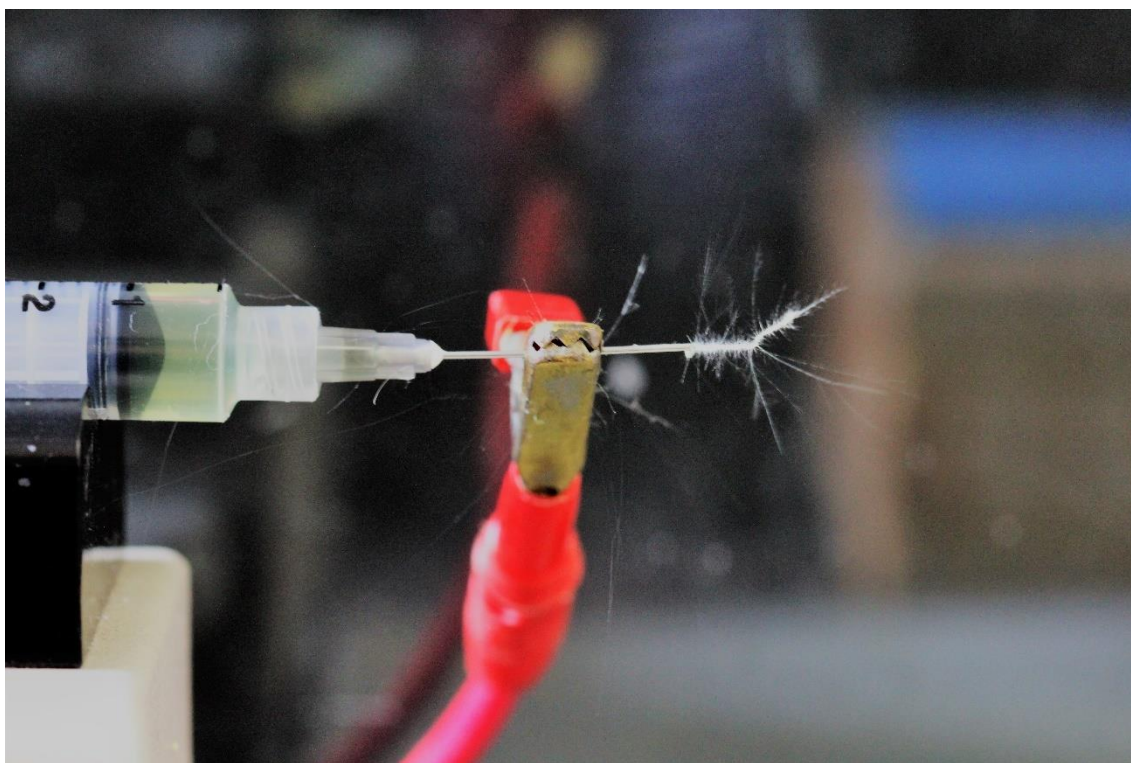


Fonte: Sigma Aldrich.

### 3.2 Técnica de Eletrofição

A solução previamente homogeneizada foi eletrofiada por meio do equipamento constituído por uma fonte de alta tensão (Spellman High voltage electronics co, Hawppauge, NY, EUA), uma seringa plástica (BD, Juiz de Fora, MG, Brasil) com agulha de ponta reta e diâmetro de  $0,7 \text{ mm}^2$  (Injex, São Paulo, SP) e uma bomba de fluxo contínuo (Kd Scientific, Holliston, MA, EUA) (Figura 2). As nanofibras obtidas foram coletadas sob um anteparo com revestimento metálico de folha de alumínio. Previamente, foram testadas algumas variáveis a fim de se otimizar a eletrofição, tais como: tensão, distância da ponta da seringa ao anteparo e fluxo da solução (Tabela 1). E só então selecionaram-se os parâmetros mais eficazes para a síntese.

Figura 2- Fotografia do processo de eletrofição



Fonte: Elaborada pela autora.

Subsequentemente, foi realizada nova diluição de PCL em acetona para a incorporação do ATRA. Foram acrescentados à solução de 0,3 mg de PCL e 2,5 mL de acetona e mais 0,4mg de ATRA para encontrar a proporção de 7800  $\mu$ M. E, para que essa proporção fosse mantida por todas as NF do grupo, foi eletrofiada a quantidade total da solução, tendo sido feita ainda, pesagem da manta eletrofiada para garantir que não houve variação ou perda na proporção. Propiciando assim a síntese do grupo NF + ATRA.

### **3.3 Caracterização Morfológica das NF**

#### **3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Foi retirado um fragmento de tamanho aleatório das NF sintetizadas sob cada variação do processo de eletrofição, em seguida as amostras foram fixadas em suporte metálico e recobertas com uma camada fina de ouro para metalização (SC7620 'Mini' Sputter Coater/Glow Discharge System, Emitech, East Sussex, RU), em seguida, as amostras foram observadas por meio do MEV (Inspect S 50, FEI Company, Brno, República Tcheca) operando sob alto vácuo, 15-25 kV, e spot de 5,0.

A análise realizada permitiu avaliar a morfologia e a medição dos diâmetros das NF. Os diâmetros foram medidos através do *software* de análise de imagens *ImageJ*, e foram utilizadas 100 medições para cada amostra. Dessa forma, foi possível obter média e desvio padrão dos diâmetros de cada amostra, assim optou-se por escolher as fibras que apresentaram menor diâmetro médio e mais homogêneas.

#### **3. 4 Caracterização química das NF**

### 3.4.1 Estudo do espectro de infravermelho da transformada de Fourier (FTIR)

As NF previamente produzidas e avaliadas morfológicamente foram caracterizadas quanto ao FTIR utilizando-se o equipamento Thermo Scientific Modelo Nicolet 6700. As amostras foram depositadas sobre o porta-amostra para proceder a leitura (Figura 3), e pressionadas com o auxílio de célula de carga plana de aço inoxidável (100 g/F), para se obter o máximo contato da amostra com cristal de diamante e o ATRA.

Os espectros de Infravermelho foram registrados, através do uso do *software Spectrum* (versão 10.4.3, PerkinElmer Waltham, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos no modo de absorbância, com faixa de transmissão entre 4000 e 650  $\text{cm}^{-1}$ , 32 varreduras, a uma resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 3- Realização do FTIR



Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.5 Teste de molhabilidade através da técnica de ângulo de contato da superfície do material

O ângulo de contato das superfícies foi analisado por meio de um Goniômetro óptico (TL 1000 – Invoiced freight, Theta Lite, Attension, Lichfield, Staffordshire, RU), em que uma seringa deposita uma gota de água destilada sobre as superfícies das amostras. Durante 15 segundos, 30 imagens/s foram captadas pelo equipamento. Posteriormente, analisadas pelo *software OneAttension* (Biolin Scientific, Lichfield, Staffordshire, RU) que calculou os valores médios para cada amostra a partir das imagens obtidas.

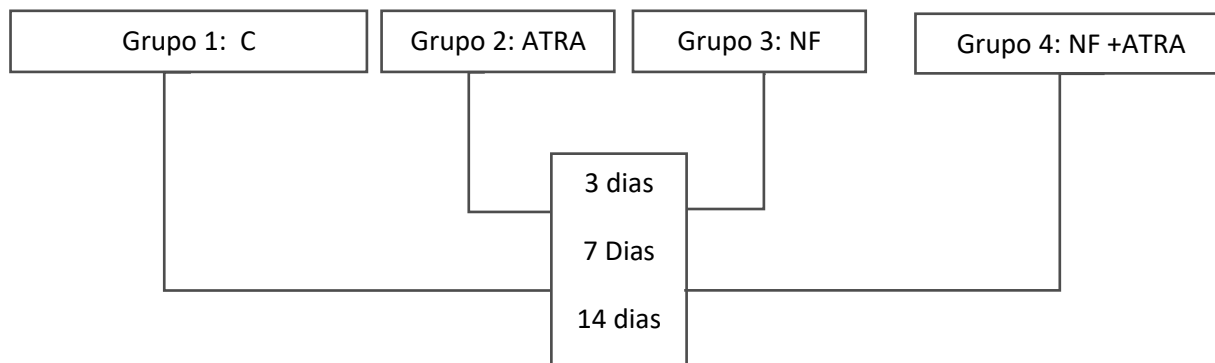
A interpretação dos dados foi dada a partir do ângulo de contato formado entre a superfície do material e a gota de água depositada pelo Goniômetro óptico, foi considerada hidrofílica a superfície que apresentasse ângulo de contato menor que 90°, ou hidrofóbica, para os ângulos de contato que se apresentassem maiores que 90°.

### **3.6 Taxa de degradação**

Fragmentos das NF e de NF+ATRA de 0,5 cm x 0,5 cm foram imersas em meio de cultura celular DMEM estéril, dentro de poços de placas de cultura celular de 24 poços, à 37°C pelo período de 3, 7 e 14 dias. Ao final de cada período, foi realizada espectrometria por FTIR do meio aquoso para determinar a liberação do fármaco durante esses períodos de tempo.

As amostras foram divididas em 4 grupos e avaliadas em três períodos diferentes de tempo conforme descrito no fluxograma.

Figura 4 – Divisão dos grupos e períodos avaliados.



Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.7 Cultivo e manutenção celular

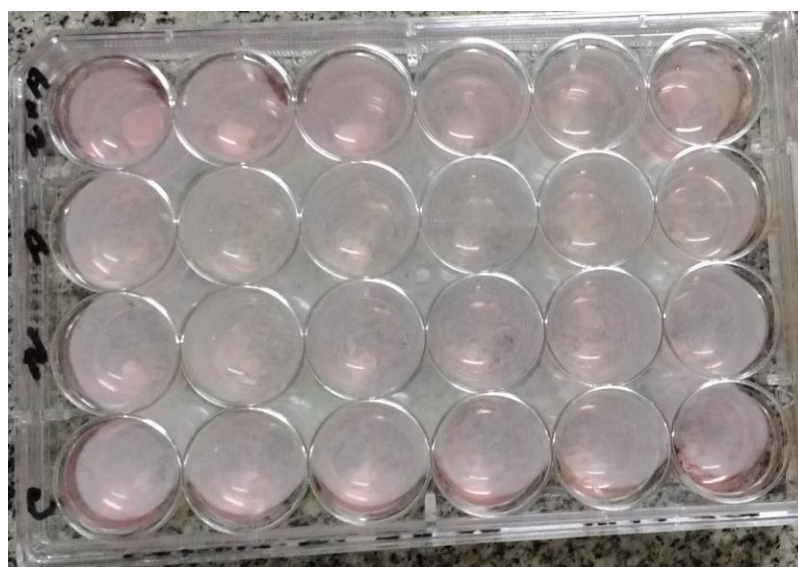
Foram cultivadas células de osteossarcoma humano da linhagem MG63, obtidas do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ). As células foram cultivadas em frascos de cultivo celular utilizando meio de cultura DMEM (Eagle modificado por Dulbeccos - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) suplementado a 10% de soro fetal bovino, acrescido de penicilina e estreptomicina a 1% (Gibco® - Carlsbad, CA, USA) e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até obtenção do número necessário de células para os experimentos *in vitro*.

As células foram plaqueadas em uma placa de 24 poços sob concentração de 1,5 x 10<sup>4</sup> células/poço e o número de células foi calculado com auxílio da câmara de Neubauer. As placas foram deixadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS (Phosphate Buffer Saline) estéril e apirogênico

e, então, submetidas aos testes de produção de citocinas após exposição ao ATRA, sob a liberação por NF, como mostra a figura 5.

Após o período de 24 horas, as células foram novamente incubadas nos diferentes grupos que continham: somente células (C), somente ATRA, NF e NF + ATRA. Os grupos experimentais foram incubadas sob a concentração de 7800  $\mu\text{M}$  de ATRA e analisados nos períodos de 3, 7 e 14 dias.

Figura 5- Cultivo celular na placa de 24 poços



Legenda: placa de 24 poços mostrando os 4 grupos estudados  
Elaborada pela autora

### 3.8 Ensaio de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

O teste imunoenzimático ELISA foi realizado para quantificar as citocinas, interleucina IL- 1 $\beta$ , IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ . Para tanto, placas de microtitulação de 96 poços (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas com anticorpos de captura, específicos para cada citocina (R&D Systems, NE), sendo acrescidos 100  $\mu\text{L}$ /poço na concentração estabelecida pelo fabricante. Os testes foram realizados em duplicata. As placas permaneceram

*overnight* em temperatura ambiente. Transcorrido o período, as placas foram lavadas com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20) por 3 vezes seguidas. Em seguida, 300  $\mu$ L/poço de tampão de bloqueio (PBS acrescido de 0,1% de Soro de Albumina Bovino - BSA) foram adicionados à placa que foi deixada por 1 h em temperatura ambiente. Após a lavagem, a curva padrão de citocinas foi adicionada (100  $\mu$ L/poço) respeitando a concentração estabelecida pelo fabricante ou 100  $\mu$ L de cada amostra (sobrenadantes da cultura celular) referente a cada um dos grupos (C, NF, ATRA, NF+ATRA) para cada período de tempo 3, 7 e 14 dias. As placas foram acondicionadas em temperatura ambiente por um período de 2 horas. Após procedimentos de lavagem, foram acrescentados 100  $\mu$ L em cada poço das placas de anticorpo de detecção marcado com biotina e por mais 2 horas as placas foram reservadas em temperatura ambiente. Novas lavagens foram realizadas e logo após foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de estreptavidina conjugada com peroxidase. Em seguida, por 20 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz, as placas permaneceram por 20 minutos. Após lavagem, foram adicionadas 100  $\mu$ L/poço da solução de substrato cromogênico, composta por partes iguais de reagente A e B (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina). E, por mais 20 minutos as placas foram mantidas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Logo em seguida, acresceu-se 50  $\mu$ L/poço de ácido sulfúrico 2N (solução de parada). A leitura das placas foi feita através do leitor de microplacas (Cambrex Elx808cse - Lonza), sob densidade óptica de 450 nm. Os dados obtidos foram convertidos em concentração (pg/mL), usando o *software GraphPad prism 5.0*.

### **3.9 Teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)**



Foi utilizado o teste de MTT para avaliação da viabilidade celular da linhagem utilizada neste estudo. Após terem sido incubadas até atingirem a concentração de  $15 \times 10^3$  foram submetidas ao teste.

Neste teste, enzimas redutases presentes em células viáveis degradam o MTT e dão origem ao formazan, quantificado por espectrofotômetro. Para tanto, a solução de MTT [brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio] (Sigma Aldrich) foi preparada a 0,5 mg/mL PBS (phosphate buffered saline – LGS Biotecnology, Cotia, Brasil). Foi adicionado 100  $\mu$ L/poço da solução de MTT e a placa de 96 poços foi deixada em estufa a 37°C por 1 hora, ao abrigo de luz. O sobrenadante foi descartado e todos os poços lavados com 200  $\mu$ L de PBS. Em seguida, 100  $\mu$ L/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Aldrich) foram acrescentados e a placa foi incubada por 10 min em estufa à 37°C, seguido de 10 min de agitação em mesa orbital para homogeneização do conteúdo de cada poço. A leitura da absorbância das amostras foi executada em leitor de microplaca (Solab, Piracicaba, Brasil) sob o comprimento de onda de 570 nm. Os resultados obtidos em densidade ótica foram convertidos à porcentagem de viabilidade celular, estabelecendo o grupo C como 100% de viabilidade.

Foi realizado teste de Kolgomorov-smirnof para cada grupo, o que demonstrou normalidade dos dados. Com isso, foi aplicado teste de análise de variância de 1 fator com teste de Dunnett para comparação entre grupos, considerando  $p < 0,05$ .

### **3.10 Teste de Micronúcleos (MN)**

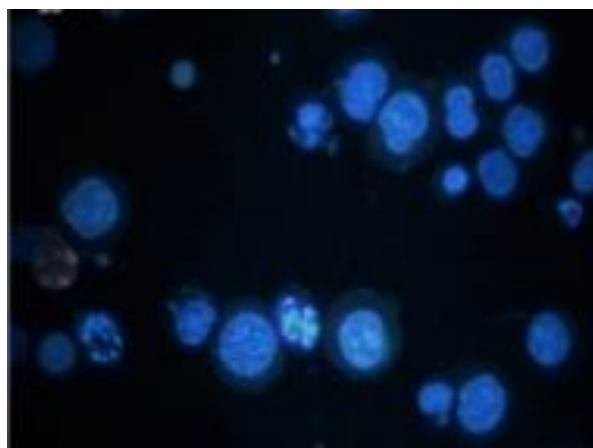
A verificação da frequência de micronúcleos (MN) foi utilizada para avaliar a genotoxicidade do ATRA à uma concentração de 7800  $\mu$ M sobre a cultura celular a partir dos grupos experimentais e grupo controle. Para tanto, 15

$\times 10^3$  células/mL de DMEM foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante descartado e o meio de cultura DMEM foram substituídos por meio novo, mantendo somente células (C), contendo ATRA, ou contendo NF, ou por NF + ATRA. Sendo  $n=3$ /grupo experimental. Após incubação de 24 horas, o sobrenadante foi descartado e foram feitas lavagens com PBS para descarte de células não viáveis. Posteriormente, as células foram fixadas por 10 minutos com formaldeído 10%. Após nova lavagem, foram adicionados 200  $\mu$ L de PBS e uma gota de *fluoroshield* with DAPI, como mostra a figura 6.

A placa foi mantida sob agitação em mesa orbital (Solab) por 5 minutos sob proteção da luz. Em seguida, com auxílio de microscópio de fluorescência (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Alemanha) foi verificada a frequência de MN em 1000 células contadas, corados em azul.

As médias obtidas foram calculadas com o auxílio do *software MATLAB*, versão R2017a, em que foi aplicado o teste *one-way ANOVA* que considera  $p<0,05$ .

Figura 6 – Fotomicrografia exibindo o teste de micronúcleos, Fluorocromo DAPI



Fonte: elaborada pela autora

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Síntese das NF

Para selecionar os parâmetros empregados na síntese de NF sem ATRA, realizaram-se variações conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1- Variação de parâmetros para a eletrofição das NF de PCL demonstrado em negrito o parâmetro de escolha

	<b>Kv</b>	<b>cm</b>	<b>°C</b>	<b>UR (%)</b>	<b>min</b>
<b>Amostra 1</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>26,7</b>	<b>28</b>	<b>15</b>
Amostra 2	12	15	26,3	28	15
Amostra 3	12	12	26,2	28	15
Amostra 4	12	10	26,3	28	15
Amostra 5	12	8	26,7	27	15

Legenda: **Kv** representa Kilovoltagem, **cm** a distância em centímetros, **°C** a temperatura em graus Celsius, **UR (%)** a porcentagem da umidade relativa do ar e **min** o tempo em minutos. Em Negrito o parâmetro selecionado, NF mais finas e mais homogêneas.

Fonte: Elaborada pela autora.

As amostras de NF sintetizadas com ATRA foram variadas conforme a tabela 2.

Tabela 2- Variação de parâmetros para a eletrofição das NF de PCL com ATRA, tendo sido selecionada a amostra 2, em negrito

	<b>Kv</b>	<b>cm</b>	<b>°C</b>	<b>UR (%)</b>	<b>min</b>
Amostra 1	12	18	27	30	15
<b>Amostra 2</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>27,5</b>	<b>31</b>	<b>15</b>
Amostra 3	12	12	27,3	30	15
Amostra 4	12	10	27,3	30	15
Amostra 5	12	8	26,7	30	15

Legenda: **Kv** representa Kilovoltagem, **cm** a distância em centímetros, **°C** a temperatura em graus Celsius, **UR (%)** a porcentagem da umidade relativa do ar e **min** o tempo em minutos. Em Negrito o parâmetro selecionado, NF +ATRA mais finas e mais homogêneas.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 4.2 Caracterização morfológica

### 4.2.1 Aspecto macroscópico

As amostras coletadas sob o papel metálico por meio do processo de eletrofição apresentaram aparência contínua e densa, o volume das NF formadas nos diferentes parâmetros foi distinto, assim como as NF com ATRA se apresentaram menos volumosas. Ainda assim, as amostras se apresentaram similares a um tecido fino. Além disso, as mesmas possuíam flexibilidade e capacidade de manipulação, portanto, foram facilmente cortadas (Figura 7).

Figura 7- Aspecto macroscópico das NF



Fonte: Elaborada pela autora.

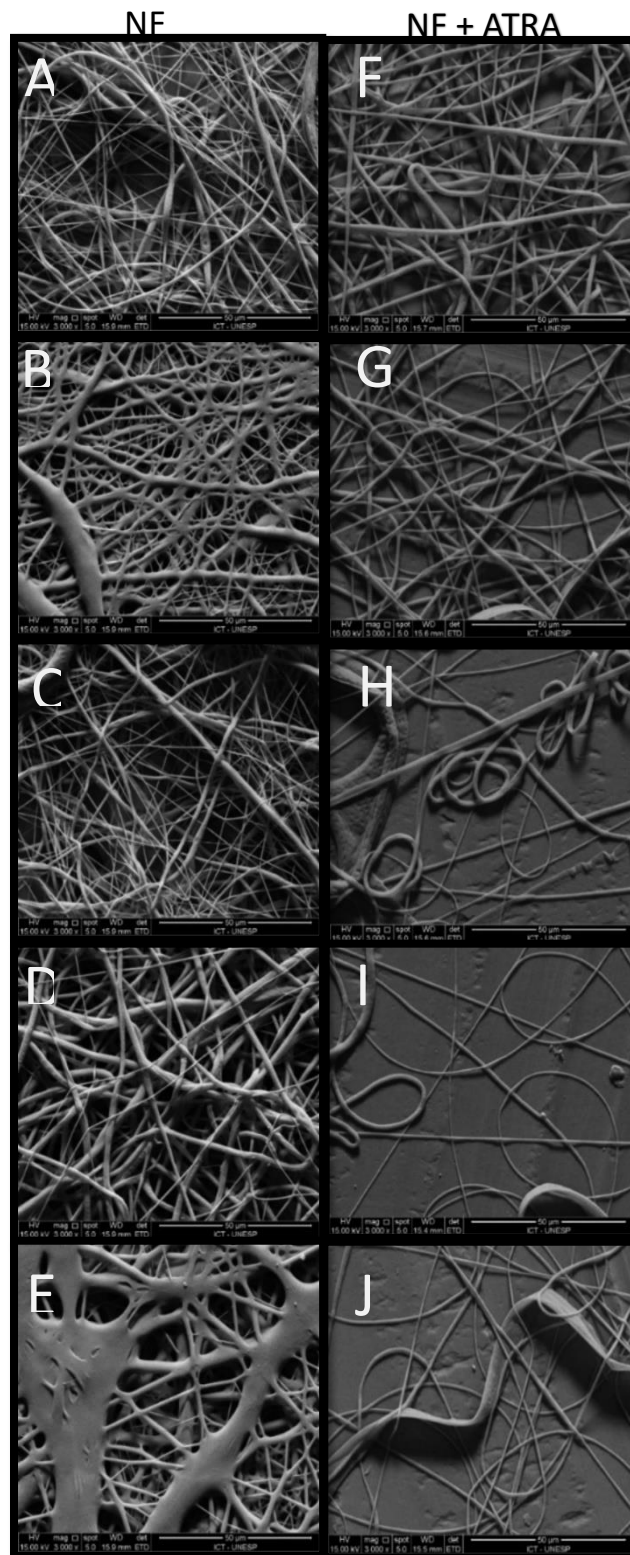
#### 4.2.2 MEV

A caracterização morfológica das amostras foi realizada por MEV, possibilitando a observação de aspectos como: a formação de NF, a variação de diâmetros de fios, porosidade, e possíveis defeitos na estrutura.

A morfologia de cada amostra mostrou diferenças no diâmetro das NF e verificou-se um emaranhado de fios dispostos aleatoriamente uns sobre os outros.

As amostras de NF + ATRA mostraram diferenças no diâmetro e volume de produção das fibras quando comparadas entre si e quando comparadas as NF, verificou-se ainda, um emaranhado de fios dispostos aleatoriamente uns sobre os outros, ora apresentando fibras mais espessas ora menos (Figura 8).

Figura 8 - Fotomicrografia em MEV das NF sem e com ATRA



Legenda: MEV de NF e NF + ATRA **A)** NF 1. **B)** NF 2. **C)** NF 3. **D)** NF 4. **E)** NF 5. **F)** NF+ATRA 1. **G)** NF+ATRA 2. **H)** NF+ATRA 3. **I)** NF+ATRA 4. **J)** NF+ATRA 5. Fotomicrografias capturadas com aumento de 3000X, impregnadas por ouro.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.2.3 Análise do diâmetro médio das NF

Os diâmetros medidos por meio do *software* de análise de imagens *ImageJ*, em que se aferiu 100 medições por amostra, foram computados para que se estimasse a média e desvio padrão dos diâmetros. Foram escolhidas as amostras que se apresentaram mais homogêneas e com menor diâmetro (Sato et al., 2015). Primeiramente, foram conseguidas as medidas referentes às NF e seus valores variaram conforme a tabela 3.

Tabela 3- Média e desvio padrão dos diâmetros das NF

	MÉDIA ( $\mu\text{m}$ )	DP
<b>NF 1</b>	<b>0.7395*</b>	<b>0.007778</b>
NF 2	0.994	0.174655
NF 3	0.91397	0.474126
NF 4	6.3945	7.100059
NF 5	1.43755	0.573231

\*NF selecionada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, foram mensurados os diâmetros das NF com ATRA, e então calculadas as médias e desvio padrão das medidas desse grupo, como demonstra a tabela 4.

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos diâmetros das NF com ATRA.

	MÉDIA ( $\mu\text{m}$ )	DP
NF/ATRA 1	1,00000	0,517724
<b>NF/ATRA 2</b>	<b>0,28622*</b>	<b>0,111454</b>
NF/ATRA 3	0,37204	0,291615
NF/ATRA 4	0,28852	0,131338
NF/ATRA 5	0,27904	0,114743

\*NF com ATRA selecionada.

Fonte: Elaborada pela autora.

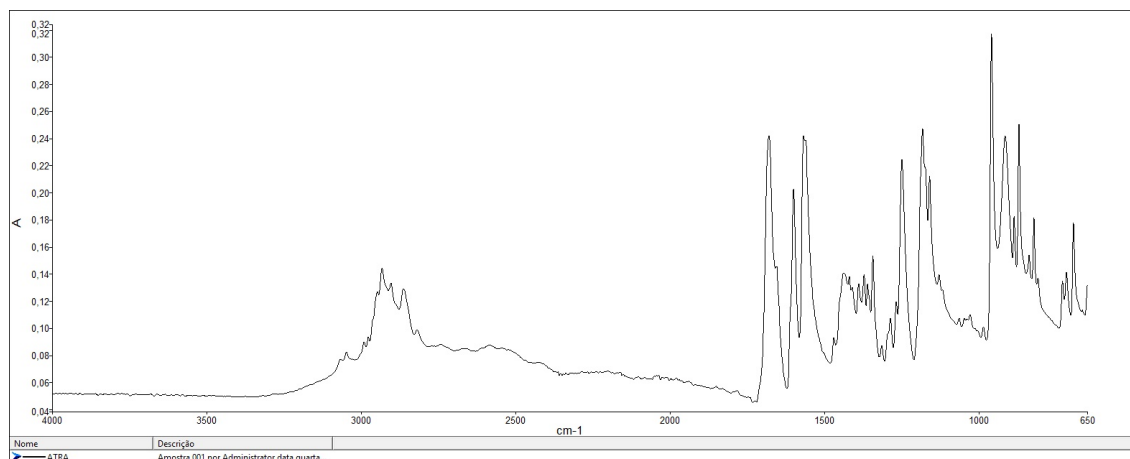
### 4.3 Estudo do espectro de infravermelho da transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos picos de absorvância referentes ao estudo foi realizada sob o espectro FTIR respeitando a faixa entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ .

Inicialmente, realizou-se FTIR de ATRA puro, em pó, fazendo o uso de uma lamínula de microscópio para que houvesse o bloqueio do oxigênio do ar, impedindo qualquer tipo de interferência (Figura 9).



Figura 9 - Análise de FTIR realizada para caracterizar os picos referentes ao ATRA

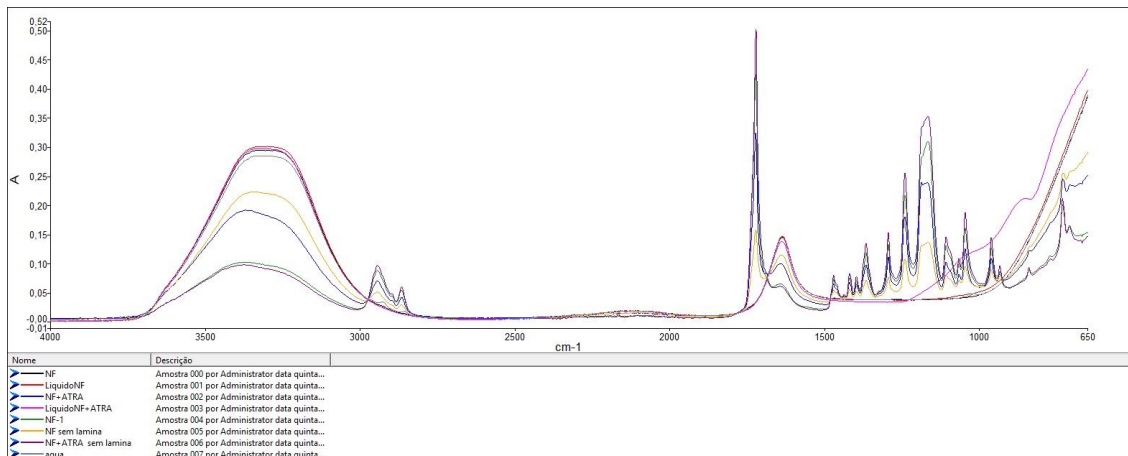


Legenda: Análise de FTIR caracterizando os picos referentes ao ATRA.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tendo padronizados os picos de absorvância comuns no ATRA, realizou-se então novas leituras de picos de absorvância em diferentes períodos de tempo, para que se pudesse observar a liberação de ATRA no meio de cultura DMEM, através da degradação do polímero no grupo experimental composto por NF+ATRA. Na figura 10, se pode comparar todos os picos avaliados e sobrepostos mostrando que houve liberação de ATRA no meio de cultura quando comparados, isso porque existe aumento nos picos da região entre 3100 e 2800  $\text{cm}^{-1}$  e também entre 1700  $\text{cm}^{-1}$ , além de vários picos intercalados entre 1500 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 10- Picos de absorvância formados pela avaliação dos grupos experimentais observados por meio da análise por FTIR



Legenda: Picos de absorvância formados pelos grupos experimentais e interpretados por FTIR.

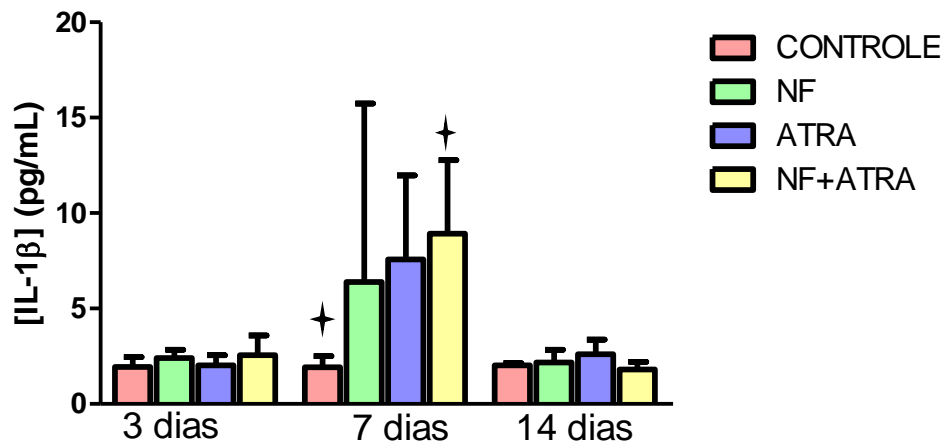
Fonte: Elaborada pela autora.

## 4.4 Ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

### 4.4.1 Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Houve maior produção de IL-1 $\beta$  no período de sete dias, com maior produção no grupo experimental de NF+ATRA (Figura 11).

Figura 11 - Quantificação de IL-1 $\beta$  (pg/mL) nos grupos: C, ATRA, NF e NF+ATRA nos períodos de 3,7,14 dias. Destacando os valores de  $p = 0,00$

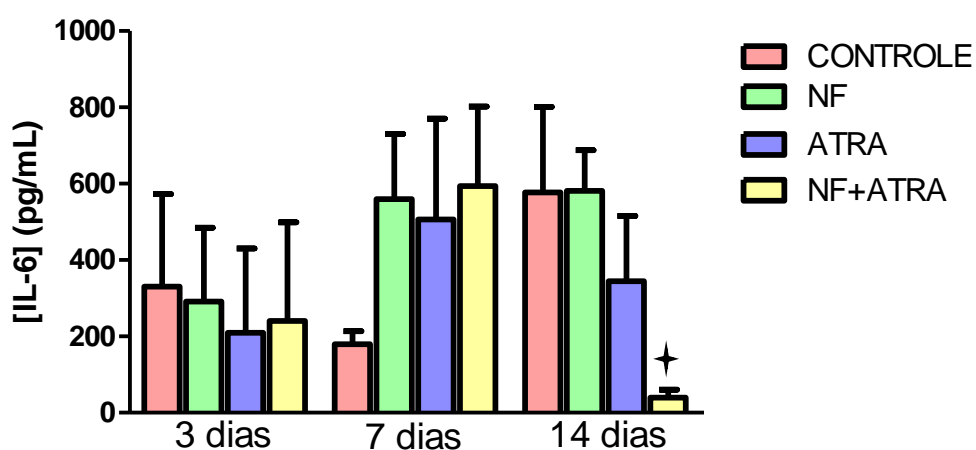


Legenda: Média  $\pm$  Desvio padrão da quantificação de IL-1 $\beta$  (pg/mL) entre os grupos experimentais durante os diferentes intervalos de tempo. Destacados os picos que apresentaram diferença estatisticamente significativa.  
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4.2 Interleucina (IL-6)

Para os níveis de IL-6 (pg/mL) temos maior secreção durante o período de 7 dias, e queda abrupta de secreção no período de 14 dias no grupo NF+ATRA.

Figura 12 - Média  $\pm$  Desvio padrão da quantificação de IL-6 (pg/mL) nos grupos: C, ATRA, NF e NF+ATRA nos períodos de 3,7,14 dias. Destacando os valores encontrados para  $p=0,00$



Legenda: Média  $\pm$  Desvio Padrão da quantificação de IL-6 (pg/mL) entre os grupos experimentais durante os diferentes espaços de tempo. Destacado o pico que apresentou a diferença estatisticamente significativa.  
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.4.3 Fator de necrose tumoral - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

A Tabela 5 mostra os valores encontrados para Média  $\pm$  Desvio padrão na secreção de TNF- $\alpha$ . Em que se apresentam valores estatisticamente semelhantes ( $p \geq 0,05$ ) indicando baixa produção dessa citocina, sendo essas muito pequenas ou indetectáveis em todos os grupos estudados.

Tabela 5 - Média±Desvio padrão da produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) de acordo com os diferentes espaços de tempo

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>C</b>	<b>NF</b>	<b>ATRA</b>	<b>NF+ATRA</b>
<b>3 Dias</b>	1064±0,8104	1063±0,9439	1065±2,256	1064±1,601
<b>7 Dias</b>	1063±0,5680	1063±0,5527	1063±0,7406	886,3±413,9
<b>14 Dias</b>	886,1±413,8	1063±0,6826	532,2±554,8	886,8±413,8

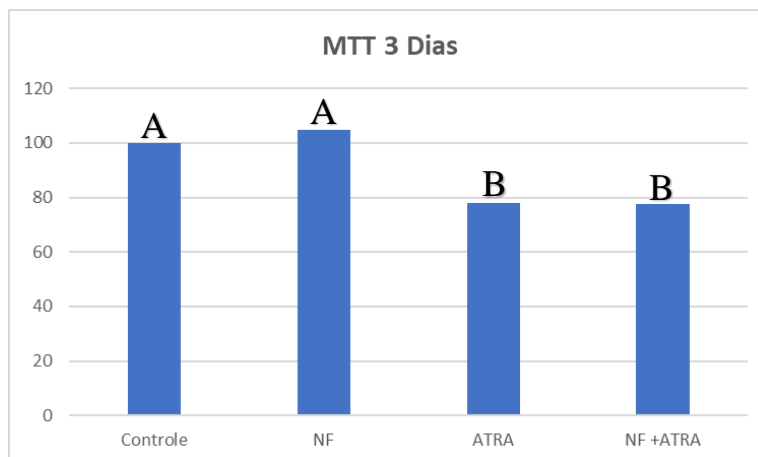
Legenda: Média±Desvio padrão encontrados para a produção de TNF- $\alpha$  nos períodos de 3,7,14 dias em nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### **4.5 Teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)**

As médias dos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade foram obtidos após os períodos de 3, 7 e 14 dias, aplicado a todos os grupos: C, ATRA, NF e NF + ATRA. Os resultados foram normalizados pelo grupo C (n=100%), nas figuras 12, 13 e 14 podem ser observadas as médias dos grupos nos períodos de 3, 7 e 14 dias respectivamente.

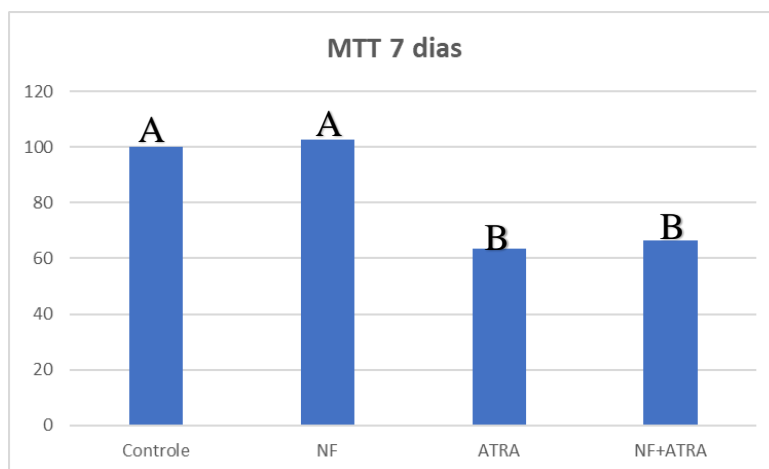
Figura 12- médias dos resultados do teste de MTT entre os grupos no período de 3 dias



Legenda: Médias MTT no período de 3 dias. Os valores encontrados para  $p=0,0$ . Em que controle é equivalente a NF (**A**) e ATRA equivalente a NF+ATRA (**B**).

Fonte: Elaborada pela autora.

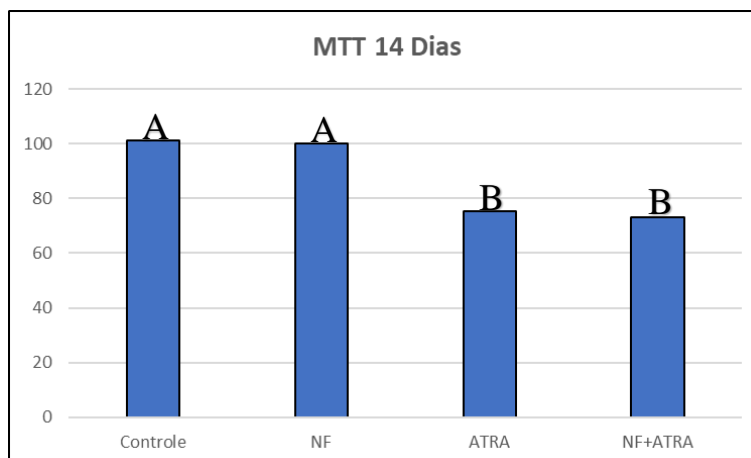
Figura 13 - médias dos resultados do teste de MTT entre os grupos no período de 7 dias



Legenda: Médias MTT no período de 7 dias. Os valores encontrados para  $p=0,0$ . Em que controle é equivalente a NF (**A**) e ATRA equivalente a NF+ATRA (**B**).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14- Médias dos resultados do teste de MTT entre os grupos no período de 14 dias



Legenda: Médias MTT no período de 14 dias. Os valores encontrados para  $p=0,0$ . Em que controle é equivalente a NF (**A**) e ATRA equivalente a NF+ATRA (**B**).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados apresentados nas tabelas 6, 7, 8 mostram, respectivamente cada um dos períodos: 3, 7, 14 dias, indicando que, os grupos C e NF se assemelharam entre si, o mesmo acontece ao comparar os grupos ATRA e NF+ATRA. Todavia, quando se comparam C e NF a ATRA e NF+ATRA, mostram diferença entre as médias. Sendo então semelhantes entre si e diferentes dos grupos C. Resultados demonstrados através da significância estatística, onde  $p=0,00$ .

Tabela 6- ANOVA – Tukey

sob o período de 3 dias a todos os grupos

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Diferença</b>
<b>Controle</b>	18	0,05772	A
<b>NF</b>	18	0,05717	A
<b>ATRA</b>	18	0,04356	
<b>NF+ATRA</b>	18	0,04000	

Legenda: ANOVA aplicado aos grupos no período de 3 dias. A letra **A** demonstra a semelhança com o grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - ANOVA sob o período de 7 dias a todos os grupos.

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Diferença</b>
<b>Controle</b>	18	0,73349	A
<b>NF</b>	18	0,7540	A
<b>ATRA</b>	18	0,4876	
<b>NF+ATRA</b>	18	0,4677	

Legenda: Teste ANOVA período de 7 dias. A letra **A** demonstra a semelhança com o grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.



Tabela 8- Teste ANOVA, sob o período de 14 dias a todos os grupos

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Diferença</b>
<b>Controle</b>	18	0,05772	A
<b>NF</b>	18	0,05717	A
<b>ATRA</b>	18	0,04356	
<b>NF+ATRA</b>	18	0,4000	

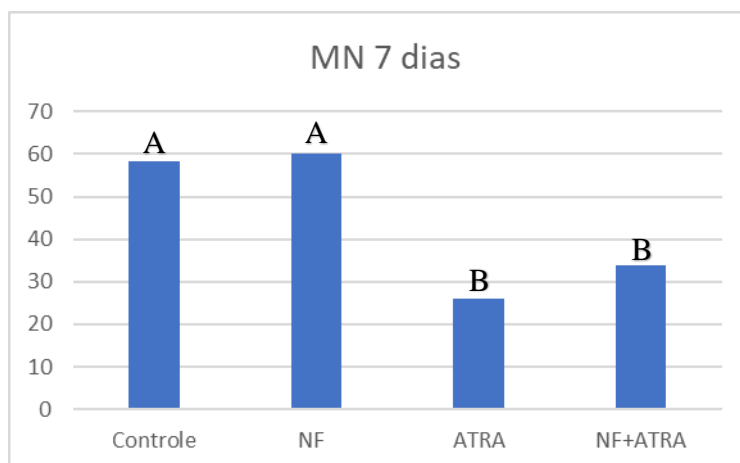
Legenda: teste ANOVA para o período de 14 dias. A letra **A** demonstra a semelhança com o grupo controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### **4.6 Micronúcleos**

A genotoxicidade celular foi estimada dentre os grupos através da média de MN formados para cada período: 7 e 14 dias (Figura 15 e 16), os valores submetidos a ANOVA *one-way* estão representados nas figuras 17 e 18. A figura 17, representa o período de 7 dias, na qual apresenta que C e NF são semelhantes entre si e ATRA e NF+ATRA também são semelhantes entre si. Porém, são disparetes quando comparados entre eles, apresentando  $p=0,00$ . Na figura 18, que representa o período de 14 dias, pode-se notar resultados parecidos, em que C e NF se assemelham quando comparados entre si, assim como ATRA e NF+ATRA, no entanto, mostram significância estatística ( $p=0,00$ ) quando comparados no conjunto.

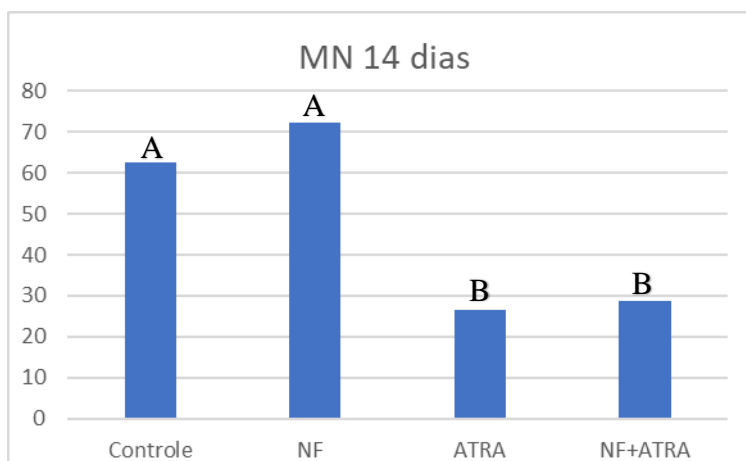
Figura 15 - Média encontrada para MN no período de 7 dias



Legenda: Média dos valores obtidos em MN para 7 dias. Os valores encontrados para  $p=0,0$ . Em que controle é equivalente a NF (A) e ATRA equivalente a NF+ATRA (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

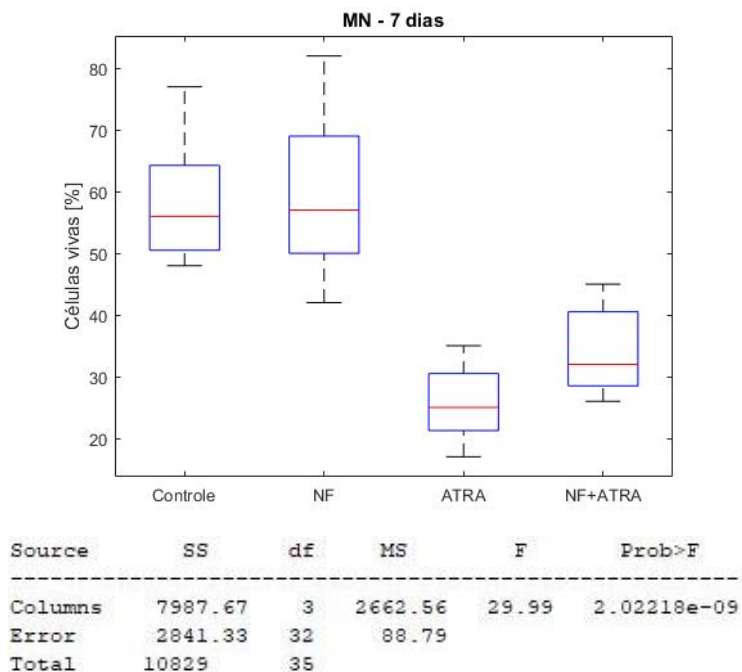
Figura 16- Média de MN encontrada no período de 14 dias



Legenda: Média obtida sob os valores de MN para 14 dias. Os valores encontrados para  $p=0,0$ . Em que controle é equivalente a NF (A) e ATRA equivalente a NF+ATRA (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

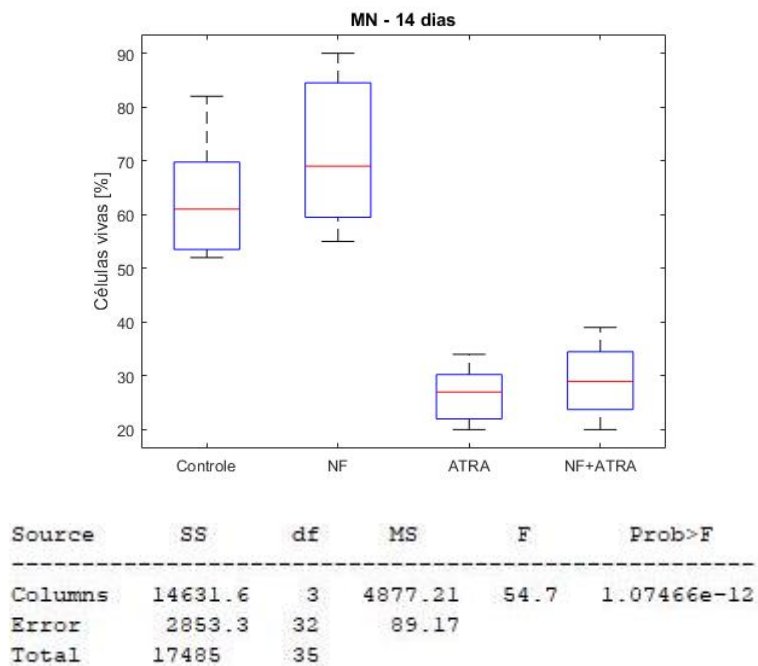
Figura 17- Teste ANOVA sob MN, para os grupos no período de 7 dias



Legenda: ANOVA sob MN no período de 7 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18- ANOVA para MN no período de 14 dias



Legenda: ANOVA sob MN no período de 14 dias.

Fonte: Elaborada pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

O ATRA é um dos retinoides mais comuns e tem demonstrado resultados satisfatórios no tratamento de vários tipos de tumores (Germain et al., 2006). Em células de osteossarcoma inibe a proliferação e induzem a apoptose (Yang et al., 2012). Entretanto, produz efeitos colaterais tais como: Síndrome ATRA que consiste de febre, insuficiência respiratória e infiltrado pulmonar (Prevedelo, Sagrillo, 2016). Para melhorar a qualidade de vida de pacientes que fazem uso deste fármaco, é necessário desenvolver técnicas capazes de reduzir os seus efeitos colaterais.

Viabilizando a liberação gradual e controlada de fármacos, polímeros biodegradáveis a metabólitos inerentes ao organismo estão sendo usados (Tan et al., 2005; Loquercio et al., 2015). O fármaco é liberado pelo polímero por livre difusão ou sobre auto degradação e, com a diminuição da frequência de administração da droga, há conseqüentemente diminuição dos efeitos colaterais (Sill, Recum, 2008).

Desta forma se propôs o uso do polímero PCL que é amplamente utilizado em bioengenharia, principalmente em engenharia de tecidos, por ser biocompatível e biodegradável. (Baker et al., 2016). Além disso, é bastante versátil e possibilita sintetização, inclusive para formação de NF (Orive et al., 2003; Sinha et al., 2004) valendo-se da técnica de eletrofiação, tornando-se viável preconizar uma solução contendo solvente, fármaco e polímero, sendo essa capaz de passar pelo processo (Raijzer et al., 2013; Sultanova et al., 2016) sem alterar o mecanismo de ação do fármaco como observado neste estudo.

O método de eletrofiação é dependente de algumas variáveis, tais como: diferença de potencial do campo eletromagnético, vazão da solução, distância da ponta da agulha ao coletor e o diâmetro da agulha (Costa et al., 2012; 57 Huang

et al., 2003), além da umidade e temperatura. Tendo isso em vista, variou-se a distância da ponta da agulha ao anteparo em 8, 10, 12, 15 e 18 cm, a diferença de potencial em 12 Kv, o diâmetro da agulha em 0,7 mm e o fluxo da solução em 0,05 mL/h como no estudo de Quintino (2017).

Neste presente estudo, selecionou-se a manta que continha as NF de menor diâmetro e mais uniformes (Sato, 2015). Para tanto os parâmetros de 12 Kv a uma distância de 18 cm, 26,7°C e umidade relativa do ar em 28% durante 15 minutos foram utilizados.

A adição do ATRA foi empregada à uma concentração de 7800  $\mu$ /mol (Dozza et al., 2012).

A diferença de potencial de 12Kv a uma distância de 15 cm, 31°C e umidade relativa do ar de 1% foi utilizada para eletrofição da solução que continha PCL, acetona e ATRA até que se finalizassem os 5 ml de solução, podendo assim, não interferir na concentração da solução. Para que fosse respeitada a concentração exata a solução foi submetida a pesagem antes de ser eletrofiada e logo após o processo, podendo assim ser presumida a perda durante a produção das NF+ATRA, evitando variações na concentração final do fármaco nas amostras do grupo experimental.

Após a síntese das fibras, foi realizada a espectroscopia por FTIR, que viabiliza a investigação da estrutura polimérica e dos componentes moleculares. Dentre os espectros conseguidos por FTIR entre as faixas de 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ , pois essa é a faixa comum para PCL (Gomes et al., 2017) para que se pudesse avaliar a liberação do ATRA no meio de cultura DMEM, foi realizado FTIR de ATRA puro, em pó, para assim caracterizar o padrão dos picos de absorvância que seriam observados nos grupos experimentais de NF e NF+ATRA, só então realizou-se novas aquisições de imagens dos picos de absorvância em diferentes períodos de tempo, 3, 7 e 14 dias, para avaliar o grau de liberação de ATRA no meio de cultura através da degradação do polímero no grupo experimental composto por NF+ATRA. Ao se comparar os picos sobrepondo-os, pôde-se notar

liberação de ATRA no meio de cultura. Isso pode ser observado pois existe aumento nos picos da região entre 3100 e 2800 $\text{cm}^{-1}$  e também entre 1700  $\text{cm}^{-1}$  além de vários picos intercalados entre 1500 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Sugerindo, que o PCL é um polímero que tem a característica de se biodegradar de forma lenta e uniforme; conseqüentemente, liberar o fármaco de forma mais lenta, como mostra o FTIR com maior aumento gradual entre 3, 7 e 14 dias.

Outro parâmetro avaliado foi o de molhabilidade, mostrando a fase de ângulo, em que se analisa o ângulo formado entre a fase líquida e sólida observando a interface entre o líquido e o ar (Wulf et al., 1999), que forma um ângulo de contato entre as superfícies. As imagens captadas pelo goniômetro óptico foram analisadas. Os valores encontrados para o teste de hidrofobicidade da manta de PCL apresentaram em média o valor de 97,09° sugerindo que PCL é um polímero hidrofóbico. Os valores encontrados para o teste de molhabilidade da manta de PCL com ATRA tiveram em média 112,9° sugerindo que as NF com ATRA são mais hidrofóbicas que as NF sem ATRA, porque o ATRA é uma molécula apolar.

Após a caracterização físico química das NF experimentais, deu-se início os experimentos *in vitro*, sob a cultura de células imortalizadas MG63.

Cultura de células apresenta dificuldades, dentre elas, a de reproduzir os eventos biológicos pois é feita *in vitro* e, embora seja possível uma vasta investigação, limita o estudo pois as características do microambiente tumoral não podem ser avaliadas conjuntamente, mas cada evento de forma independente. (Cruz et al., 2009). Estudos anteriores como os de Zitnik et al. (1994) e Dozza et al. (2012), sugerem que ATRA regula a função de uma grande variedade de células inflamatórias.

A produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  está diretamente relacionada com o papel regulatório em células osteoblásticas como a MG63 e é responsável por promover a apoptose dessas células. (Sun et al., 2016).

IL-1 é um potente agente que contribui para a reabsorção óssea (Rodan et al., 1990). A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória importante em resposta a injúrias (Dinarello, 1996), produzida e secretada por células do sistema imune inato (Takeuchi, Akira, 2010; He et al., 2014). Está diretamente envolvida no processo de carcinogênese do osteossarcoma (He et al., 2014). Foi observada a produção desta citocina em cultura de células MG63, células imortalizadas semelhantes a osteoblastos. A maior produção de IL-1 $\beta$  ocorreu no período de 7 dias por todos os grupos avaliados, sendo maior no grupo NF+ATRA. Isso sugere que, devido a liberação lenta do fármaco o pico de liberação ocorre próximo do sétimo dia, período onde provavelmente há ativação da primeira via da cascata da inflamação que tende a durar 48 horas; com o passar dos dias houve queda na sua produção, fato verificado aos 14 dias (Kumar et al., 2013).

A estimulação de receptores de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , induzem elevação de IL-6. (Kraus et al., 2012). A IL-6 é uma citocina multifuncional que desempenha um papel importante na homeostase ou sob alguma injúria (Ishihara, Hirano, 2002). Está presente ainda, no processo de carcinogênese e é responsável pela sobrevivência, diferenciação, migração e invasão, além de inflamação e metabolismo celular (Duan et al., 2002). No grupo NF+ATRA, a produção de IL6 foi menor do que os demais grupos no período de 14 dias, sugerindo que o fármaco incorporado à NF pode ser eficaz no tratamento das células MG63, podendo ser útil no tratamento de osteossarcoma, além de dificultar o processo de metástase.

TNF- $\alpha$  é uma importante citocina contra muitos tipos de câncer. No entanto, pode ser tóxico em altas concentrações. (Robl et al., 2016). Barbosa (2018) relataram que TNF- $\alpha$  é necessário para a carcinogênese, e que mantém as células em estado indiferenciado *in vitro*. Neste estudo, a produção de TNF- $\alpha$  foi em quantidade muito pequena em todos os grupos testados, resultado similar ao de Robl et al. (2016) que relata que a TNF- $\alpha$  mesmo em concentrações baixas pode juntamente com IL-1 e outras citocinas induzir e estimular o processo inflamatório, além de remover patógenos e seus produtos.

No presente estudo, realizou-se o ensaio de MTT para investigar a citotoxicidade dos materiais testados, notou-se diferença entre as médias de cada grupo quando comparadas durante os períodos de 3, 7 e 14 dias sugerindo que houve alteração na atividade metabólica das células, apresentado maior citotoxicidade os grupos ATRA e NF+ATRA em todos os períodos. Os resultados mostram ainda que a atividade celular foi diminuída progressivamente ao longo dos dias, e o período de 14 dias apresentou maior citotoxicidade. O grupo NF foi similar ao grupo C nos três períodos avaliados, indicando que NF, ao se degradar, não produz metabólitos citotóxicos às células MG63. E o grupo experimental NF+ATRA foi semelhante ao grupo ATRA, sugerindo que o sistema NF+ATRA apresentou eficácia equivalente ao grupo ATRA. No estudo de Krzyzankova (2014) foi utilizada diferentes células de linhagens osteoblásticas para esse mesmo teste e apresentou que a citotoxicidade para ATRA é dose dependente, além de mostrar seus efeitos antineoplásicos, ou seja, a inibição da atividade de proliferação celular. No presente estudo, e com base nos resultados encontrados, indica-se que NF+ATRA induziu citotoxicidade celular, e sua liberação lenta no meio seria capaz de causar inibição na atividade de proliferação nas células MG63 por mais tempo que com o emprego do fármaco isoladamente.

O ensaio de MN é utilizado para a detecção de dano genético *in vitro*, (Miller et al., 1998; Ribeiro et al., 2006). Para esse teste, foram encontradas diferenças entre as médias dos grupos para os dois períodos de 7 e 14 dias. Os grupos C e NF apresentaram similaridade quando avaliados nos dois períodos, indicando que NF, ao se degradar, não produz metabólitos genotóxicos às células MG63. O grupo experimental NF+ATRA foi semelhante ao grupo ATRA, indicando que o sistema NF+ATRA apresenta eficácia análoga ao grupo ATRA, sugerindo que houve alteração induzida pelo sistema NF+ATRA na atividade celular. Dozza et al. 2012 demonstraram haver formação de micronúcleos em células MG63 utilizando ATRA na mesma concentração. Sugerindo que o



fármaco foi adequadamente impregnado às NF e liberado ao longo dos dias, e os resultados aqui encontrados representam a diminuição na atividade celular.

## 6 CONCLUSÃO

A síntese de NF através da técnica de eletrofiação foi simples, rápida e de baixo custo. Através da caracterização físico-química, observou-se que houve incorporação de ATRA às NF, e sua liberação ao meio de cultura foi citotóxico e genotóxico em células MG63. Além de diminuir a produção e liberação de IL-1 e IL-6. Estes resultados são promissores, visto que o emprego da NF associado ao ATRA foi eficiente.

Além disso, esta técnica pode ser uma alternativa de tratamento, especialmente em outras doenças além do osteossarcoma. Estudos futuros com lesão potencialmente maligna serão conduzidos para se investigar a eficácia desta técnica para esta doença e para a qual não há tratamento eficaz.

## REFERÊNCIAS\*

Altucci L, Leibowitz MD, Olgivie KM, de Lera AR, Gronemeyer H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;6:739-810.

Baker SR, Banerjee S, Bonin K, Guthold M. Determining the mechanical properties of electrospun poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 Feb;59:203-212. doi: 10.1016/j.msec.2015.09.102.

Barbosa PH, Carneiro F, Martelli A, Trigo EL. Signaling pathway of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) release and synthesis in exercise. *Arch Health Invest.* 2018;7(3):91-5.

Brito MDF, Sant'Anna IP, Galindo JCS, Rosendo LHP, Santos JB. Avaliação dos efeitos adversos clínicos e alterações laboratoriais em pacientes com acne vulgar tratados com isotretinoína oral. *An Bras Dermatol.* 2010;85(3):331-7.

Costa RGF, Oliveira JE, Paula GF, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, Mattoso LHC. Eletrofiacção de polímeros em solução. Parte II: aplicações e perspectivas. *Polímeros.* 2012; 22(2):178-85. doi: 10.1590/S0104-14282012005000026

Cruz M, Enes M, Pereira M, Dourado M, Ribeiro SAB. Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do câncer. *Rev Port Pneumol.* 2009;15(4):669-81.

Dash TK, Konkimalla VB. Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. *J Control Release.* 2012; 158:15–33.

Dinarello, CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87(6): 2095-147.

Ding Y, Cai M, Cui Z, Huang L, Wang L, Lu X, Cai Y. Synthesis of low-dimensional polyion complex nanomaterials via polymerization-induced electrostatic self-assembly. *Chem Asian J.* 2018;130(4):1065-8.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Dozza B, Papi A, Lucarelli E, Scotlandi K, Pierini M, Tresca G, et al. Cell growth inhibition and apoptotic effect of the rexinoid 6-OH-11-O-hydroxyphenantrene on human osteosarcoma and mesenchymal stem cells. *Appl In Vitro Toxicol*. 2012;26(1):142-9.

Duan Z, Lamendola DE, Penson RT, Kronish KM, & Seiden MV. Overexpression of IL-6 but not IL-8 increases paclitaxel resistance of U-2OS human osteosarcoma cells. *Cytokine*. 2002;17(5):234-42.

Fonseca AS, Kuijpers E, Kling KI, Levin M, Koivisto A J, Nielsen SH, Koponen IK. Particle release and control of worker exposure during laboratory-scale synthesis, handling and simulated spills of manufactured nanomaterials in fume hoods. *J Nanopart Res*. 2018;20(2):48.

Germain P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. International union of pharmacology LVIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol*. 2006;58(4):760-72.

Gomes, R C, Síntese e caracterização do poli (pcl-tmc) uretana para utilização como biomaterial.[dissertação].São Carlos:Univ Federal de São Carlos; 2017.

Ghosh SK. Functional coatings: by Polymer microencapsulation. Wiley: John Wiley & Sons. 2006.

Guedes da Silva IC. Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de sistemas encapsulados de óleo de canela e cinamaldeído associados ao polímero poli (ε- caprolactona) PCL,[dissertação].Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2016.

Haider A, Haider S, Kang IK. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *ARABJC*. 2015;8(6):749-896.

He Y, Liang X, Meng C, Shao Z, Gao Y, Wu Q, Yang S. Genetic polymorphisms of interleukin-1 beta and osteosarcoma risk *Int J Orthop*. 2014;38(8):1671-6. doi.org/10.1007/s00264-014-2374-2

Hiep NT, Lee BT. Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *J Comput Surg*. 2010;21(6):1969-78.

Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A Review on Polymers Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. *Comp Sci Tech*. 2003;(63):2223-53.

Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine & growth factor rev.* 2002;13(4-5), 357-6

Kong G, Kim HT, Wu K, DeNardo D, Hilsenbeck SG, Xu XC, Lamph WW, et al. The retinoid X receptor selective retinoid LGD1069, down regulates cyclooxygenase-2 expression in human breast cell through transcription factor crosstalk, implication for molecular-based chemoprevention. *Cancer Res.* 2005;65:3462-9.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins patologia básica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.

Kraus D, Deschner J, Jäger A, Wenghoefer M, Bayer S, Jepsen S, et al. Human  $\beta$ -defensins differently affect proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblast-like MG63 cells. *Annu Rev Vis Sci.* 2012;227(3):994-1003.

Krzyzankova M, Chovanova S, Chlapek P, Radsetoulal M, Neradil J, Zitterbart K, et al. LOX/COX inhibitors enhance the antineoplastic effects of all-trans retinoic acid in osteosarcoma cell lines. *JCO Precis Oncol.* 2014;35(8):7617-27.

Loquercio A, Castell-Perez E, Gomes C, Moreira RG. Preparation of chitosan-alginate nanoparticles for trans-cinnamaldehyde entrapment. *Curr Opin Food Sci.* 2015;80(10):1-11.

Miller B, Pötter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung. Mutat Res.* 1998;410(1):81-116.

Orive G, Hernández RM, Rodríguez GA, Domínguez-Gil A, Pedraz JL. Drug delivery in biotechnology: presente and future. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14:659-64.

Prevedello CP, Sagrillo MR. Leucemia promielocítica aguda. *Disciplinarum Scientia Saúde.* 2016;8(1):39-50.

Quintino LF. Desenvolvimento de nanofibras dos polímeros policaprolactona e permanganato de potássio através da técnica de eletrofiação. In: Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR câmpus Dois Vizinhos. 2017.p.436-8.

Rajzer I, Menaszek E, Kwiatkowski R, Planell JA, Castano O. Electrospun gelatin/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous scaffold modified with calcium phosphate for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;44:183-90

Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Fittél AP, Nascimento VP. Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arq Inst Biol*. 2006;73(3):357-60.

Robl B, Botter SM, Boro A, Neri D, Fuchs B. Targeting of metastatic osteosarcoma with F8-TNF-alpha in an orthotopic mouse model. 2016;589. doi:10.1158/1538-7445.AM2016-589.

Rodan SB, Wesolowski G, Chin J, Limjuco GA, Schmidt JA, Rodan G A IL-1 binds to high affinity receptors on human osteosarcoma cells and potentiates prostaglandin E2 stimulation of cAMP production. *J Immunol*. 1990;145(4):1231-7.

Santos JD. Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de nanofibras de polietilmetacrilato/nistatina produzidas por eletrofição [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

Sato TP. Obtenção e caracterização de nanofibras eletrofiadas via solução de quitosana com e sem inclusão de hidroxiapatita [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2015.

Sill TJ, Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(13):1989-2006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.

Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm Technol*. 2004;278(1):1-2

Sultanova Z, Kaleli G, Kabay G, Mutlu M. Controlled release of a hydrophilic drug from coaxially electrospun polycaprolactone nanofibers. *Int J Pharm Technol*. 2016;505(1-2):133-8.

Sun M, Yang J, Wang J, Hao T, Jiang D, Bao G, et al. TNF- $\alpha$  is upregulated in T2DM patients with fracture and promotes the apoptosis of osteoblast cells in vitro in the presence of high glucose. *Cytokine*. 2016;80:35-42.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6): 805-20.

Tan SH, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Systematic parameter study for ultrafine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*. 2005;46(16):6128-34.

Tariq Z, Phinney RC, Mohamed I. A case of life-threatening retinoic acid syndrome and review of literatur. *Circ Genom Precis Med*. 2014;21(2):e28-e30.

Tiwari AP, Joshi MK, Kim JI, Unnithan AR, Lee J, Park CH, et al. Bimodal fibrous structures for tissue engineering: Fabrication, characterization and in vitro biocompatibility. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2016;476:29-34.

Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century. *Prog Colloid Polym Sci*. 2010;35(10): 1217-56

Wulf M, Michel S, Grundke K, Del Rio OI, Kwok DY, Neumann AW. Simultaneous determination of surface tension and density of polymer melts using axisymmetric drop shape analysis. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 1999;210(1):172–81.

Yao Q, Cosme JG, Xu T, Miszuk JM, Picciani PH, Fong H, et al. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials*. 2017;115:115-27.

Yang QJ, Zhou LY, Mu YQ, Zhou QX, Luo JY, Cheng L, et al. All-trans retinoic acid inhibits tumor growth of human osteosarcoma by activating Smad signaling-induced osteogenic differentiation. *Int J Cancer Manag*. 2012;41(1):153-60.

Zitnik RJ, Kotloff RM, Latifpour J, Zheng T, Whiting NL, Schwalb J, et al. Retinoic acid inhibition of IL-1-induced IL-6 production by human lung fibroblasts. *J Immunol Regen Med* 1994;152(3):1419-27.