UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Ação de nanopartículas estruturadas de manganês sobre viabilidade de células prostáticas humanas tumorais

RAFAEL FACTOR CARANDINA

MONOGRAFIA APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, CAMPUS DE BOTUCATU, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

BOTUCATU - SP

2012

Instituto de Biociências – Gabinete do Diretor
Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP 18618-000 Botucatu - São Paulo - Brasil
Tel Fax 14 3815 2838 Tel 14 3811 6160 diretor@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Ação de nanopartículas estruturadas de manganês sobre viabilidade de células prostáticas humanas tumorais

RAFAEL FACTOR CARANDINA

Orientadora: Elenice Deffune
Coorientador: Andrei Moroz
Supervisor: Sérgio Felisbino

MONOGRAFIA APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, CAMPUS DE BOTUCATU, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

BOTUCATU - SP

2012

Instituto de Biociências – Gabinete do Diretor
Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP 18618-000 Botucatu - São Paulo - Brasil
Tel Fax 14 3815 2838 Tel 14 3811 6160 diretor@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA SEÇAO TEC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORMAÇAO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Carandina, Rafael Factor.

Ação de nanopartículas estruturadas de manganês sobre viabilidade de células prostáticas humanas tumorais / Rafael Factor Carandina. – Botucatu: [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Elenice Deffune

Coorientador: Andrei Moroz

Capes: 90194000

1. Nanopartículas. 2. Manganês. 3. Próstata. 4. Células cancerosas.

Palavras-chave: Células tumorais; Cultura de células; Manganês; Nanopartículas; Nanotoxicologia.

Resumo

O estágio supervisionado no Laboratório de Engenharia Celular/Divisão Hemocentro - FMB teve por objetivo oportunizar ao aluno o exercício dos conhecimentos adquiridos em cultura de células, por meio de atuação prática em laboratório, bem como proporcionar o desenvolvimento de habilidades e competências pessoais e profissionais.

A presente monografia descreve o tratamento de nanopartículas estruturadas de manganês em culturas de células humanas tumorais prostáticas após 24 e 48 horas, buscando identificar, de uma forma bem simples, possíveis propriedades antitumorais destas nanopartículas, através de análises de viabilidade celular por coloração de Azul de Tripan.

Dedico este trabalho a meu pai, Noelei Aparecido Angelucci Carandina, e especialmente à minha mãe, Maria Luiza Factor Carandina, a qual me impulsionou buscar vida nova nos anos que sofri de depressão. Agradeço ambos por me darem uma chance e de conceder a mim oportunidade de me realizar pessoalmente e profissionalmente.

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana."

Carl Jung

Sumário

1. Introdução 9
1.1. Nanopartículas 9
1.2. Tamanho 10
1.3. Superfície da Partícula 10
1.4. Química de Superfície 10
1.5. Componentes Químicos 11
1.6. Dosagem 11
1.7. Produção de Radicais Livres 11
1.8. Principais Nanoestruturas Aplicadas na Área Médica 11
1.8.1 Lipossomas 11
1.8.2. Nanoemulsão 12
1.8.3. Dendrímeros 13
1.8.4. Nanopartículas poliméricas 13
1.8.5. Nanopartículas metálicas 14
1.8.6. Nanopartículas de ouro 14
1.8.7. Nanopartículas de prata 15
1.8.8. Micelas poliméricas 15
1.8.9. Nanotubos de carbono e fulerenos 16
1.9. Aplicações Biomédicas 16
1.9.1. Carreamento de drogas 16
1.9.2. Hipertermia 17
1.9.3. Imagem e diagnóstico 18
1.9.4. Engenharia de Tecidos com o uso de nanopartículas magnéticas 19
1.9.5. Separação magnética para purificação e imunoensaio 20
1.10. LNCaP 20
2. Justificativa 21
3. Objetivo Geral 21

4. Objetivos Específicos 21

5. Material e Métodos 22

5.1. Obtenção das Nanopartículas 22

5.1.1. Técnica de Pechini para a síntese de óxidos metálicos nano estruturados 22

5.2. Descongelamento, Expansão e Congelamento de Células da Linhagem LNCaP Para Experimentos e para Estabelecimento de Banco de Células 23

5.2.1. Descongelamento celular 23

5.2.2. Propagação da cultura celular 23

5.2.3. Estabelecimento de banco de células: congelamento celular 26

5.3. Tratamento das Culturas Celulares com os Compostos Nanoestruturados 26

5.4. Análise de Viabilidade por Azul de Tripan em Contador Automático e Análise por Microscopia Invertida 28

5.4.1 Análises após 24 horas de tratamento 28

5.4.2 Análises após 48 horas de tratamento 31

6. Resultados e Discussão 33

8. Referências 35

1. Introdução

Nanomedicina, nanotecnologia e nanotoxicologia são ciências complementares e multidisciplinares visando à melhoria da vida humana (Journal of Internal Medicine, 2010).

Nos últimos anos, a fabricação de nanopartículas e exploração de suas propriedades únicas têm atraído à atenção de físicos, químicos, engenheiros e biologistas em geral. O interesse em nanopartículas resulta do fato de que as propriedades mecânicas, químicas, elétricas, ópticas, magnéticas, eletro e magneto-ópticas destas partículas são diferentes das suas propriedades do material de origem e dependem do tamanho de partícula. (Laurent e Mahmoudi, 2011).

Cinco áreas principais foram identificadas: 1- instrumentos de análise; 2- imagem/diagnóstico; 3- nanomateriais e nanodispositivos; 4- novas terapêuticas, drogas e sistemas de distribuição e 5- clínica, questões regulamentares e toxicológicas (European Science Foundation, 2004).

Em se tratando de compostos nanoestruturados, uma avaliação completa dos efeitos desejáveis contra os efeitos adversos é necessária para aplicações seguras destes, e há grandes desafios pela frente para responder questões-chaves da nanotoxicologia (Journal of Internal Medicine, 2010).

Desta forma, o presente trabalho corresponde a ensaios de toxicidade com nanopartículas de manganês in vitro fazendo uso de análises por microscopia e por coloração de azul de Tripan.

1.1. Nanopartículas

Não há uma definição internacional consensual do que é uma nanopartícula. Contudo, um resumo do novo documento PAS71 (Publicy Available Specification 71), menciona: "Uma nanopartícula é um corpo tendo uma dimensão da ordem de 100 nm ou menor".

Uma observação deve ser associada a essa definição: “Propriedades únicas que diferenciam as nanopartículas dos materiais de origem, tipicamente desenvolvidos em uma escala crítica de 100 nm”.

Algumas das características das partículas tais como o tamanho, superfície da partícula, química de superfície e produção de radicais livres desempenham papéis importantes na nanotoxicidade (Ai et al., 2011). Outras características, tais como

cristalinidade, revestimento, e a longevidade das partículas também têm sido estudadas como parâmetros importantes (Schlesinger, 1995).

1.2. Tamanho

Uma redução no tamanho das nanopartículas resulta em um aumento da área superficial da partícula. Portanto, mais moléculas químicas podem se anexar à superfície do tecido, o que aumenta a sua reatividade e resulta em um aumento em seus efeitos tóxicos (Linkov, Satterstrom e Corey, 2008).

Estudos mostram que:

-Nanopartículas menores do que 100 nm são absorvidos pelas células do intestino. (Ai et al., 2011);

-A absorção de nanopartículas menores (100 nm) no tecido linfático é maior do que nas células intestinais. (Ai et al., 2011);

-Células intestinais não podem absorver nanopartículas maiores do que 400 nm. (Ai et al., 2011);

-Apenas as nanopartículas menores do que 500 nm podem entrar no sistema circulatório (Ai et al., 2011).

1.3. Superfície da Partícula

Estudos in vitro demonstraram que as partículas muito pequenas têm mais poder patológico e destrutivo sobre os pulmões, em vez de as mesmas partículas de tamanho maior, devido à sua maior área de superfície, uma maior tendência para conjugar e sua energia sustentavel (Singh et all, 2007).

1.4. Química de Superfície

Os grupos reativos nas nanopartículas influenciam a sua interação com os o materiais biológicos e em alguns casos, pode ser possível para prever a reatividade da superfície de nanopartículas (Journal of Internal Medicine, 2010). A escassez de dados, no entanto, sugere que a verificação destas previsões em laboratório seria sensata. O grau de hidrofobicidade e hidrofilicidade de uma superfície é a principal característica utilizada para estimar a

toxicidade e, assim como o tamanho, parece que a superfície da partícula é crítica na sua absorção na mucosa intestinal. A absorção de nanoparticulas produzidas por polímeros hidrofóbicos é maior do que a de nanoparticulas produzidas por polímeros hidrófilos

1.5. Componentes Químicos

Componentes químicos da superfície da partícula têm importantes efeitos sobre as nanopartículas da forma que eles podem reagir com os metais. Também é notável que a combinação de alguns metais com outros causa uma toxicidade complexa, o que não ocorre com os metais individualmente.

1.6. Dosagem

A toxicidade e outras reações dependem da dosagem prescrita e das substâncias utilizadas. Pesquisas mostram que uma dose elevada de nanopartículas em partículas pequenas ou grandes pode ser prejudicial à saúde

1.7. Produção de Radicais Livres

A maioria ou a totalidade das partículas patogênicas produzem radicais livres no sistema livre da célula e isto causa estresse oxidativo, o qual dá origem à inflamação, destruição das células e genotoxicidade.

A superfície da partícula dos radicais livres pode ativar o ciclo redox e pode levar a uma intoxicação celular.

1.8. Principais Nanoestruturas Aplicadas na Área Médica

1.8.1 Lipossomas

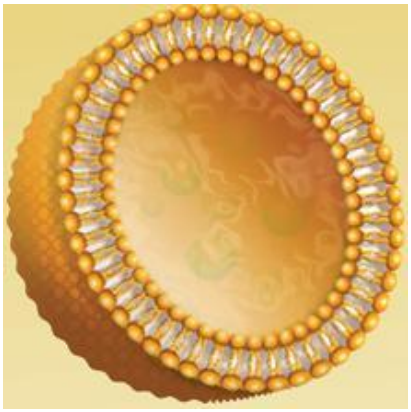


Figura 1 - Esquema de uma Lipossoma (http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

São vesículas esféricas compostas por bicamadas (lamelas) de fosfolipídios que, por sua vez, são moléculas presentes no organismo humano com afinidade tanto por água quanto por óleos e gorduras. Os lipossomas foram descobertos no início da década de 60 e podem distinguir-se conforme o seu tamanho e número de lamelas. Polímeros podem ser incorporados na sua superfície, para aumentar a estabilidade e o tempo de permanência do organismo. Pode-se ainda ligar à superfície de anticorpos, que atuariam como agentes transportadores dos lipossomas para determinadas zonas do organismo.

1.8.2. Nanoemulsão

Figura 2 - Esquema de uma Nanoemulsão (http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

É uma nanocápsula sem revestimento polimérico. Assim como os lipossomas, podem apresentar na sua superfície moléculas que alteram as suas propriedades.

1.8.3. Dendrímeros

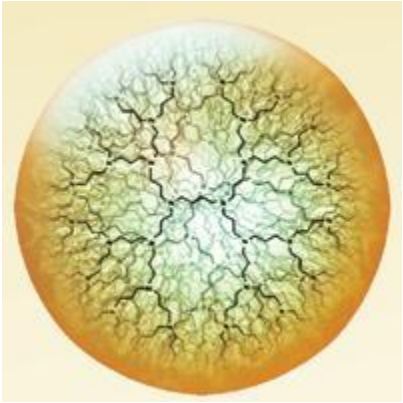


Figura 3 - Esquema de um Dendrímero (http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

Conhecidos como moléculas-cascata, são moléculas formadas por um núcleo ramificado, como ramos de uma árvore, sendo que o número de ramificações determina o tamanho do dendrímero. As moléculas do fármaco são fixadas nos espaços vazios entre as ramificações.

1.8.4. Nanopartículas poliméricas

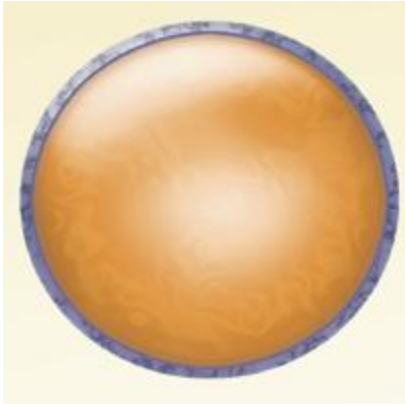


Figura 4 - Esquema de uma nanopartícula polimérica (http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

Desenvolvidas na década de 90, podem ser divididas em nano-esferas, compostas por uma rede de polímeros, e nanocápsulas, que são gotículas de óleo revestidas por uma fina camada de polímeros.

1.8.5. Nanopartículas metálicas

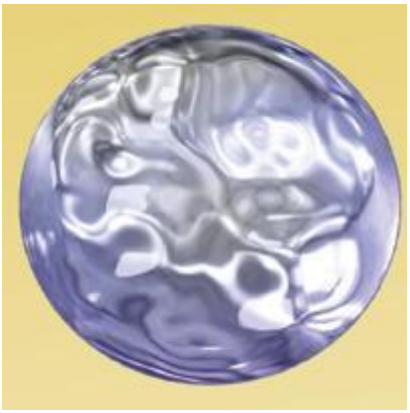


Figura 5 - Esquema de uma nanopartícula metálica (http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

São compostas por metais que têm propriedades diferentes daquelas observadas macroscopicamente devido ao seu reduzido tamanho. Além de serem usadas como transportadores de fármacos, as nanopartículas metálicas magnéticas são também usadas na magneto-hipertermia, processo pelo qual o corpo aquece onde se localizam as nanopartículas, tendo aplicações, por exemplo, no combate ao câncer. As nanopartículas magnéticas podem também ser levadas para qualquer parte do corpo através de um campo magnético exterior.

1.8.6. Nanopartículas de ouro

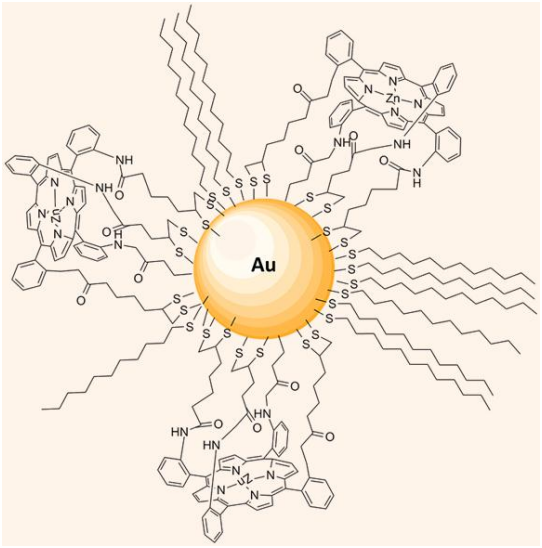


Figura 6 - Esquema de uma nanopartícula de ouro (http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

Estas partículas são constituídas por ouro e são revestidas por um material biocompatível e que impeça a sua agregação. Estas partículas são usadas como método de diagnóstico, pois estas são capazes de refletir uma grande quantidade de radiação, identificando, por exemplo, células cancerígenas.

1.8.7. Nanopartículas de prata

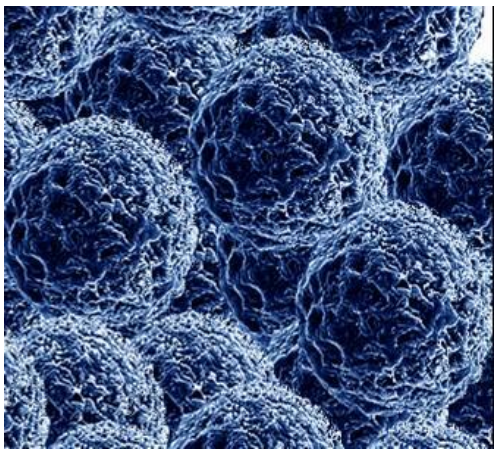


Figura 7 - Nanopartículas de prata

(http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

A prata possui uma ação antimicrobiana conhecida há muito tempo, porém na forma de nanopartículas tem uma superfície de contato infinitamente maior e suas propriedades são enormemente aumentadas. A medicina tem demonstrado que a prata destrói mais de 650 organismos patogénicos. Entretanto, partículas de dimensões micrométricas causam a obstrução das membranas celulares, causando envenenamento por prata, conhecido como *Argyria*. Isto não acontece com o uso de partículas de prata em dimensões nanométricas. Porém, a exposição continuada a estas nanopartículas, mesmo que em pequenas concentrações, compromete a função das mitocôndrias de fornecer energia à celula, podendo levar à sua destruição.

1.8.8. Micelas poliméricas

Têm uma estrutura simples, composta por uma região interna hidrofóbica e uma região externa hidrofílica. São usadas como transportadoras de fármacos.

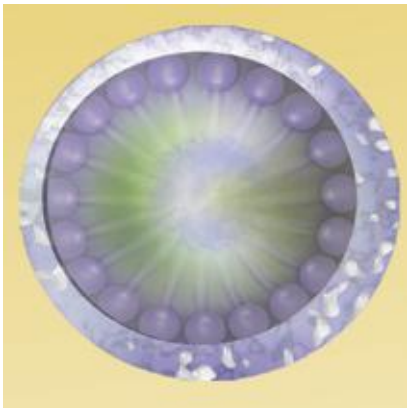


Figura 8 - Esquema de uma Micela polimérica ((http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

1.8.9. Nanotubos de carbono e fulerenos

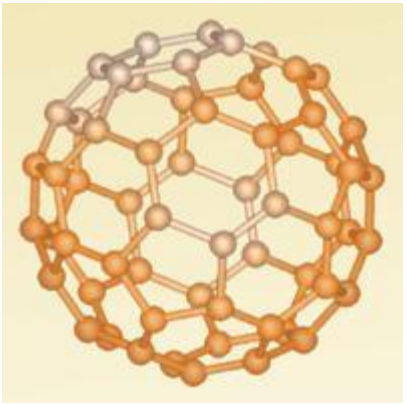


Figura 9 - Esquema de um nanotubo de carbono (http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas)

São compostos por unidades de carbono, tal como a grafite ou o diamante, mas têm uma arquitetura que lhes confere características especiais, como uma elevada resistência mecânica e também uma grande capacidade de transporte de temperatura e eletricidade.

1.9. Aplicações Biomédicas

1.9.1. Carreamento de drogas

O carreamento de drogas refere-se aos agentes farmacêuticos de interesse que são ocluídos ou fixados a uma matriz de polímero orgânico ou partículas inorgânicas e, nesse caso, a segurança e a eficácia das drogas podem ser grandemente melhoradas e novas terapias-alvo são possíveis (Mahmoudi et al., 2011). A estratégia para a entrega da

droga pode ser abordada por muitos métodos, desde a modificação química de drogas por meios (Chau et al., 2006) até por drogas encapsuladas em vesículas (Adams et al., 2003). As rotas de entrega também são uma questão importante para administração sistêmica de drogas devido à circulação sistêmica.

Dispositivos de entrega de drogas em nanoescala que são estímulo-dependentes podem responder dinamicamente a alterações no ambiente, tais como mudança de temperatura (Jeong et al., 1997), luz (Qiu, 2001), pH (Gupta et al., 2002), ultra-som (Mitragotri, 2005) ou campos magnéticos (Polyak e Friedman, 2009).

1.9.2. Hipertermia

A hipertermia é uma das abordagens promissoras na terapia do câncer. Vários métodos são empregados na hipertermia, tais como a utilização de água quente, aquecimento capacitivo e aquecimento por indução, entre outros. No entanto, o problema técnico inevitável com a hipertermia é a dificuldade do aquecimento uniforme apenas da região do tumor até a temperatura desejada sem danificar o tecido normal.

Alguns pesquisadores têm proposto o conceito de hipertermia "intracelular", e desenvolveram partículas submicrométricas magnéticas para induzir a hipertermia (Wada et al., 2001). Esta ideia baseia-se no princípio de que uma partícula magnética pode gerar calor por perda por histerese sob um campo magnético de alta frequência, como por exemplo, a 500 kHz (Stauffer et al., 1984).

As partículas administradas geralmente migram para sistemas reticuloendoteliais, como os macrófagos e as células de Kupffer do fígado, baço e gânglios linfáticos (Weinstosk e Brain, 1988). Os gânglios linfáticos são locais em que tumores metastáticos facilmente crescem. No entanto, a distribuição de partículas magnéticas é passiva e seu controle é muito difícil.

Em 1979, Gordon et al., propuseram o conceito de hipertermia intracelular utilizando nanopartículas de magnetita de dextrano. Eles administraram partículas magnéticas intravenosamente em carcinomas mamários de ratos Sprague-Dawley e mostraram que o aquecimento pelo campo magnético induzido ocorria em seus experimentos *in vivo*.

Em relação as propriedades importantes de partículas magnéticas para indução da hipertermia, pode-se citar: não toxicidade, biocompatibilidade, injetabilidade, alto nível de acumulação no tumor-alvo e absorção efetiva da energia do Campo Magnético Alternado (Hongo, 2002).

Na figura 10, o círculo sombreado no plano *xy* indica a projeção do tumor; *A* indica a direção da injeção das nanopartículas e *d* indica a direção da magnetização.

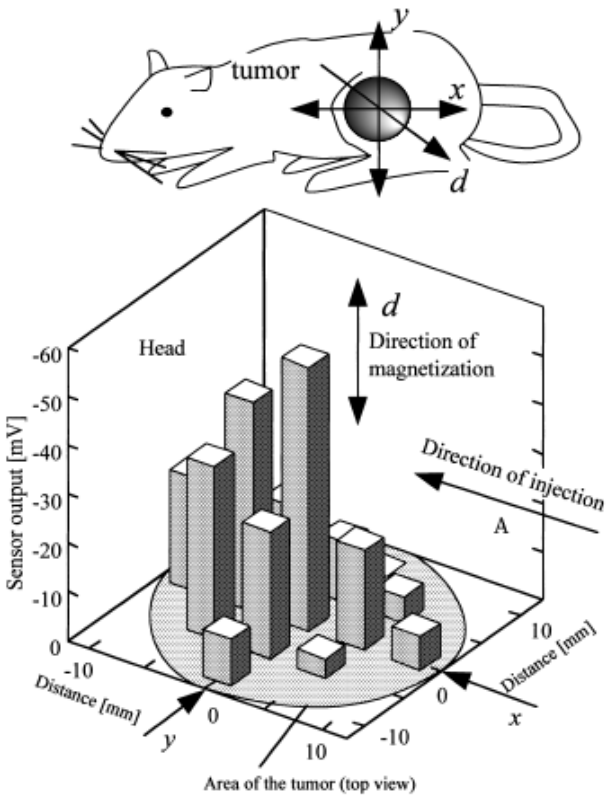


Figura 10 - Ilustração esquemática do sensor de campo magnético de um tumor subcutâneo num rato e a distribuição do campo magnético no tumor transplantado (Journal of Bioscience and Bioengineering - vol.94/2002)

1.9.3. Imagem e diagnóstico

A ressonância magnética oferece a vantagem de uma elevada resolução espacial das diferenças de contraste entre tecidos (Hongo, 2002).

Devido à função única desta modalidade de imagem, existe uma necessidade de desenvolver agentes de contraste efetivas que irão melhorar e alargar a sua utilidade de diagnóstico (Hongo; Matsumoto-cho, 2005). Quelante de íons paramagnéticos e ferromagnéticos e nanopartículas superparamagnéticas têm sido investigadas como agentes de contraste e utilizados no diagnóstico clínico (Hongo, 2002).

Shinkai et all. e Uchiyama et al., propuseram um método direto de detecção de nanopartículas magnéticas em diagnóstico de câncer. Eles desenvolveram um pequeno sensor altamente sensível e magnético, o sensor de impedância magnético, para a detecção de tecido tumoral que incopore partículas magnéticas.

Tentou-se detectar estas partículas em um glioma de rato, um tumor cerebral maligno, transplantado sob a pele da perna da cobaia (Shinkai et al., 1997). As nanopartículas magnéticas no tumor foram magnetizadas por um gerador de campo magnético estático em 1,8 T. A distribuição do campo destes compostos nanoestruturados foi detectada utilizando o sensor de imagem, além disso, a sua distribuição indicou que as nanopartículas foram localizadas apenas no tumor. Quando estes aparelhos estiverem disponíveis para uso clínico, o diagnóstico com alta sensibilidade de câncer metastático será possível.

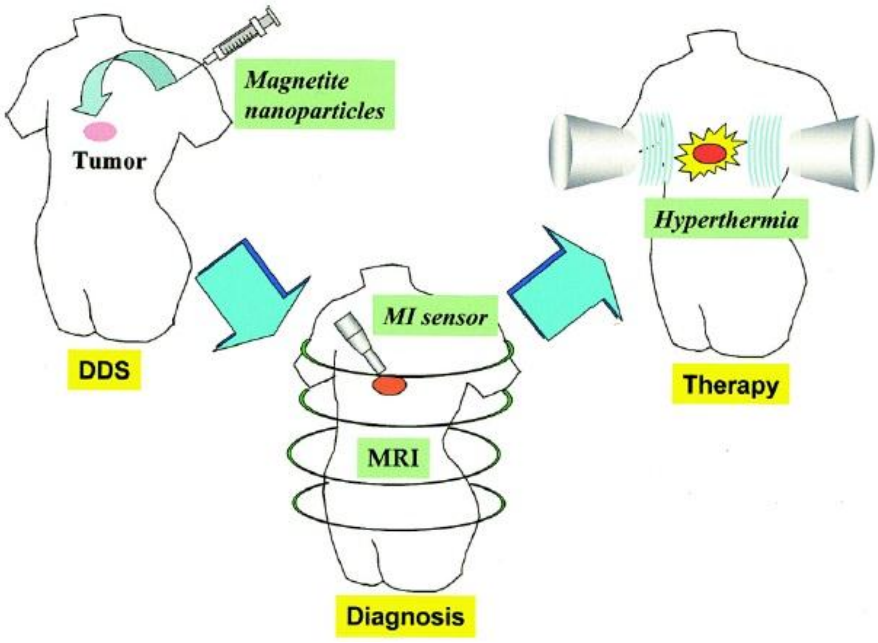


Figura 11 - ilustração esquemática de estratégias terapêuticas usando nanopartículas magnéticas: diagnóstico e hipertermia (Journal of Bioscience and Bioengineering – vol 100/2005)

1.9.4. Engenharia de Tecidos com o uso de nanopartículas magnéticas

Ito at al., desenvolveram uma nova metodologia para a construção de um tecido 3D semelhante aos tecidos in vivo utilizando uma força magnética e nanopartículas funcionalizadas. Esta tecnologia está atualmente sendo aplicada a vários tipos de células, tais como células tronco mesenquimais humanas e células do epitélio pigmentar da retina, sugerindo que estas nanopartículas funcionalizadas são uma abordagem promissora para a engenharia de tecidos.

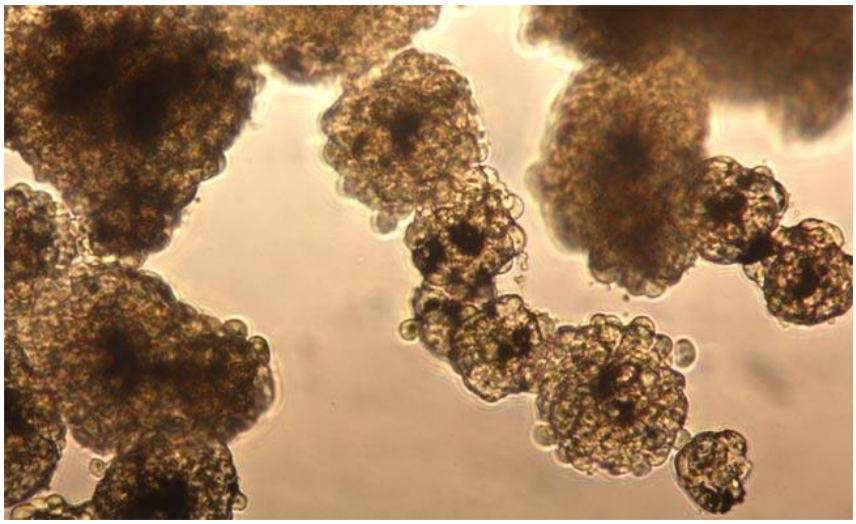


Figura 12 - Cultura de célula em 3D crescendo com levitação magnética (G. Souza, Nano3D Biosciences Inc.)

1.9.5. Separação magnética para purificação e imunoensaio

A separação é a mais documentada e, atualmente, a aplicação mais útil de nanopartículas magnéticas. Muitas delas têm sido desenvolvidas como transportadores magnéticos em processos de separação, incluindo purificação e imunoensaio. Ligantes específicos são ligados a partículas magnéticas do mesmo modo como a outros transportadores que compreendem uma matriz de polímero.
Por exemplo: na remoção de uma população específica de células a partir do sangue, outras células sanguíneas dominantes interferem na cromatografia em coluna convencional de imunoafinidade. Tem sido proposta, na purificação de sangue, a eliminação de citocinas específicas por partículas magnéticas, tais como interleucina-1 ou fator de necrose tumoral - os mediadores patogênicos principais no choque séptico e na falência múltipla de órgaos.

As nanopartículas também são usadas em imunoensaios, os quais são utilizados, por exemplo, na detecção de vírus ou na dosagem de hormônios. Logo, podem ser úteis para encurtar tanto a adsorção tanto os passos de separação.

1.10. LNCaP

A linhagem de células LNCaP foi estabelecida a partir de uma lesão metastática de adenocarcinoma da próstata de homem. As células LNCaP crescem prontamente in vitro (até 8 x 10^5 células /cm^2, tempo de duplicação de 60 horas), são altamente resistentes ao

interferon do fibroblasto humano e é aneuploide (de 76-91 cromossomos) (Horoszewicz et al., 1983).

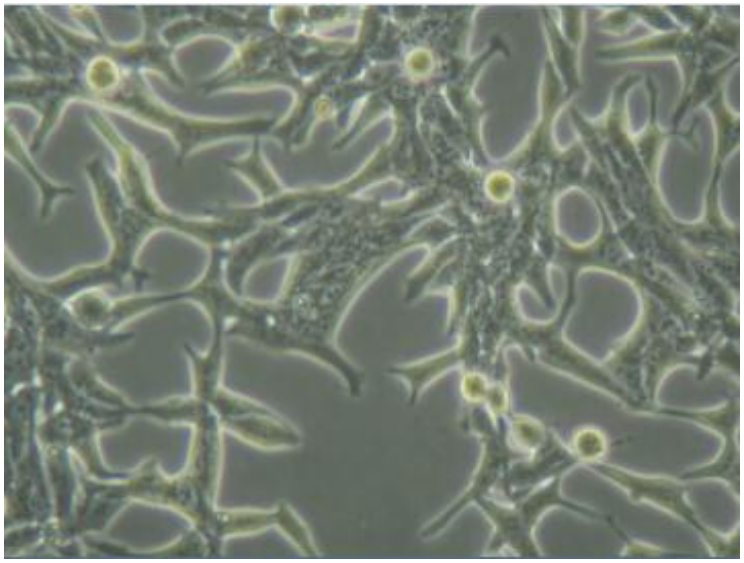


Figura 13 - Células LNCaP - 20x /zoom 1.5 (foto pelo autor)

2. Justificativa

Obtendo-se controle sobre nanopartículas podemos aumentar a sua utilização, reduzindo os seus efeitos prejudiciais e permitindo-lhes assim ser utilizadas em práticas médicas, tais como na cura do câncer de próstata. Apenas com mais pesquisa e utilização de evidências científicas, ferramentas de microscopia e outro métodos de análises, podemos descobrir as vantagens ou desvantagens de suas aplicações. Avaliar a citotoxidade de nanopartículas de manganês em culturas de células tumorais prostáticas é apenas uma forma básica de identificar possíveis propriedades antitumorais destes compostos.

3. Objetivo Geral

Avaliar a citotoxidade de nanopartículas de Manganês sobre a viabilidade de cultura de células tumorais prostáticas da linhagem LNCaP.

4. Objetivos Específicos

1) Estabelecimento de banco de células da linhagem LNCaP.

2) Cultivo e expansão de células LNCaP.

3) Tratamento das culturas com as nanopartículas e análise de viabilidade por azul de Tripan após 24 e 48 horas.

5. Material e Métodos

5.1. Obtenção das Nanopartículas

As Nanopartículas foram obtidas com o Instituto de Química da Universidade Federal da Grande Dourados, onde foram sintetizadas utilizando-se do método de Pechini.

5.1.1. Técnica de Pechini para a síntese de óxidos metálicos nano estruturados

O método dos precursores poliméricos ou método "Pechini" é utilizado na síntese de diversos óxidos policatiônicos. O método é baseado na formação de quelatos entre os cátions metálicos (dissolvidos como sais em solução aquosa) com um ácido hidroxicarboxilico, como o ácido cítrico. Após a síntese da solução de citrato (a), é adicionado um poliálcool, como o etileno glicol para promover a polimerização pela reação de poliesterificação (b) entre o citrato metálico e o etileno glicol, conforme ilustra o esquema na Figura.

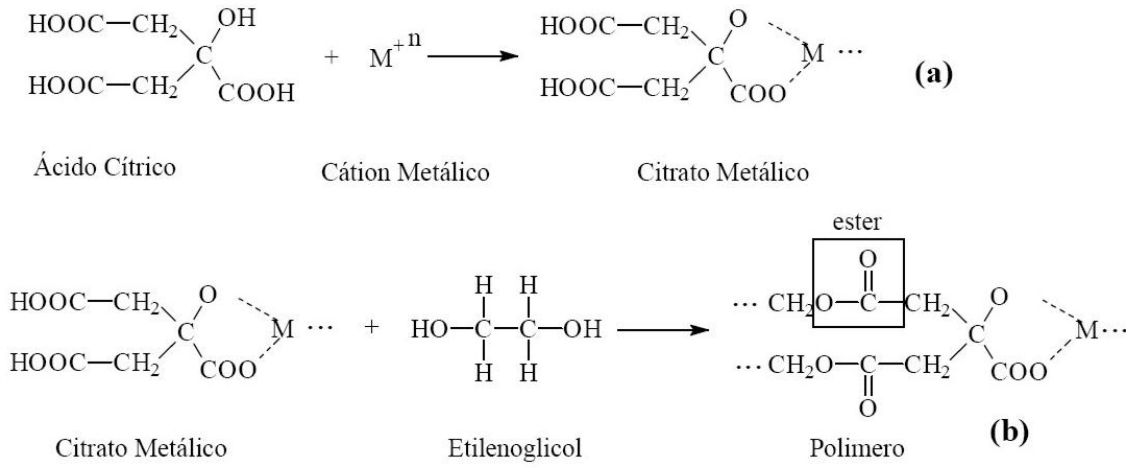


Figura 14 - Esquema das reações químicas para a síntese de óxidos metálicos nanoestrturados (esquema fornecido pelo Prof. Drº. Andrelson Rinaldi -UFGD)

Os precursores metálicos são combinados quimicamente para formar os compostos na estequiometria desejada durante a pirólise. Durante o processo forma-se um polímero viscoso, e através de tratamentos térmicos ocorre a remoção do excesso de solvente. Posteriormente, ocorre um segundo tratamento térmico para que ocorra a remoção total do material carbônico, obtendo-se a fase cerâmica desejada. As temperaturas de processamento do precursor tanto na retirada de excesso de solvente como na retirada de material carbônico deve ser previamente avaliada, pois diferentes temperaturas acarretam a formação de fases distintas e materiais com tamanho de partículas diferenciadas.

5.2. Descongelamento, Expansão e Congelamento de Células da Linhagem LNCaP Para Experimentos e para Estabelecimento de Banco de Células

5.2.1. Descongelamento celular

O descongelamento ocorre de forma rápida. Simplesmente retirou-se a ampola do freezer -80^{o} C e colocou-se em banho-maria a 37º C imediatamente. Apesar de todo o cuidado durante o congelamento, o processo de criopreservação é danoso para as células e, portanto, após o seu congelamento as células foram colocadas em meio de cultivo RPMI com uma concentração de 10% de soro fetal bovino.

5.2.2. Propagação da cultura celular

Para manter as células em cultura é necessário utilizar técnicas básicas que evitem a morte celular dentro da garrafa ou placas de cultivo. As células normalmente possuem inibição por contato e, quando em uma garrafa (ou no caso deste experimento, uma placa) de cultivo, se a quantidade de células exceder um número tal que impossibilite o crescimento normal da monocamada, as células se inibirão e haverá morte. Pode ocorrer sobreposição e consequente formação de uma massa celular, como mostra a foto seguinte de um dos poços da cultura.

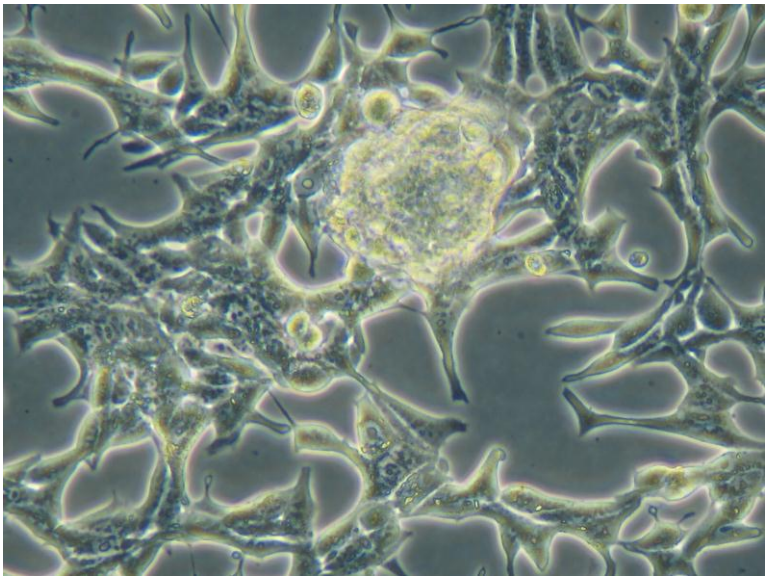


Figura 15 - Células LNCaP - 20x - zoom 1.5 (foto pelo autor)

De qualquer forma, é extremamente importante que se retire quantidades de células periodicamente da garrafa de modo a manter a população sempre com um número ideal.

O processo de renovação de células de uma garrafa para outra é chamado passagem. O número de passagens se refere ao número de vezes que essa cultura foi subcultivada. Muitas linhagens contínuas são capazes de manter as características iniciais do tecido original com algumas passagens, enquanto as células transformadas não mantêm as características originais e são capazes de permanecer em cultura por um grande número passagens (chegando até virtualmente ao infinito número de passagens).

As células aderentes, tais como a linhagem LNCaP, possuem um método específico para efetuar a sua passagem, por se encontrarem aderidas ao fundo da garrafa de cultivo. Para que as células aderentes possam se ligar ao fundo da garrafa é necessário que o fundo tenha uma carga negativa. Superfícies como vidro e metal, que possuem uma carga líquida negativa, são excelentes superfícies para a adesão celular.

Plásticos são muito utilizados em cultivo celular, mas para que o plástico desenvolva carga negativa é necessário um tratamento prévio com agentes químicos, como agentes oxidantes, ou físicos, como a luz ultravioleta e a radiação. A carga negativa é necessária, pois a adesão celular ocorre por meio de forças eletrostáticas e da interação dessas cargas com glicoproteínas de adesão e com cátions divalentes, como Ca^{+2} e Mg^{+2}. Esta interação, então, desencadeia uma sinalização intracitoplasmática que acarretará na produção e liberação de proteínas da matriz extracelular pela própria célula, onde a célula irá aderir, espraiar e iniciar sua proliferação.

A matriz extracelular de um tecido é uma mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, lipídeos, glicolipídeos e mucopolissacarídeos. As macromoléculas que

constituem a matriz são secretadas por células locais, especialmente fibroblastos. Essa matriz contém três importantes proteínas fibrosas: colágeno, elastina e fibronectina contidas em um gel hidratado formado por uma rede de cadeias de glicosaminoglicanos. Todas essas macromoléculas são secretadas localmente por células em contato com a matriz. Linhagens macrofágicas são uma exceção, pois sua adesão é mediada por proteoglicanos, um processo diferente do descrito.

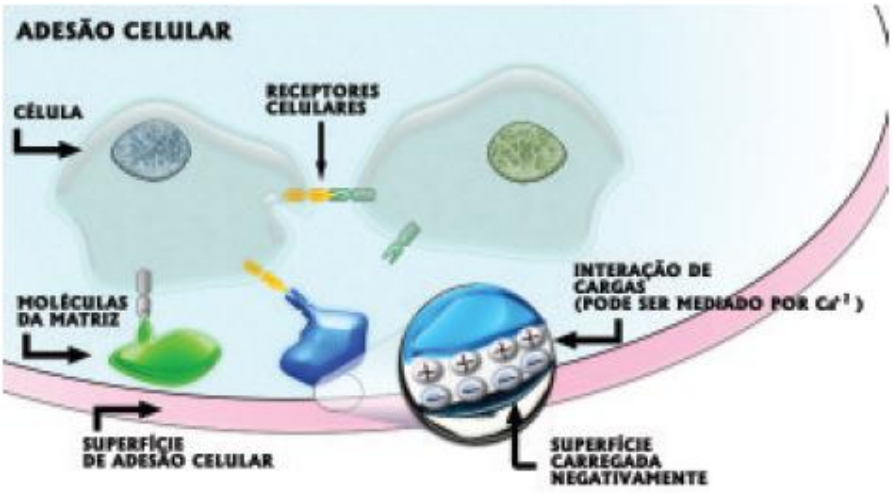


Figura 16- Adesão Celular medida por proteínas de adesão (livro: Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde/capítulo 5)

As células foram cultivadas em placas de 12 poços até atingirem uma confluência aproximada de 90%, quando foram feitas desagregações enzimáticas – a tripsinização. Foi utilizado 1 ml de tripsina em cada poço. A tripsina hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem, éster e amida. Essa reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos receptores da superfície celular, ligados ao citoesqueleto e à matriz, obrigando as células a rearranjarem seu citoesqueleto.

Devido à inespecificidade da enzima, não se deve deixar a célula muito tempo em sua presença, para não haver lise celular. Neste caso, foram deixadas as culturas de células por 5 minutos, sob efeito da tripsina, em estufa a 95 % de umidade e 5% de concentração de CO_2. Em seguida, foi acrescentado o meio de cultura RPMI a 10% de soro fetal bovino (para inibir o efeito da tripsina) e os tubos colocados para centrifugar por 10 minutos a 1200 RPM. Em seguida descartou-se o sobrenadante e foi acrescentado 6 ml de meio de cultura para replaquear as células.

5.2.3. Estabelecimento de banco de células: congelamento celular

Manter células congeladas significa atrasar, em anos, quaisquer alterações que poderiam ocorrer quando em cultura. Tais alterações são dispensáveis para os laboratórios de cultura de células e os grandes bancos mundiais fornecedores de linhagens.

As células das culturas foram congeladas em freezer a -80º C. O procedimento mais utilizado no congelamento celular é o lento. Nesse processo há diminuição da temperatura, vagarosamente acarretando a solidificação da água que se encontra no meio de cultura. Isso aumenta a concentração de soluto fora da célula e faz com que a água saia através do processo de osmose. A saída da água da célula faz com que ela murche.

Assim, à medida que a água sai, ela se congela no exterior, deixando a célula desidratada. Nesse processo, a água do meio externo é congelada formando cristais que podem se reorganizar no exterior da célula. A formação de cristais e reorganização dentro da célula leva ao rompimento da membrana celular, matando as células. Isso é impedido com o processo lento de congelamento.

Crioprotetores são substâncias que, sob diferentes mecanismos moleculares, tornam a membrana das células protegidas dos cristais. Neste experimento, o DMSO foi o crioprotetor usado, a 10% de soro fetal bovino.

O DMSO é uma molécula sem carga real, mas que possui um momento dipolar. Sua ação está relacionada à interação da molécula com as membranas fosfolipídicas e com o ambiente externo à membrana. Assim, durante o congelamento, a molécula impede fases de transmissão dos lipídeos de membrana que chegam a promover a fusão de várias membranas.

O DMSO é tóxico para as células e por isso é utilizado somente no momento do congelamento, sendo indispensável sua retirada do meio após o descongelamento da cultura.

5.3. Tratamento das Culturas Celulares com os Compostos Nanoestruturados

Em cada poço das placas 12 *wells* foi pipetado 1 ml de uma mistura de RPMI + nanopartícula correspondente (solução de 6 ml de meio + 240 µL de nanocomposto estruturado). As nanopartículas vieram em concentração de 0,2 mg/mL.

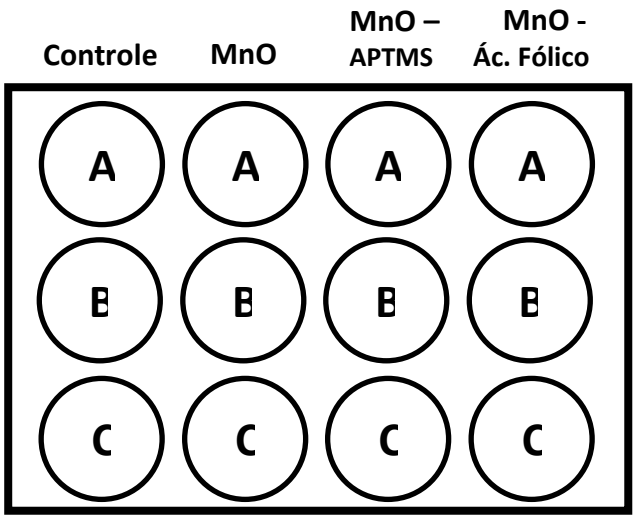


Figura 17 - Esquema da placa de 12 poços mostrando como foram feitos os tratamentos em triplicata

Por não se ter conhecimento prévio que as nanopartículas não foram preparadas em ambiente estéril, os tratamentos das células com os respectivos compostos causaram contaminação nos meios de cultura, tendo que descarta-los e iniciar os experimentos novamente, visto que fungos e bactérias competem pelos nutrientes do meio fazendo com que as células morram. Além disso, metabolizam o meio de forma rápida modificando o pH ideal de cultivo.

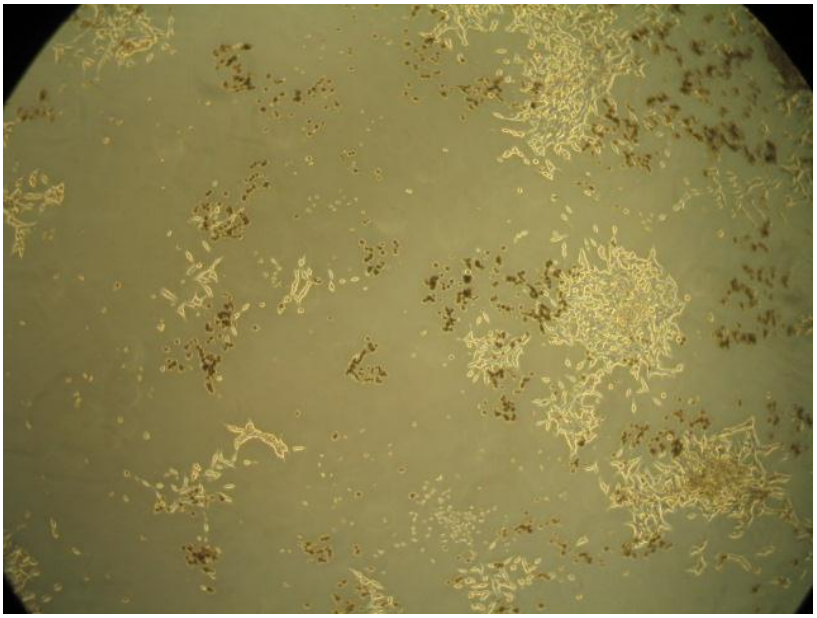


Figura 18 - Células LNCaP contaminadas após o tratamento com as nanopartículas sem serem filtradas com o filtro *millipore* 0.22 micrômetros

Nos experimentos posteriores, as soluções preparadas (de 6 ml de meio + 240 µL de nanocomposto estruturado) foram filtradas em filtro de 0,22 µm, para reter qualquer tipo de contaminação preexistente.

5.4. Análise de Viabilidade por Azul de Tripan em Contador Automático e Análise por Microscopia Invertida

Figura 19 - Contador automático Countess™ e Microscópio de inversão Zeiss Axiovert 200 (fotos pelo autor)

Para se fazer as análises com o contador automático, pipetou-se 1 µL da amostra desejada e 1 µL de azul de Tripan na câmara descartável de contagem de células, de uso próprio do aparelho. O volume total de células contadas é a mesma contagem de um hemocímetro padrão.

As análises morfológicas foram feitas com o Microscópio de inversão Zeiss Axiovert 200, o qual é usado no Laboratório de Engenharia Celular.

5.4.1 Análises após 24 horas de tratamento

Amostra	Controle	MnO	MnO – APTMS	MnO – Ácido Fólico
A	81% e $5,2x10^5$	67% e $5,7x10^5$	69% e $6,9x10^5$	90% e $7,1x10^5$
B	78% e $6,6x10^5$	78% e $4,7x10^5$	74% e $6,4x10^5$	92% e $6,6x10^5$
C	80% e $9,6x10^5$	68% e $5,4x10^5$	68% e $7,5x10^5$	89% e $6,2x10^5$

Tabela 1- Viabilidade celular em porcentagem e número de células vivas/ml, respectivamente.

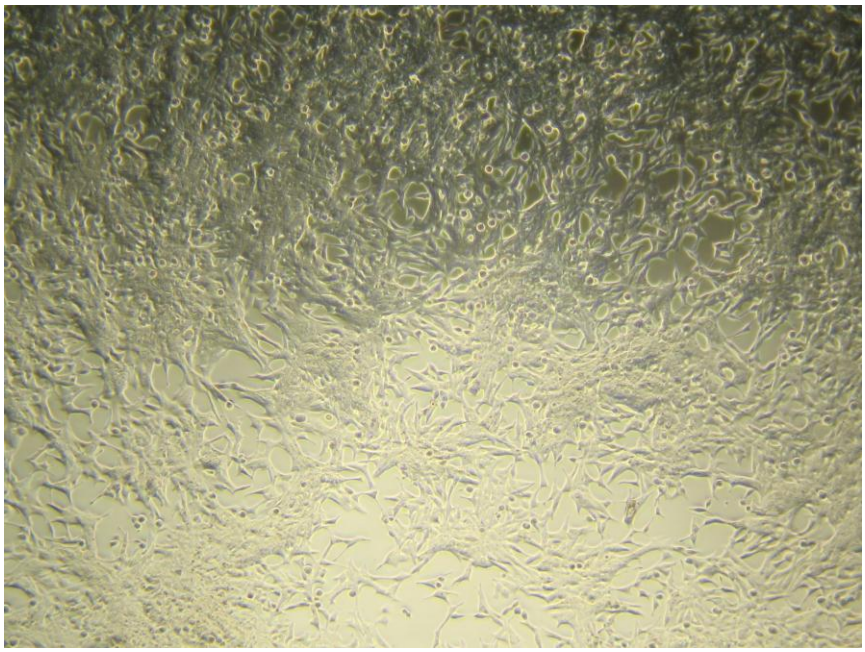


Figura 20 - Controle 24 horas - aumento 5x

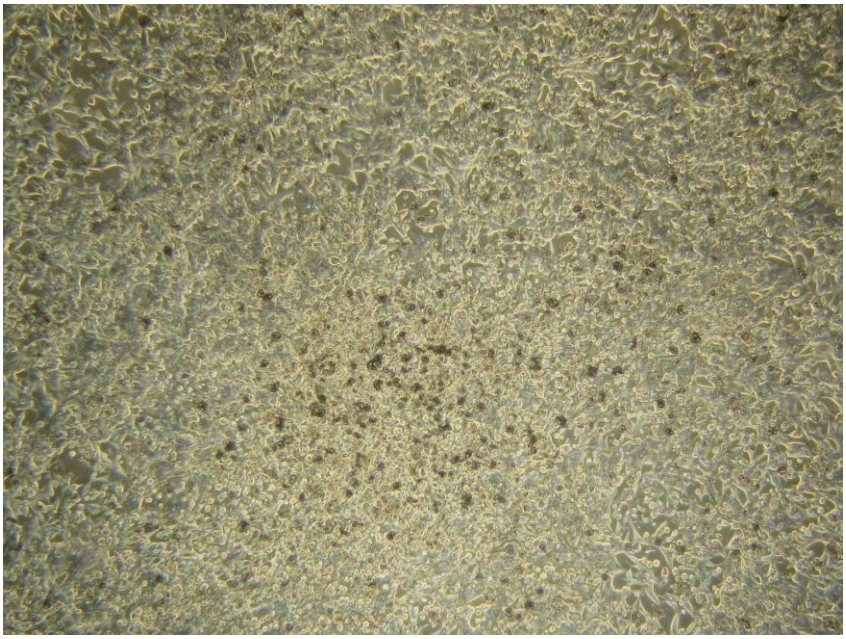


Figura 21 - Tratamento com MnO após 24 horas - aumento 5x

Figura 22 - Tratamento com MnO - APTMS após 24 horas - aumento de 5x

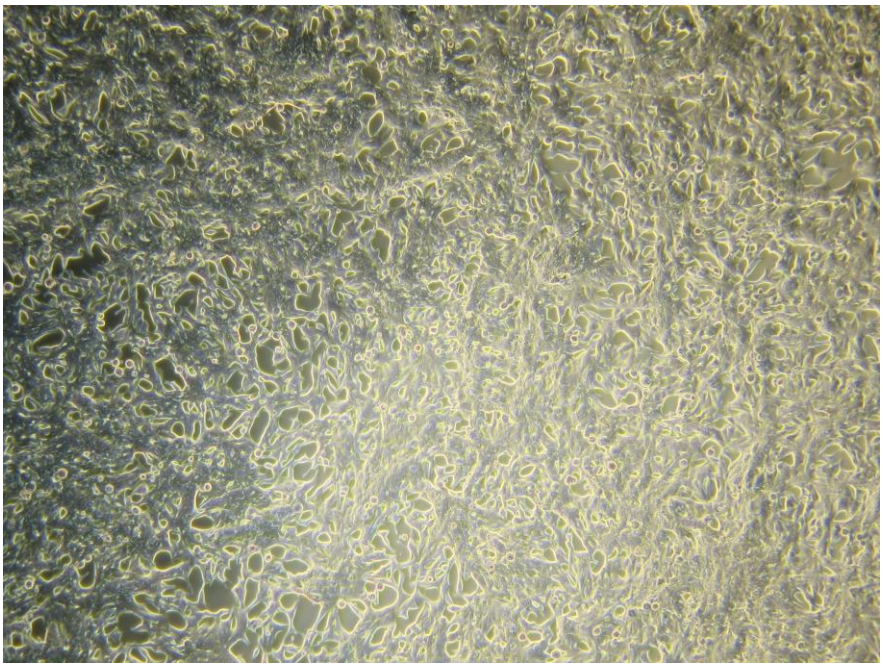


Figura 23 - Tratamento com MnO - Ácido Fólico após 24 horas - aumento 5x

5.4.2 Análises após 48 horas de tratamento

Amostra	Controle	MnO	MnO – APTMS	MnO – Ácido Fólico
A	81% e $1,1x10^6$	57% e $6,1x10^5$	86% e $7,4x10^5$	91% e $4,3x10^5$
B	84% e $1x10^6$	72% e $7,1x10^5$	75% e $8x10^5$	91% e $8x10^5$
C	91% e $7,6\ x10^5$	72% e $5,5x10^5$	93% e $5,7x10^5$	91% e $5,5x10^5$

Tabela 2 - Viabilidade celular em porcentagem e número de células vivas/ml, respectivamente.

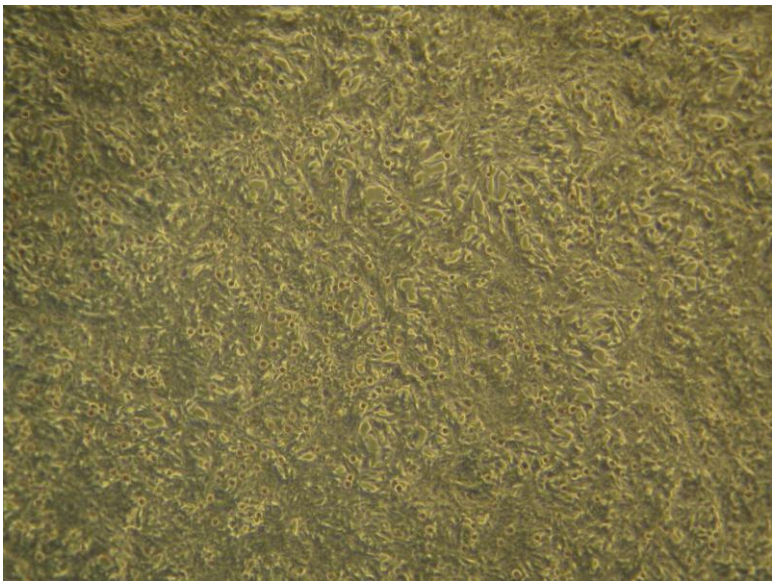


Figura 24 - Controle 48 horas - aumento 10x

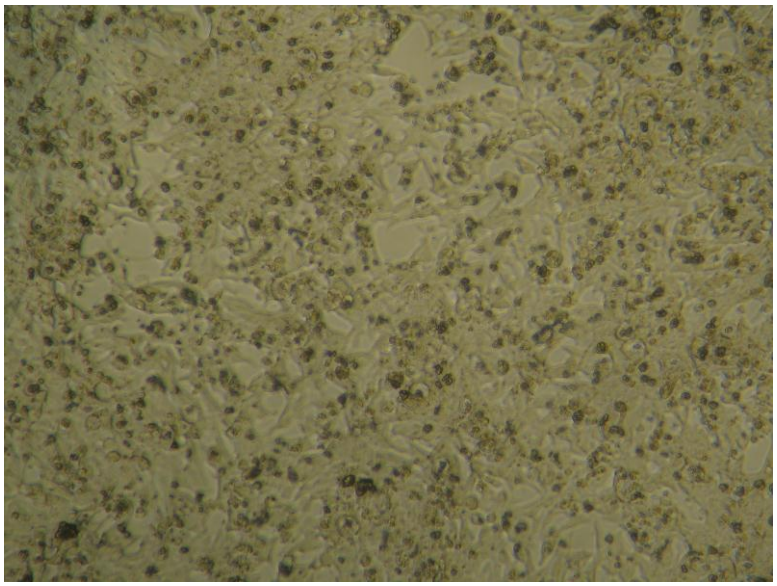


Figura 25 - Tratamento com MnO após 48 horas - aumento 10x

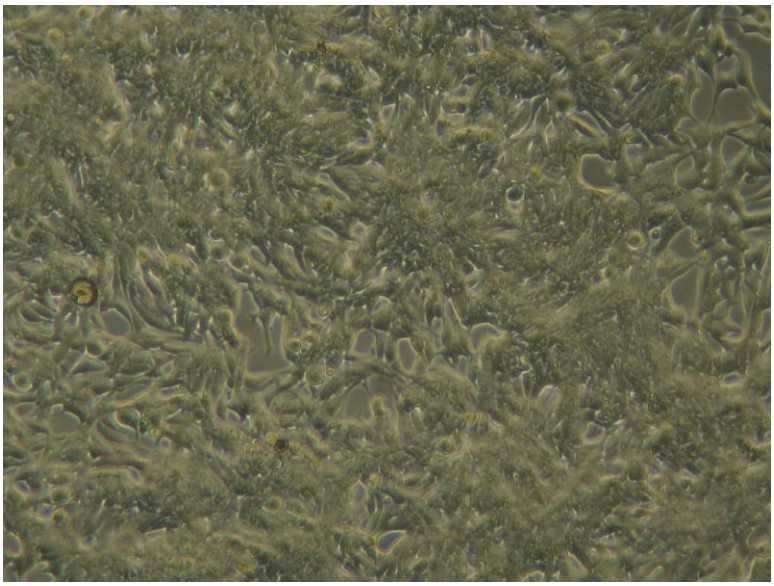


Figura 26 - Tratamento com MnO - APTMS após 48 horas - aumento 10x

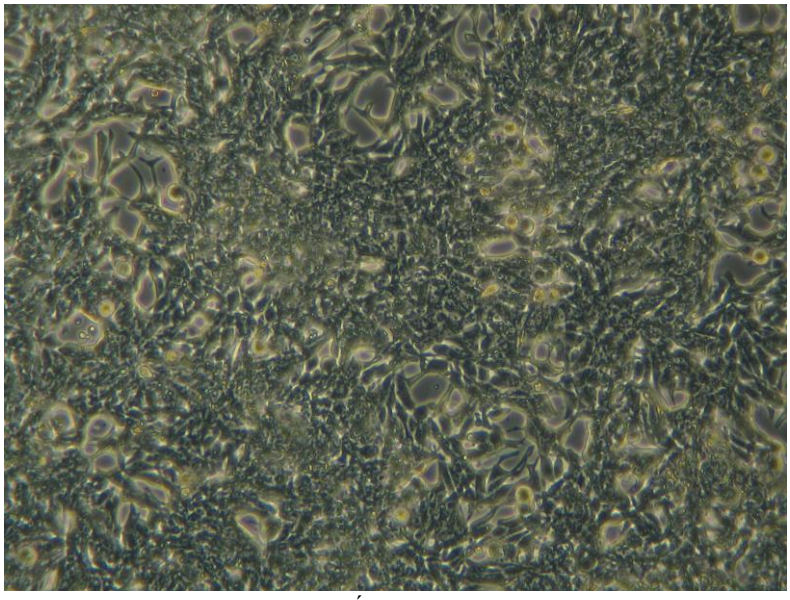


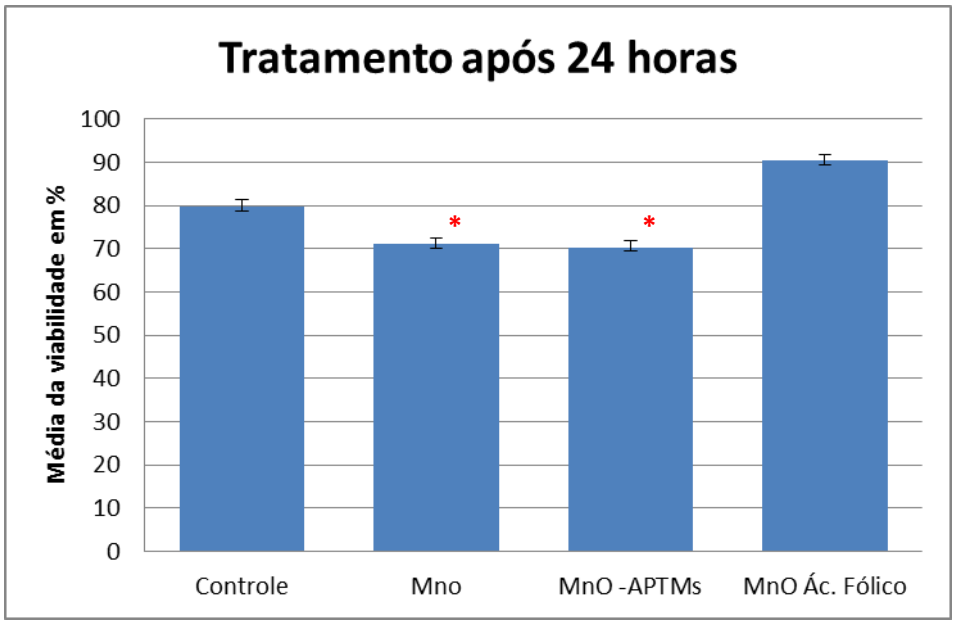
Figura 27 - Tratamento com MnO - Ácido Fólico após 48 horas - aumento de 10x

6. Resultados e Discussão

Para determinar o grau de citotoxicidade das nanopartículas, foram feitos um grupo controle e três grupos de tratamento com cada nanocomposto correspondente, conforme descrito na metodologia, com concentrações de 0,2 mg/mL, sendo usadas placas de 12 poços, todos em triplicata.

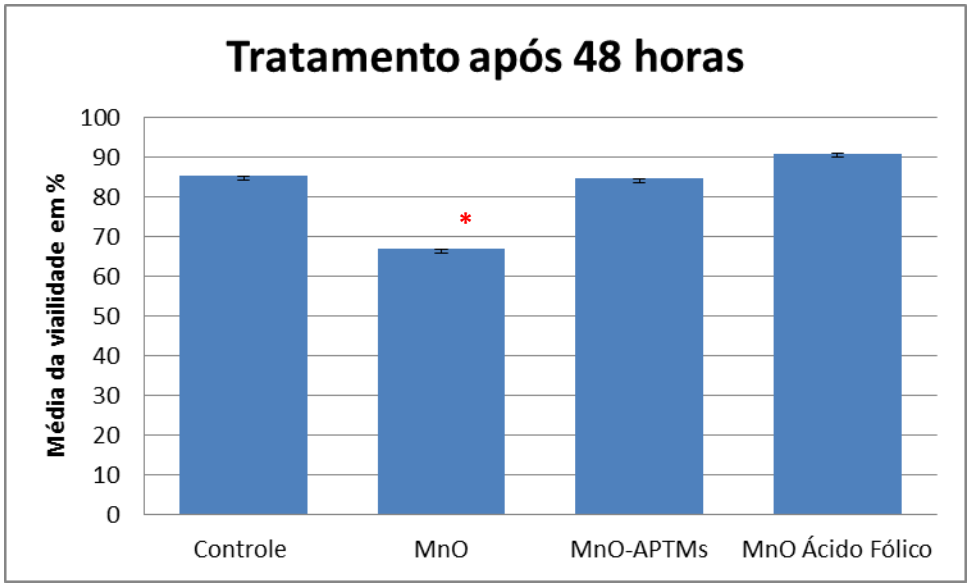
Após o tratamento de 24h e 48h com as nanopartículas, foi quantificado o número de células vivas e a viabilidade celular em cada poço. Os resultados são expressos em células vivas/ml e em porcentagem, respectivamente.

No tratamento de 24 horas, ao se fazer uma análise morfológica, podemos observar um nítido índice de apoptose com os tratamentos de MnO. Ao avaliar o grau de citotoxicidade, podemos confirmar que este grupo foi significamente anti-proliferativo ($p < 0,001$ com um intervalo de confiança de 95%) ao se comparar com o grupo Controle. Há diferença relevante também ao se comparar o grupo controle com o tratamento MnO-APTMS.



* *Resultados significativos, para p< 0,05*

No tratamento de 48 horas notam-se também claros sinais de apoptose no grupo MnO (com grau de citotoxicidade significamente importante, com $p < 0,001$, intervalo de confiança de 95%). Porém, neste caso, após as 48 horas, o grupo MnO-APTMS já não é mais antiproliferativo, notando-se que as células voltam a se expandir normalmente.



* *Resultado significativo, para* $p < 0,05$

O próximo passo seria determinar o mecanismo de morte celular quantificando por *Western Blotting* as principais proteínas envolvidas no processo de apoptose, já que estas nanopartículas possuem propriedades magnéticas e, portanto, não podem ser usadas em testes com o Citômetro de Fluxo. As células dos experimentos foram congeladas para estas futuras análises.

Cabe ressaltar que, para uso clínico, não é suficiente o fato de nanopartículas possuírem um efeito antiproliferativo sobre células tumorais *in vitro*. Pesquisas para se avaliar os efeitos fisiológicos e tóxicos ao organismo como um todo são necessários caso se deseje fazer uso de futuras aplicações terapêuticas..

8. Referências

Journal of Internal Medicine, 2010; 267: 89–105 - Department of Environmental Medicine/University of Rochester

LAURENT, Sophie; MAHMOUDI, Morteza. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer.

[ESF] European Science Foundation. Nanomedicine – An ESF – European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look Report. Strasbourg cedex, France: ESF, 2004.

Publicy Available Specification 71

Ai et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs, 2011

Schlesinger RB. Toxicological evidence for health effects from inhaled particulate pollution: does it support the human experience? *Inhal Toxicol*. 1995;7:99–109.

Linkov I, Satterstrom FK, Corey LM. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine: Nanotech Bio and Med*. 2008;4:167–171.

Singh S, Shi T, Duffin R, et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxico Appl Pharmacol*. 2007;222(2): 141–151

Nanomedicina. Disponível em: http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanoparticulas/ >. acesso em 18/07/2012

Amiri H, Mahmoudi M, Lascialfari A. Superparamagnetic colloidal nanocrystal clusters coated with polyethylene glycol fumarate: A possible novel theranostic agent. Nanoscale 2011; 3: 1022-30.

Chau Y, Dang NM, Tan FE, Langer R. Investigation of targeting mechanism of new dextranpeptide- methotrexate conjugates using biodistribution study in matrix-metalloproteinase overexpressing tumor xenograft model. Journal of Pharmaceutical Sciences 2006; 95: 542-51.

Adams ML, Lavasanifar A, Kwon GS. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. Journal of Pharmaceutical Sciences 2003; 92: 1343-55

Jeong B, Bae YH, Lee DS, Kim SW. Biodegradable block copolymers as injectable drug delivery systems. Nature 1997; 388: 860-2.

Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2001; 53: 321-39.

Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. Drug Discovery Today 2002; 7: 569-79.

Mitragotri S. Innovation - Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. Nature Reviews Drug Discovery 2005; 4: 255-60

Polyak B, Friedman G. Magnetic targeting for site-specific drug delivery: applications and clinical potential. Expert Opinion on Drug Delivery 2009; 6: 53-70.

Wada, S.,Yue, L.,Tazawa., Furuta, I., Nagae, H., Takemori, S., Minamimura, T.: New local hyperthermia using dextran magnetite complex (DM) for oral cavity: experimental study in normal hamster tongue. Oral Dis., 7, 192-195 (2001)

Staufer,P.R., Cetas, T.C., Fletcher, A.A., DeYoung, D.W., Dewhirst, M.W., Oleson, J.R., Roemer, R.B.: Observations on the use of ferromagnetic implants for inducing hyperthermia. IEEE Trans. Biomed. Eng., 31, 76-90 (1984)

Weinstock, S.B. e Brain, J.D.: Comparison of particle clearance and macrophage phagosomal motion in liver and lungs of rats. J. Appl. Phys., 65, 1881-1820 (1988).

Gordon, R.T., Hines, J.R., Gordon, D: Intracellular hyperthermia – a biophysical approach to cancer via intracellular temperature and biophysical alterations. Med. Hypothesis, 5, 83-102 (1979).

Hongo, Bunkyo-ku. Functional Magnetic Particles for Medical Application (2002).

Shinkai, M., Ohshima, A., Yanase, M., Uchiyama, T., Mohri, K., Wakabayashi, T., Yoshida, J., Honda, H., Kobayashi,T.: Development of novel magnetic sensing for brain lesion using functional magnetic particles (1998)

Uchiyama, T., Mohri, K., Shinkay, M., Ohshima, A., Honda, H., Kobayashi, T., Wakabayashi, T., Yoshida, J.: Basic Study for brain tumor position sensing using amorphous wire MI micro magnetic senser. Trans. IEE, Jpn., 119-C, 545-553 (1999)

Julius S. Horoszewicz, Susan S. Leong, Elzbieta Kawinski, James P. Karr, Hannah Rosenthal, T. Ming Chu, Edwin A. Mirand, and Gerald P. Murphy. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma (1983).

Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde, Capítulo 5: Cultivo Celular.