

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E AÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRITA DE COBALTO (CoFe_2O_4) EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA (MCF-7)

Virgínia Santos Chagas (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager (Orientador), e-mail: lautenschlager@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Básicas
Saúde/Maringá, PR

Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Câncer de mama, nanopartículas, citotoxicidade.

Resumo:

As nanopartículas magnéticas vêm se tornando uma alternativa interessante, contrapondo o tratamento convencional do câncer. No entanto, poucos estudos são relatados envolvendo sua atividade biológica frente ao câncer de mama. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico e o mecanismo de ação de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) sobre células de adenocarcinoma de mama (MCF-7). Para isto, foram realizados ensaios de citotoxicidade celular *in vitro* das MNPs em células tumorais MCF-7, pelo método de MTT. Os resultados mostraram que as nanopartículas foram citotóxicas para a célula em ambos os períodos de tratamento realizados.

Introdução

O câncer tem se tornado uma das maiores causas de morte nos últimos anos, sendo o câncer de mama o segundo tipo de câncer que mais comumente acomete mulheres (29,5%) no Brasil (INCA). Uma das principais características dessa patologia é a presença de alterações genéticas nas células. Essas alterações podem ser causadas por fatores internos, relacionados à genética, e fatores externos, isto é, causados pelo ambiente no qual a doente fora exposta (AMENDOLA; AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

Têm se investido muito em nanotecnologias a fim de alcançar terapêuticas mais eficazes para estas neoplasias. Nas últimas décadas, a aplicação de nanopartículas magnéticas (MNPs) em tratamentos e diagnóstico de outros cânceres tem sido extensivamente explorada (PAŠUKONIENE et al., 2014). No âmbito da nanotecnologia, têm-se o óxido de cobalto de ferro (CoFe_2O_4), uma das nanopartículas magnéticas mais exploradas, pois apresenta alta estabilidade química, características e propriedades magnéticas sintonizáveis, potencial de geração de calor, e ainda trata-se de uma nanotecnologia rentável (AHAMED et al., 2016; SRINIVASAN et al., 2018).

Por apresentar como propriedade a geração de calor, estas MNPs, quando submetidas a vibrações, podem gerar hipertermia, causando a morte celular. Desse modo, esta pode se tornar uma potencial alternativa para substituir ou agregar ao tratamento convencional do câncer (YALLAPU et al., 2011). Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e ação de nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) em células de adenocarcinoma de mama (MCF-7).

Materiais e métodos

NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de ferrita de cobalto (NPMag) foram cedidas pelo Professor Doutor Luiz Fernando Cótica do Grupo de Desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

LINHAGEM CELULAR

A linhagem celular de adenocarcinoma de mama, MCF-7 livres de contaminação por micoplasma, foram cultivadas em frascos de cultura contendo meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10% de SFB, 5000 U/ml de penicilina e 5 mg/ml de estreptomicina) e mantidas em incubadora de CO_2 (5%), com umidade de 95%, à 37°C. O cultivo celular foi acompanhado diariamente em microscópio invertido (Olympus®, modelo CKX 41), e o meio trocado quando observado pH ácido. Após a formação da monocamada celular as células foram tripsinizadas por 1 min, ressuspensas em meio DMEM contendo 10% de SFB e transferidas para novas garrafas.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços com concentração de $2,5 \times 10^6$ céls/ml, após isso, foram tratadas com as MNPs nas concentrações de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Então, a monocamada de MCF-7 foi lavada com PBS e incubada durante 4 horas com 50 μL de MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio formazam; 2 mg/mL). Após o período de incubação, foram adicionados 150 μL de DMSO, e a absorbância foi lida num leitor de microplacas (BIO-TEK Power Wave XS) a 570 nm. A percentagem de células viáveis foi calculada em comparação com células não tratadas. Finalmente, a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) foi determinada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) TOTAIS

As espécies reativas de oxigênio (ERO) totais foram detectadas usando a sonda fluorescente 2', diacetato de 7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA, Molecular Probes, Leiden, Holanda). Este é um composto estável que se difunde facilmente na célula e é hidrolisado por esterase intracelular para produzir DCFH (2, 7 diclorofluoresceína), um composto não

fluorescente. Em seguida, na presença de ERO o DCFH é oxidado para um composto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF). A detecção de DCF está proporcionalmente relacionada à quantidade de ROS gerada dentro da célula (ARANDA et al., 2013). As células MCF-7 foram semeadas em placas pretas de 96 poços a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/mL, mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h. Após lavagem com PBS, foram tratadas com as MNPs, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6.25 µg/mL e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 horas. Após 48 h de incubação, as células foram marcadas com 5 µM de H₂DCFDA a 37 °C durante 30 min no escuro e depois lavadas uma vez com PBS. Os sinais foram então lidos em excitação 485 nm/emissão 535 nm usando um espectrofluorímetro (VICTORTM X3; PerkinElmer).

Resultados e Discussão

Foi realizada a manutenção da cultura celular das células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) ao longo de toda a pesquisa. A avaliação do efeito citotóxico *in vitro* das nanopartículas de CoFe₂O₄ em células MCF-7 evidenciou uma citotoxicidade significativa na concentração de 100 µg/mL no tratamento de 24h (Figura 1A). Em concentrações maiores, essa toxicidade celular provavelmente seria ainda mais expressiva, enquanto que, no tratamento de 48h, essa significância foi observada nas concentrações superiores à 50 µg/mL (Figura 1B). Desta forma, as nanopartículas apresentaram um resultado promissor, revelando um potencial anti-tumoral frente as células MCF-7.

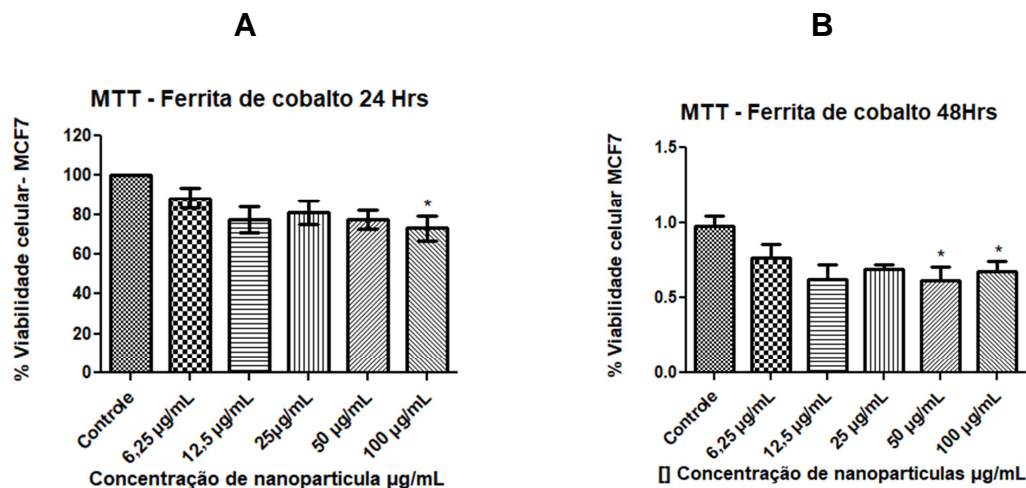


Figura 1. Ensaio de viabilidade celular (MTT) das células MCF7 tratadas com as nanopartículas de ferrita de cobalto por 24 (A) e 48 (B) horas.

Com relação ao ensaio de mecanismo de ação, realizado por meio da determinação da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) Totais, ainda não foram encontrados resultados significantes para serem apresentados.

Conclusões

A partir desses resultados pode-se concluir que as nanopartículas foram citotóxicas para as células de câncer de mama (MCF7), em ambos os períodos de tratamento a que foram expostas.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pelo auxílio e pela Bolsa de iniciação científica.

Referências

AHAMED, M. et al. Cobalt iron oxide nanoparticles induce cytotoxicity and regulate the apoptotic genes through ROS in human liver cells (HepG2). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 665–673, 2016.

AMENDOLA, L. C. B.; AMENDOLA, B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 325–330, 2005.

ARANDA, A. et al. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 954–963, 2013.

INCA. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2004. [citado 2019 mar 08]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/numeros-decancer/2019>.

PAŠUKONIENE, V. et al. Accumulation and biological effects of cobalt ferrite nanoparticles in human pancreatic and ovarian cancer cells. **Medicina (Lithuania)**, v. 50, n. 4, p. 237–244, 2014.

SRINIVASAN, S. Y. et al. Applications of cobalt ferrite nanoparticles in biomedical nanotechnology. **Nanomedicine**, v. 13, n. 10, p. 1221–1238, 2018.

YALLAPU, M. M. et al. Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1890–1905, 2011.