

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E TERAPIA FOTODINÂMICA DAS IONPS@CURCUMINA NA LINHAGEM CELULAR MDA-MB-468

Virginia Rezende Ferreira, Marcela Aparecida Cândido, Leandro José Raniero.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, virginia.rezendef@gmail.com, Iraniero@univap.br.

Resumo

O câncer apresenta grande mortalidade mundial, sendo o de mama o mais mortal entre as mulheres. O seu tratamento, tradicionalmente, envolve a combinação de várias terapias. Entretanto, os pacientes submetidos a esses tratamentos apresentam alguns efeitos prejudiciais, como complicações cardíacas e anemia. Por esse motivo, são estudados novos métodos terapêuticos utilizando Terapia Fotodinâmica e nanotecnologia. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios *in vitro* de citotoxicidade e de terapia fotodinâmica das IONPs@curcumina na linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-468, avaliando a sua eficiência.

Palavras-chave: Câncer de mama. IONPs. Citotoxicidade. Terapia Fotodinâmica. MDA-MB-468.

Área do Conhecimento: Engenharias – Engenharia Biomédica.

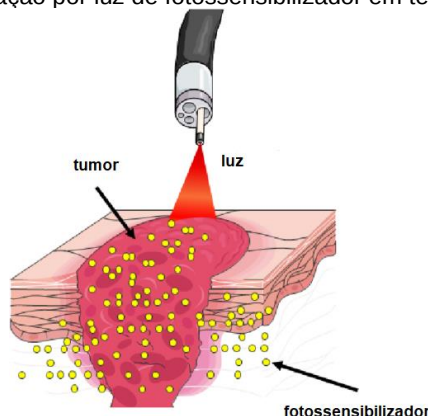
Introdução

Há algum tempo, o câncer de mama vem preocupando a saúde das mulheres por ser o mais mortal entre elas e por apresentar elevada taxa de morbidade (KASHYAP *et al.* 2022; FACINA, 2011). Esse tipo de câncer é caracterizado por cinco estágios, sendo eles determinados pelo tamanho do tumor e pela quantidade de área atingida (MOREDO, 2021; FEMAMA, 2021).

Para combater/atenuar a doença comumente são aplicados os tratamentos tradicionais que envolvem a combinação de terapias com o intuito de melhorar os resultados atingidos (HADI *et al.*, 2019). Entretanto, isso resulta em efeitos colaterais como complicações cardíacas, neutropenia, trombocitopenia e anemia (GALE, 2020; HARBECK *et al.*, 2011). Por esse motivo, novos métodos terapêuticos estão em estudo, dentre eles a Terapia Fotodinâmica (TFD) e a nanotecnologia.

A TFD funciona por meio de um fotossensibilizador (FS) que quando ativado por um comprimento de onda adequado forma espécies reativas de oxigênio, ocasionando a morte de células de câncer (CHEN *et al.*, 2020). Esse tipo de terapia apresenta pouquíssimos efeitos colaterais e é não invasivo (JIANG *et al.*, 2019).

Figure 1 – Ativação por luz de fotossensibilizador em tecido tumoral.



Fonte: RPMC Lasers, c2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A curcumina é um FS rotulado como “produto seguro” pela FDA (US Food Drug Administration), além de ser um composto natural com propriedades anticancerígenas, agindo contra o crescimento tumoral e angiogênese (RATHORE *et al.*, 2020; BHAT *et al.*, 2019; MANSOURI *et al.*, 2020). Embora seja possível o seu uso individual, em conjunto com outras drogas a sua eficiência pode ser aumentada (YIM-IM *et al.*, 2014; GIORDANO, TOMMONARO, 2019). Por essa razão, a nanotecnologia foi utilizada atrelada ao FS.

A nanotecnologia torna possível a obtenção da concentração desejada do agente terapêutico e o seu envio para locais alvos, diminuindo danos causados em células normais (MISRA, ACHARYA, SAHOO, 2010). Uma das maneiras para essa realização é por meio das nanopartículas. Dentre as nanopartículas conhecidas, as de óxido de ferro (IONPs) se destacam para aplicações teranósticas por serem biocompatíveis e estáveis, e por ter as suas propriedades aumentadas com a modificação de sua superfície (GUO *et al.*, 2018; VEISEH, GUNN, 2009).

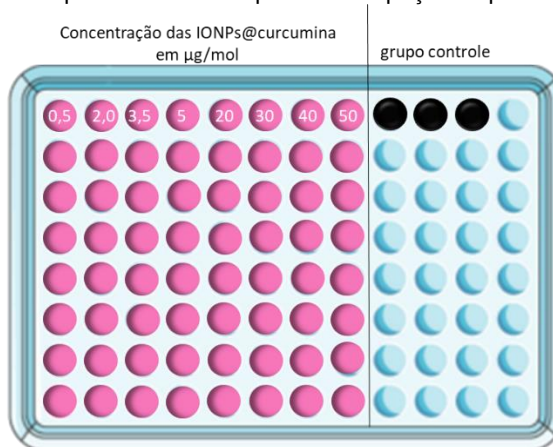
Levando em conta essas considerações, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios de citotoxicidade e terapia fotodinâmica utilizando nanopartículas de óxido de ferro revestidas com curcumina (IONPs@curcumina) na linhagem de câncer mamário MDA-MB-468, para avaliar o seu potencial citotóxico.

Metodologia

Foram escolhidas previamente oito concentrações diferentes das IONPs@curcumina para que a realização dos ensaios gerasse resultados mais completos. As concentrações escolhidas foram 0,5, 2,0, 3,5, 5,0, 20,0, 30,0, 40,0 e 50,0 $\mu\text{g/mol}$.

Para os ensaios de citotoxicidade e de terapia fotodinâmica foram utilizadas placas de 96 poços contendo meio de cultura com 1×10^5 células. mL^{-1} da linhagem MDA-MB-468. Passadas 24 horas de incubação, o meio foi trocado e em seu lugar foram colocadas as oito concentrações diferentes de IONPs@curcumina. As nanopartículas ficaram em contato com as células por 1h, 2h, e 3h em condição de cultivo na estufa. Após o período de cultivo o meio da placa foi retirado e os poços foram lavados com PBS. O modelo da placa preenchida com as diferentes concentrações é apresentado na figura 2.

Figura 2 – Esquema de como a placa de 96 poços foi preenchida.



Fonte: Os autores

O método colorimétrico foi utilizado para ambos os ensaios por meio do reagente MTT (3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5- difenil brometo de tetrazólio, Sigma Aldrich, M5655), método este responsável por determinar a viabilidade da linhagem celular MDA-MB-468 por meio da avaliação da atividade mitocondrial. Tal avaliação pode ser realizada devido a formação dos cristais de Formazan, que se originam pela redução do sal tetrazolium, com absorção em 570 nm (STOCKERT, 2012).

No caso do ensaio de citotoxicidade, as medidas da absorção foram realizadas, sem sofrerem irradiação, em triplicata no Laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica do IP&D-UNIVAP, por meio do espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, USA). Já para a TFD, ocorreu a irradiação da placa no Laboratório de Terapia

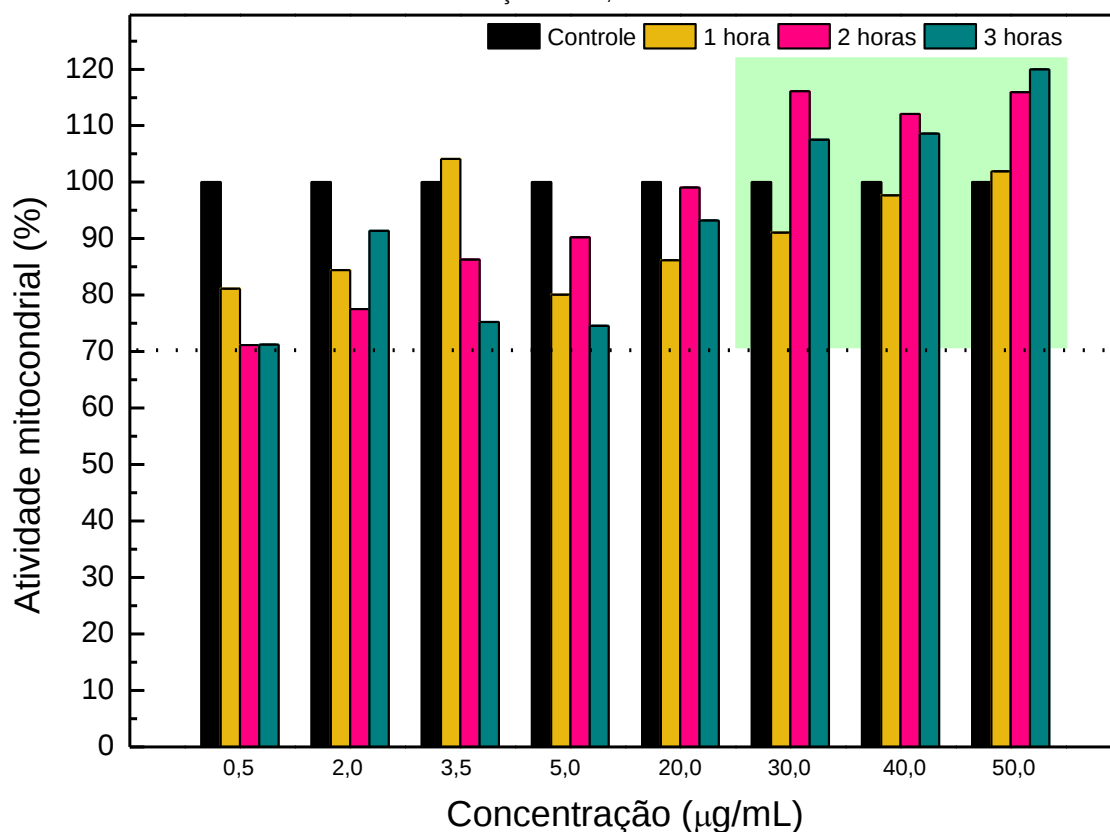
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Fotodinâmica (IP&D/UNIVAP) utilizando o LED Irrad-Led (Biopdi) com comprimento de onda 450 nm em 25mW e com dose de 25 J. cm⁻², e posteriormente foi realizada a medida de absorção da droga, como feito para a citotoxicidade.

Resultados

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade e TFD foram feitos em placa de 96 poços utilizando a linhagem MDA-MB-468 e oito concentrações distintas das IONPs@curcumina. O tempo de incubação experimentados foram de 1h, 2h e 3h, e o comprimento de onda do LED utilizado foi de 450 nm. Os resultados foram analisados de acordo com a ISO 10993-5:2009(E), que indica potencial citotóxico quando a viabilidade celular está abaixo de 70%. Os resultados apresentados na figura 3 mostram a citotoxicidade das nanopartículas sem irradiação e na figura 4, com irradiação (TFD).

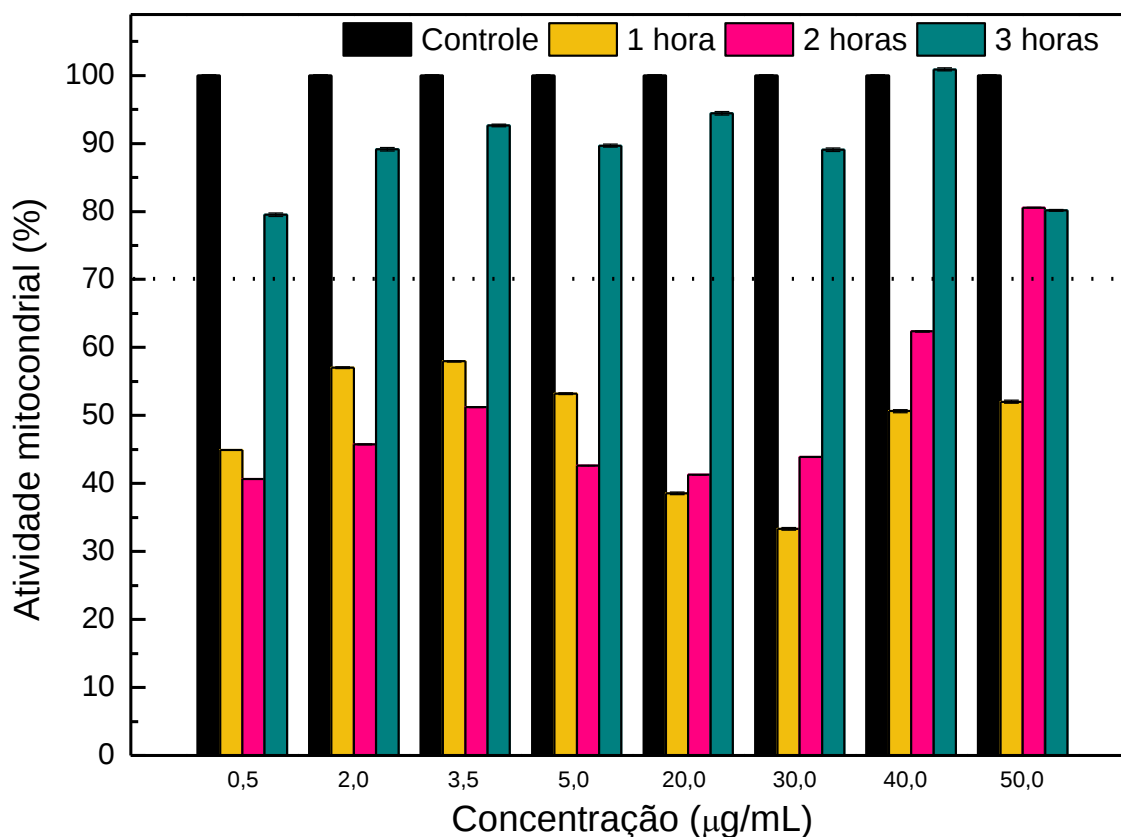
Figura 3 – Ensaio de citotoxicidade das IONPs@curcumina em diferentes concentrações para os tempos de incubação de 1h, 2h e 3h.



Fonte: Os autores.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 4 – Terapia Fotodinâmica associadas as IONPs@curcumina, irradiada em 450 nm



Fonte: Os autores.

Discussão

As amostras utilizadas para o ensaio de citotoxicidade sem irradiação apresentaram viabilidade celular acima de 70%, indicando a ausência de potencial citotóxico, com destaque para as que estão presente na área verde. Esses resultados são apresentados na figura 3, estando eles de acordo com a ISO 10993-5:2009(E), qualificando as amostras utilizadas como viáveis.

Os resultados do ensaio submetido a irradiação (figura 4) mostram que a TFD foi efetiva para as amostras incubadas nos tempos de 1h e 2h, pois os valores encontrados para atividade mitocondrial, com exceção da amostra de maior concentração, estavam abaixo de 70%. Tal resultado enfatiza a necessidade de estudos mais abrangentes sobre o sistema de captação/expulsão das IONPs@curcumina realizado pelas células. Além disso, deve ser considerado que o LED utilizado para a terapia apresentava comprimento de onda de 450 nm, enquanto a banda máxima de absorção do fotossensibilizador utilizado era de 424 nm. Este fato impacta os resultados encontrados, sendo que a utilização de um LED com comprimento de onda mais próximo do valor máximo da banda de absorção pode ser capaz de tornar a terapia mais eficiente.

Conclusão

Por meio da ISO 10093-5:2009(E), foi constatado que os resultados obtidos são promissores, pois as IONPs@curcumina apresentaram valores de atividade mitocondrial abaixo de 70% na linhagem MDA-MB-468 para o ensaio de TFD e não apresentaram potencial citotóxico na ausência de irradiação. Entretanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para que o processo da cinética de captação e expulsão celular das IONPs@curcumina seja compreendido.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Referências

BHAT et al. Benefits of curcuma in Brain disorders. Biofactors, 22 jun. 2019

CHEN, J. et al. Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: Status and challenges. Biomaterials Elsevier Ltd, , 1 abr. 2020.

Diodos laser vermelhos para terapia fotodinâmica. RPMC Lasers. Disponível em: <<https://www.rpmclasers.com/blog/red-laser-diodes-for-photodynamic-therapy/>>. Acesso em: 4 ago. 2023.

Entendendo o câncer de mama em estágio inicial. FEMAMA, 2021. Disponível em: <[FACINA, T. \(ED.\). ABC do Câncer: Abordagens básicas para o controle do câncer. CEDC ed. Rio de Janeiro: \[s.n.\]](https://femama.org.br/site/noticias-recentes/entendendo-o-cancer-de-mama-em-estagio-inicial/#:-:text=Os%20est%C3%A1gios%20iniciais%20do%20c%C3%A2ncer%20de%20mama&text=Em%20geral%2C%20o%20c%C3%A2ncer%20de,c%C3%A2ncer%20de%20mama%20metast%C3%A1tico%2C%20respectivamente.> . Acesso em: 26 de maio de 2023</p>
</div>
<div data-bbox=)

GALE, R. P. Tratamentos dos efeitos adversos da terapia para câncer. Manual MSD, Versão para profissionais de saúde. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/ptbr/profissional/hematologia-e-oncologia/principios-da-terapia-para-cancer/tratamentodos-efeitos-adversos-da-terapia-para-cancer>>. Aceso em 06 mar 2022.

GIORDANO, A.; TOMMONARO, G. Curcumin and cancer. Nutrients, v. 11, 5 out. 2019

GUO, L. et al. Effects of surface modifications on the physicochemical properties of iron oxide nanoparticles and their performance as anticancer drug carriers. Chinese Chemical Letters, v.29, p. 1829-1833, 31 out. 2018

HADI, F. et al. Combinatorial effects of radiofrequency hyperthermia and radiotherapy in the presence of magneto-plasmonic nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells. Journal of Cellular Physiology, 2019. DOI: 10.1002/jcp.28599

HARBECK, N. et al. Cardiovascular complications of conventional and targeted adjuvant breast cancer therapy. Annals of Oncology, v. 22, n. 6, p. 1250-1258, 2011

ISO. Biological evaluation of medical devices – part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Reference number ISO 10993-5:2009(E). c, ISO 2009

JIANG et al. Organic Photodynamic Nanoinhibitor for Synergistic Cancer Therapy. A Journal of the German Chemical Society, v. 58, n. 24, p. 8161-8165, 17 abr. 2019

KASHYAP, D. et al. Multimodal photoacoustic technology in biomedical applications. BioMed Research International, v. 2022, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9605439>

MANSOURI, K. et al. Clinical effects of curcumin in enhancing cancer therapy: A systematic review. BMC Cancer, v. 20, 24 ago. 2020

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. 2010. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discovery Today, v. 15, p. 842-850, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.006>

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

MOREDO, T. F. Entenda o câncer de mama. Hospital IGESP, 2021. Disponível em: < <https://hospitaligesp.com.br/entenda-o-cancer-de-mama/>>. Acesso em: 16 de maio de 2023

STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

RATHORE, S. *et al.* Curcumin: A review for health benefits. *International Journal of Research and Review*, v. 7, n. 1, jan. 2020

VEISEH, O.; GUNN, J. W.; ZAHNG, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p. 284-304, 17 out. 2009

YIM-IM et al. Computacional analyses of curcuminoid analogs against kinase domain of HER2. *BMC Bioinformatics*, v. 15, 3 ago. 2014

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP) – Processo Fapesp 2022/05419-9.