



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Efeitos das nanopartículas de maghemita estabilizadas com citrato em células de carcinoma submandibular humano *in vitro***

Mariana Colaço Pereira Carneiro da Cunha

2015

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

Mariana Colaço Pereira Carneiro da Cunha

**Efeitos das nanopartículas de maghemita estabilizadas com citrato em células de carcinoma submandibular humano *in vitro***

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Data da defesa: 31 de março de 2015

Trabalho realizado nos Laboratórios de Biologia Molecular e Genética e Morfogênese da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. José Márcio Poças Fonseca  
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília, DF

2015

## AGRADECIMENTOS

Aos meus mais que amados pais, João e Lúdia, que são minhas referências para tudo, que me deram toda a educação possível nesse mundo, que me apoiaram em todas as minhas decisões estando sempre ao meu lado sem importar se estavam perto ou longe fisicamente. Aprendi com eles que a dedicação e um trabalho bem feito são fundamentais em qualquer situação. Como diz meu pai: "Tem que meter a cara!"

Aos meus muitíssimo amados irmãos, Mateus e Gabriel, que sempre me foram fonte de inspiração e admiração nos mais diversos aspectos. Cada um com suas respectivas personalidades e características me ensinaram a viver.

À minha família: minha avó Lúdia, meus primos Duda, Peta, Tucão, minhas tias Vushy, Lia, e Taim, minhas primas e sobrinhas Manu, Maria, Flora, Juju, Gabi, Aline e Elio que me demonstraram a importância de uma família permanecer unida mesmo na distância geográfica.

Ao meu marido, Marcos Antônio, o homem que eu escolhi para amar e respeitar e por quem sou eternamente apaixonada e grata por estar sempre ao meu lado, zelando sempre pela minha felicidade.

Aos meus amigos da graduação que fizeram dos meus 4 anos no curso de Biologia os melhores possíveis.

Ao Raphael Severino Bonadio pela amizade, pelas contribuições fundamentais para a realização deste trabalho, além das zilhões de ajudas de que pude dispor ao longo desses 2 anos. Rapha, muito obrigada!

Aos meus amigos do LabMOA por fazerem dos meus dias no laboratório (e fora dele!) extremamente agradáveis, divertidos, engraçados e produtivos. Fabiana, Lorena, Fernanda, Nathália, Marco, Pathy, Sâmia, Diogo, Larissa, Ricardo, André, Daniel, João Heitor e Henrique Bittencourt, a todos vocês: obrigada de coração!

Ao Daniel Ardisson-Araújo pela amizade eterna dentro e fora do laboratório.

Um especial agradecimento ao meu primeiro e querido orientador Bergmann Morais Ribeiro que me ensinou muito do que sei hoje como pesquisadora e como pessoa no mundo acadêmico. Mais do que um orientador de pesquisa, foi um mentor para o meu começo na vida acadêmica.

Ao meu orientador Marcio José Poças Fonseca pelos ensinamentos e apoio ao longo dessa jornada.

À UnB e aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq, CAPES e FAP-DF por me acolherem em suas instalações e pagarem minha bolsa sempre em dia.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho ao longo destes 8 anos de UnB.

## RESUMO

**Introdução:** Diversos estudos discutem a segurança do uso de nanopartículas já que estas são capazes de promover alterações na expressão gênica, padrão epigenético, homeostase do ferro e estresse oxidativo em ensaios *in vitro*. Uma gama de estudos aponta diferentes comportamentos celulares em resposta à exposição a nanopartículas, mas ainda não existe um consenso sobre os reais benefícios e riscos que estes nanomateriais podem apresentar em um sistema biológico complexo. Portanto, torna-se necessário estudar estes riscos a fim de contribuir com o desenvolvimento de nanopartículas mais adequadas para aplicações biológicas. **Objetivo:** Avaliar e caracterizar os possíveis efeitos citotóxicos e epigenéticos em células de carcinoma de glândula submandibular humana (HSG) submetidas a exposição de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com cobertura de citrato (NPs). Analisar possíveis alterações na expressão gênica mediante a quantificação do número de transcritos para determinados genes alvo comprometidos com a regulação epigenética e estresse oxidativo. **Materiais e métodos:** As NPM-citrato foram sintetizadas pelo método de coprecipitação de Fe (II) e Fe (III) e adição direta de ácido cítrico. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados por detecção da lactato desidrogenase (LDH) e ensaio de MTT. A morfologia celular foi analisada por coloração panótica InstaProv em microscópio de luz. A detecção de ferro intracelular foi realizada pelo ensaio do Azul da Prússia. As quantificações de metilação global de DNA e de acetilação das histonas H3 e H4 foram realizados por ensaio colorimétrico. A expressão dos genes *FERRH*, *FERRL*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *HDAC1*, *HDAC2* e *COX-2* foi realizada por qRT-PCR. Para análise da produção de espécies reativas de oxigênio foi utilizado protocolo de H<sub>2</sub>DCFDA. **Resultados:** As NPM-citrato nas concentrações testadas de 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL não apresentaram efeito citotóxico pela metodologia empregadas. Contudo, foram observadas alterações na morfologia celular, como vacuolização citoplasmática nas células expostas a nanopartículas por 24h e 48h, presença de ferro intracelular mesmo após a retirada do tratamento, intensa produção de espécies reativas de oxigênio dose e tempo dependentes, diminuição no perfil global de metilação de DNA e acetilação das histonas H3 e H4: a acetilação da H3 diminuiu para 38% e 62% após os tratamentos com 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL, respectivamente. Para a H4 a hipoacetilação foi mais acentuada, diminuindo de 82% para 4% e 10% após os tratamentos com 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL, respectivamente. Diferenças entre o acúmulo de transcritos dos genes estudados também foram observadas: transcritos referentes aos genes de *COX-2*, *FERRL*, e *FERRH* encontraram-se aumentados, enquanto que *DNMT3a* sofreu uma diminuição no número de transcritos. **Conclusão:** Concluímos que as nanopartículas de maghemita recobertas com citrato são capazes de induzir vacuolização citoplasmática, acúmulo de ROS, diminuição do padrão de metilação global e de acetilação de H3 e H4, alteração do acúmulo dos transcritos *COX-2*, *FERRH*, *FERRL*, *DNMT3a* e *HDAC1* sem comprometer a viabilidade das células HSG. Esse é o primeiro relato sobre os efeitos genéticos e epigenéticos das NPM-citrato sobre células HSG.

**Palavras-chave:** Nanopartículas – células HSG – metilação de DNA – acetilação de histonas

## ABSTRACT

**Introduction:** A plethora of studies debate about the safety of the use of nanoparticles due to their ability to promote alterations in gene expression, epigenetic patterns, iron homeostasis, and oxidative stress *in vitro*. Several papers report these different cell behaviours to different nanoparticles, but there is still no consensus on the real benefits and risks associated to nanoparticle exposure on a complex biological system. Hence, it is necessary to elucidate these risks in order to contribute with adequate therapy development and biological applications. **Objective:** To evaluate and distinguish possible cytotoxic and epigenetic effects on human submandibular gland (HSG) cancer cells exposed to maghemite nanoparticles functionalised with citric acid. **Methodology:** The NPM-citrate were synthesized by coprecipitation of Fe (II) and Fe (III) method and direct addition of citric acid. LDH and MTT were performed in order to evaluate cytotoxicity. Cell morphology was analysed by panoptic staining. Intracellular iron detection was assayed by the Prussian Blue. Methylation of DNA and Histone acetylation quantifications were performed by colorimetric assays. Gene expression of *FERRH*, *FERRL*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *HDAC1*, *HDAC2* e *COX-2* was performed by qRT-PCR. For ROS production assay protocol for  $H_2DCFDA$  was performed. **Results:** No cytotoxic effects were observed on cells exposed to the tested concentrations of 0.5 mgFe/mL and 3.0 mgFe/mL. Although, cell morphology was found altered by both concentrations after 24h and 48h of exposure. Intracellular iron presence was also observed even after cease of exposure as well as intense generation of ROS. Furthermore, global DNA methylation and acetylation of histones H3 and H4 were also found to be altered. Histone 3 acetylation decreased to 38% and 62% after treatments with 0.5 mgFe/mL and 3.0 mgFe/mL, respectively. Hypoacetylation for H4 was even more accentuated and decreased from 82% to 4% and 10% after treatments of 0.5 mgFe/mL e 3.0 mgFe/mL, respectively. Differences between the gene transcripts accumulation were also reported: *COX-2*, *FERRL* and *FERRH* were found to be overexpresses, while *DNMT3a* decreased its transcript accumulation. **Conclusion:** We conclude that maghemite nanoparticles functionalized with citric acid were able to promote cytoplasmatic vacuolization, ROS generation, decreasing of global methylation pattern and acetylation of H3 and H4 and alteration on transcript accumulation of *COX-2*, *FERRH*, *FERRL*, *DNMT3a* and *HDAC1* without impairment of HSG cells viability. This is the first report on the genetic and epigenetic effects of maghemite nanoparticles functionalized with citric acid on HSG cells.

**Keywords:** Nanoparticles – HSG cells – DNA methylation – Histone acetylation

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principais aplicações biomédicas de SPIONs
- Figura 2.** Representação da reação de transferência de um grupo metil do doador SAM para a citosina formando uma 5-metil-citosina.
- Figura 3.** Mecanismo de regulação da expressão gênica pelas enzimas modificadoras de caudas histônicas HAT e HDAC.
- Figura 4.** Principais métodos de entrada de SPIONs no espaço intracelular, aumento da concentração de ferro livre e produção de espécies reativas de oxigênio pela reação de Fenton.
- Figura 5.** Reações de Fenton e Haber-Weiss
- Figura 6.** Desenho experimental do ensaio transiente.
- Figura 7.** Representação esquemática do método utilizado para quantificação de Metilação global de DNA utilizando o kit MethylFlash™ Global DNA Methylation Quantification (Epigentek, USA).
- Figura 8.** Representação esquemática do método utilizado para detecção de acetilação de Histonas H3 e H4 pelos kits *EpiQuick Global Histone H3/H4 acetylation quantification*.
- Figura 9.** Avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio de MTT.
- Figura 10.** Avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio de LDH.
- Figura 11.** Porcentagem de células vacuolizadas.
- Figura 12.** Células HSG coradas e observadas em microscópio de luz invertido após 24h de exposição a NPM-citrato em diferentes concentrações.
- Figura 13.** Células HSG coradas pelo método Azul da Prússia após 24h e 48h de tratamento com NPM-citrato a [0,5 mgFe/mL] e [3,0 mgFe/mL].
- Figura 14.** Azul da Prússia transiente após 24h de tratamento.
- Figura 15.** Azul da Prússia transiente após 48h de tratamento.
- Figura 16.** Presença de espécies reativas de oxigênio em células HSG tratadas com NPs a 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL por 24h e 48h
- Figura 17.** Quantificação de metilação de DNA global. Perfil de metilação de DNA global em células HSG tratadas com PBS, NPM-citrato 0,5 mgFe/ml e NPM-citrato 3,0 mgFe/ml por 24h e 48h
- Figura 18.** Porcentagem de acetilação de Histonas H3 e H4. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one-way com pós-teste Tukey.
- Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras de RNA utilizados na síntese de cDNAs.
- Figura 20.** Quantificação dos transcritos *FERRL*, *FERRH*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *HDAC1*, *HDAC2* e *COX-2* em relação ao controle endógeno *GAPDH* após 24h de exposição a NPM-citrato.

**Figura 21.** Quantificação dos transcritos *FERRL*, *FERRH*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *HDAC1*, *HDAC2* e *COX-2* em relação ao controle endógeno *GAPDH* após 48h de exposição a NPM-citrato.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tratamentos administrados às células HSG para o teste de viabilidade celular mediante ensaio de MTT
- Tabela 2.** Tratamentos administrados às células HSG para o teste de viabilidade celular mediante ensaio de LDH
- Tabela 3.** Sequência e tamanho dos *amplicons* dos primers para os genes *COX-2*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *GAPDH*, *HDAC1*, *HDAC2*, *FerritinaH* e *FerritinaL*.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5mC	5-metilcitosina
ANOVA two-way	Análise de variância de dois fatores
cDNA	DNA complementar
cDNA	DNA complementar
CpG	Dinucleotídeo citosina-guanina
Ct	<i>Cycle treshold</i>
DEP	<i>Diesel Exposure Particles</i>
DMEM	<i>Dulbeco's Eagle Modified Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécie Reactiva de Oxigênio
Fe	Ferro
FM	Fluido magnético
g	Gramas
<i>g</i>	Gravidade
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
h	Hora
HSG	<i>Human Submandibular Gland</i>
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
μ	Micro
m	Mili
M	Molar
min	Minuto
MRI	Ressonância magnética por imagem
MTT	Brometo 3(4, 5 dimetiltiazol-2,5-difenil-tetrazólio)
n	Nano
NPM	Nanopartícula magnética

NPM-citrato	Nanopartícula de maghemita funcionalizada com citrato
°C	Graus Celsius
OD	Densidade óptica
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo-real
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Reactive oxygen species
RPM	Rotação por minuto
seg	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
SPION	Nanopartícula de óxido de ferro superparamagnética

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 Nanotecnologia e nanociência</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2 Nanopartículas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2.1. Nanopartículas magnéticas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 Principais Aplicações biomédicas de SPIONS</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4. Mecanismos associados a toxicidade das nanopartículas (SPIONS)</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4.1 Epigenética</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4.1.1. Metilação de DNA</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4.1.2. Modificações de caudas histônicas</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4.1.1 Efeitos genéticos e epigenéticos de nanopartículas</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4.2 Ferro intracelular e estresse oxidativo</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Células HSG</b> .....	<b>24</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
2.1 Objetivo Geral .....	26
2.2 Objetivos Específicos .....	26
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 Síntese das Nanopartículas Magnéticas estabilizadas com citrato (NMP-citrato)</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2 Manutenção e propagação das células ductais tumorais de glândula submandibular humana – HSG</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3 Tratamento das células HSG com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com citrato (NPM-citrato) para ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4 Citotoxicidade e ensaios de viabilidade celular</b> .....	<b>29</b>
3.4.1 Ensaio de MTT .....	29
3.4.2 Ensaio de LDH .....	30
<b>3.5 Análise morfológica das células HSG tratadas com NPM-citrato</b> .....	<b>30</b>
3.5.1 Ensaio de coloração após 24h e 48 de tratamento.....	30
3.5.2 Detecção da presença de Fe intracelular pelo método Azul da Prússia .....	31
3.5.3 Ensaio de coloração e detecção da presença de Fe após exposição transiente às NPM-citrato.....	31
<b>3.7 Análise de efeitos epigenéticos</b> .....	<b>32</b>
3.7.1 Perfil de metilação global de DNA de células HSG tratadas com NPM-citrato por 24h e 48h.....	32
3.7.2. Análise Estatística .....	34
3.7.3 Quantificação de acetilação das proteínas Histona H3 e H4 de células HSG tratadas com NPM-citrato por 24h .....	34
3.8 Análise da produção de ROS em células HSG.....	36
<b>3.9 Extração de RNA e PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) para análise de níveis de transcritos de genes alvo</b> .....	<b>36</b>
3.9.1 Extração do RNA total.....	37

3.9.2 Obtenção dos cDNAs para ensaio de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
4.1 Determinações das concentrações de NPM-citrato	41
4.2. Análise morfológica das células HSG tratadas com NPM-citrato	43
4.3. Detecção da presença de Fe intracelular pelo método Azul da Prússia	46
4.4. Análise da produção de ROS em células HSG	50
4.5. Análise de efeitos epigenéticos	52
4.5.1. Perfil de metilação global de DNA de células HSG tratadas com NPM-citrato por 24h e 48h	53
4.5.2. Quantificação de acetilação das proteínas Histona H3 e H4 de células HSG tratadas com NPM-citrato por 24h	54
4.6. Extração de RNA e PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) para análise do acúmulo de transcritos de genes alvo	56
<b>5.CONCLUSÕES</b>	<b>62</b>

# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Nanotecnologia e nanociência

Nanotecnologia é a ciência conduzida na nanoescala, aproximadamente de 1 a 100 nanômetros (nm). Nanociência é o estudo das aplicações de elementos de escalas nanométricas que podem ser utilizados para os mais diversos fins, nos âmbitos da química, da biologia, da física e da engenharia. A nanotecnologia é a aplicação da nanociência, que promove grande interesse social e econômico. A nanotoxicologia é uma sub-área da nanotecnologia que estuda as interações de nanoestruturas com sistemas biológicos e os efeitos adversos dessas estruturas nos organismos. Conseqüentemente, a nanotoxicologia visa entender a relação entre as propriedades físico-químicas (tamanho, forma, carga, composição) de nanoestruturas e suas respectivas respostas biológicas. O estabelecimento de características favoráveis destes nanomateriais, que renda uma aplicação favorável nos sistemas biológicos, justifica a importância e a constante expansão deste ramo da nanotecnologia.

### 1.2 Nanopartículas

As nanopartículas são materiais amplamente empregados nas mais diversas áreas da mineralogia, geologia, química, engenharia e biomedicina. Apresentam-se na escala nanométrica e podem ser encontradas em diversas formas como a polimérica, as magnéticas, ou como nanotubos de carbono, entre outras. As nanopartículas de óxido de ferro são encontradas naturalmente no ambiente como partículas de poluição no ar e vulcões. As nanopartículas que se vêm destacando na área biomédica são as partículas de óxido de ferro magnéticas, como as nanopartículas de maghemita utilizadas no presente trabalho.

#### 1.2.1. Nanopartículas magnéticas

Existem vários materiais para a produção das nanopartículas magnéticas sendo o mais comum o óxido de ferro. Os óxidos de ferro como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) são amplamente usados por possuírem a vantagem de serem mais seguros para administração in vivo. Contudo, a maghemita é mais utilizada por apresentar maior estabilidade em relação à magnetita. Esta estabilidade é atribuída ao ferro em estado oxidado ( $\text{Fe}^{+3}$ ), que ocasionaria menos danos ao organismo. Apesar dessa vantagem, a toxicidade dessas partículas ainda é controversa e precisa ser detalhadamente estudada para aplicação em

outras terapias *in vivo*. Sabe-se que o ferro é de extrema importância para o metabolismo celular em diversas vias e funções; porém, quando em excesso, torna-se extremamente tóxico. Este viés será discutido na seção 1.4.2. Além das nanopartículas *per se* é necessário que estas possuam uma biocompatibilidade mínima para administração em qualquer organismo.

Dentro das aplicações biomédicas, as nanopartículas superparamagnéticas (SPIONs) de óxido de ferro são as únicas clinicamente aprovadas e, portanto, têm atraído a atenção em pesquisas para aplicações clínicas nas últimas décadas. SPIONs pertencem à classe de partículas inorgânicas que possuem um núcleo de óxido de ferro revestido por materiais inorgânicos —, como a sílica ou o ouro —, ou orgânicos—, como fosfolipídeos, polissacarídeos, polímeros e peptídeos, entre outros. (Gupta *et al*, 2004). A utilização de coberturas com substâncias biocompatíveis é imprescindível para se obter uma melhor distribuição e menor toxicidade.

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) por sua vez, podem ser utilizadas em diversas aplicações biológicas por serem consideradas de um baixo potencial de toxicidade (Singh *et al*, 2010). Quando dispersas em um solvente carreador e funcionalizadas com uma camada molecular estabilizador (como o citrato, dextran ou ácido dimercaptosuccínico, por exemplo) adquirem a característica de fluido magnético (FM). Em um FM, a interação das NPM com o solvente permite que toda a solução coloidal responda a um campo magnético e não somente as NPM.

As partículas com característica de superparamagnética apresentam a vantagem de se tornarem magnetizadas na presença de um campo magnético e desmagnetizadas logo após a retirada do mesmo. Por conta desta característica, as SPIONs para separação magnética *in vitro* e aplicações *in vivo* como a ressonância magnética por imagem, hipertermia, *drug delivery*, alternativas à quimioterapia convencional.

### 1.3 Principais Aplicações biomédicas de SPIONs

Dentre suas principais aplicações as SPIONs atuam em carregamento de drogas (*drug delivery*), hipertermia e como agentes de contraste em ressonância magnética, sendo esta aplicação a única aprovada para tratamento de pacientes e diagnóstico dos mesmos. SPIONs como agentes de contraste são atualmente comercializados sob os nomes de Ferridex, Resovist, Supravist e Sinerem (Wang *et al*, 2001).

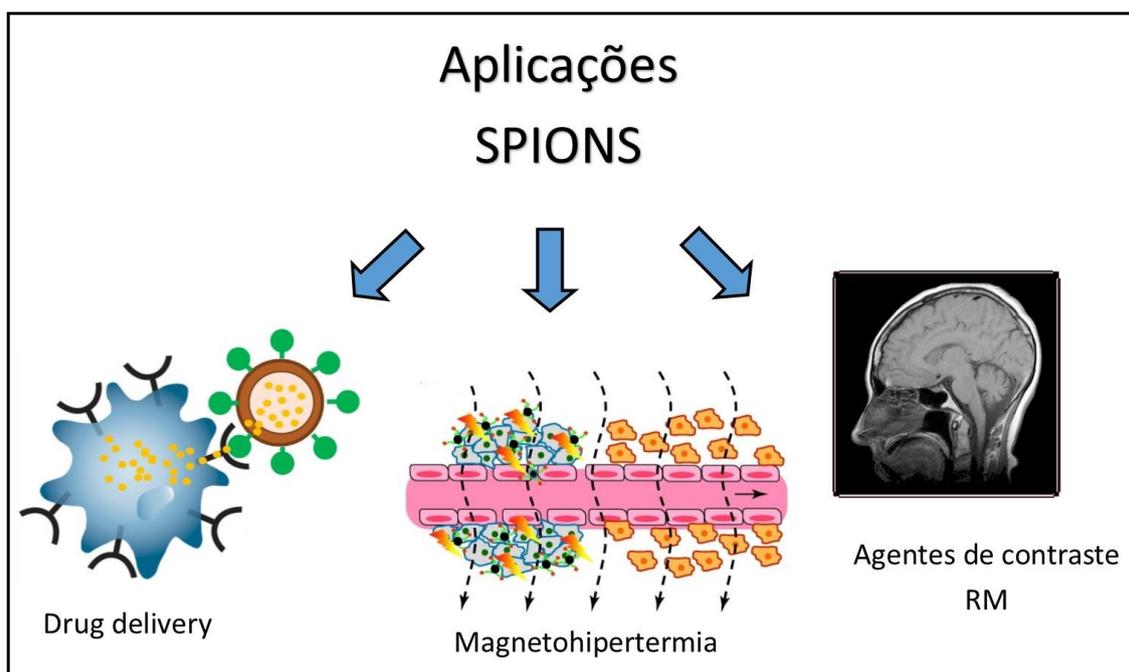


Figura 1. Principais aplicações biomédicas de SPIONs

A

internalização das nanopartículas depende muito do seu tamanho. Após a administração, partículas com diâmetro superior a 200nm são captadas pelo baço facilmente e depois eliminadas por células fagocíticas. Partículas com diâmetros que variam de 10 a 100 nm possuem uma circulação no sangue mais prolongada e por tanto são ideais para injeções intravenosas. O tamanho destas partículas viabiliza a evasão do sistema excretor e consegue penetrar em pequenos capilares teciduais, oferecendo assim uma distribuição mais efetiva em tecidos-alvo (Laurent *et al*, 2008). Por conta destas características, o emprego das nanopartículas magnéticas como carreadores de drogas ou *drug delivery* é um tratamento promissor contra o câncer que substituiria a quimioterapia convencional, diminuindo os efeitos colaterais e o custo do tratamento. Nanopartículas de ferro ligadas a mitoxantrona (MTX) têm sido utilizadas como quimioterapia. Alexiou *et al*, 2006 demonstrou que um campo magnético forte no local do tumor induz o acúmulo de nanopartículas.

A hipertermia pode ser utilizada *in vivo* para aumentar a temperatura do tecido tumoral e destruí-lo de forma mais específica se comparada à quimioterapia convencional. Células tumorais são mais sensíveis ao aumento de temperatura do que células saudáveis. As nanopartículas magnéticas vêm sendo cada vez mais estudadas para esta aplicação pois estudos já provaram sua alta eficiência em absorver a energia de um campo magnético oscilante e transformá-la em calor (Moroz *et al*, 2002).

Estudos recentes vêm se aprimorando no sentido da utilização de nanopartículas superparamagnéticas no tratamento de diversas doenças como o câncer, o Alzheimer (Laurent *et al*, 2012) e a esclerose múltipla (Mahmoudi *et al*, 2011).

#### **1.4. Mecanismos associados a toxicidade das nanopartículas (SPIONs)**

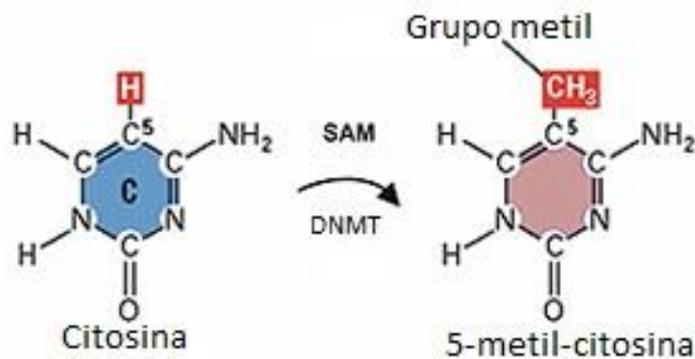
##### *1.4.1 Epigenética*

Do grego, “Epi” significa além, acima. O termo Epigenética significa “além da genética”, além da sequência de DNA. Para descrever uma relação entre genótipo e fenótipo durante o desenvolvimento embrionário sem a participação direta da sequência de DNA, mas sim com a de influências ambientais (Waddington, 1942), Conrad Hal Waddington cunhou o termo pela primeira vez em 1942.

A epigenética estuda mudanças na expressão gênica que ocorrem sem alterações na sequência de DNA. Os mecanismos epigenéticos incluem metilação de DNA, modificação de caudas histônicas e expressão de RNAs não-codantes.

##### *1.4.1.1. Metilação de DNA*

A metilação de DNA é um dos mecanismos epigenéticos de regulação gênica mais importantes e, portanto, mais estudados. A ligação covalente do grupamento metil (-CH<sub>3</sub>) na posição C-5 da citosina (5mC) encontra-se geralmente em sequências CpG, onde uma citosina e uma guanina adjacentes se localizam na mesma fita de DNA. Mais da metade dos genes de vertebrados contém pequenas regiões ricas em CpG (aproximadamente 1 kb), conhecidas como ilhas CpG. Essas regiões são comumente encontradas próximas ao sítio de iniciação da transcrição. A metilação de citosinas pertencentes a ilhas CpG e sua interação com proteínas de ligação a citosinas metiladas (MDBs -(methyl-CpG binding proteins), induzem uma modificação conformacional na cromatina que inibe o acesso da maquinaria de transcrição à região de promotores, alterando a expressão gênica. A hipermetilação de promotores é geralmente associada a uma diminuição da transcrição e conseqüente silenciamento gênico. A demetilação de promotores é associada com um aumento na expressão gênica.



**Figura2. Representação da reação de transferência de um grupo metil do doador SAM para a citosina formando uma 5-metil-citosina.** SAM: S-adenosilmetiona. DNMT: DNA Metiltransferase. Extraído e adaptado de [http://jonciwolff.com/research/dna\\_methylation\\_in Vertebrates\\_a/](http://jonciwolff.com/research/dna_methylation_in Vertebrates_a/).

As reações de Metilação dependem na disponibilidade do agente metilante SAM (S-adenosylmethione) (Fig2). A transferência de um grupo metil de SAM para uma citosina é catalisada pelas enzimas DNMTs (DNA metiltransferases). Uma citosina metilada torna-se uma 5-metil-citosina. Em mamíferos, *DNMT1* está envolvida na manutenção dos padrões de Metilação do DNA e as enzimas *DNMT3a* e *DNMT3b* são metiltransferases *de novo*, que estabelecem padrões de Metilação em estágios precoces do desenvolvimento.

#### 1.4.1.2. Modificações de caudas histônicas

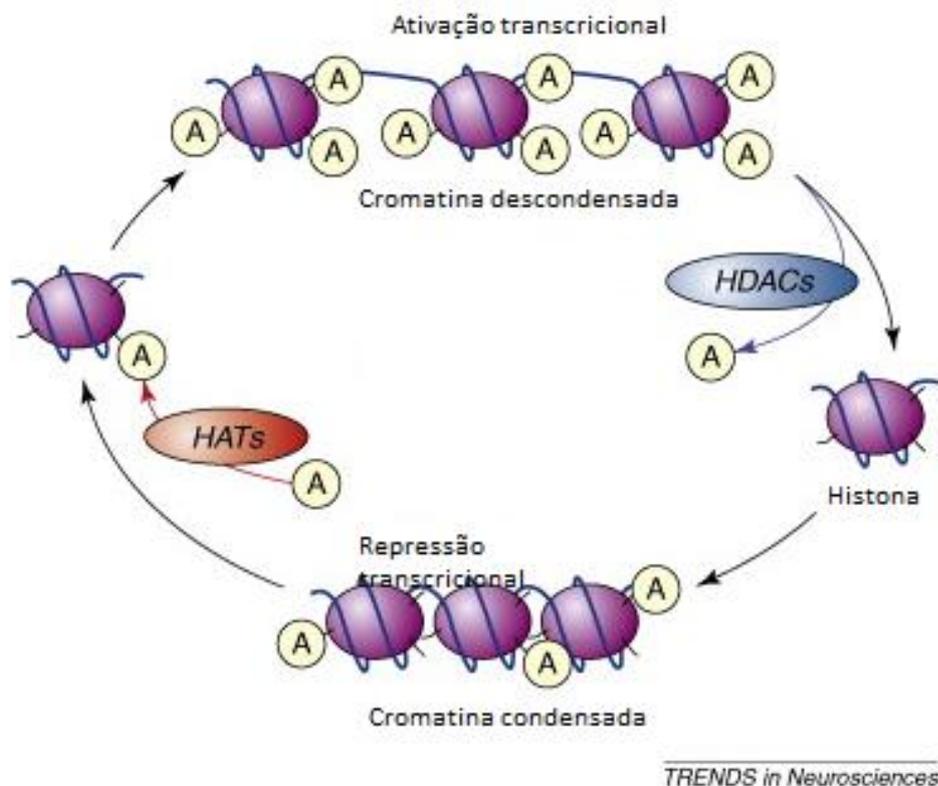
O estado de envelhecimento da cromatina é outro modulador do padrão de expressão gênica. A cromatina quando em sua forma não-condensada e transcricionalmente ativa é denominada de eucromatina, enquanto que a sua forma condensada e inativa é chamada de heterocromatina. Esses dois estados são regulados de acordo com as mudanças conformacionais das proteínas histônicas e modificações na forma com que o DNA se enovela ao redor dos nucleossomos. Esta regulação facilita ou inibe o acesso da maquinaria de transcrição a regiões promotoras de alguns genes e conseqüentemente sua ativação ou silenciamento, respectivamente (Grunstein, M, 1997).

As modificações de caudas histônicas incluem a acetilação, Metilação, fosforilação, ubiquitinação, entre outras. A acetilação é a mais estudada e está associada com a forma não-condensada (relaxada) da cromatina e ativação da transcrição, enquanto que a desacetilação está relacionada a uma cromatina condensada e uma transcrição reprimida. O status de acetilação dos núcleos histônicos é dinamicamente controlado por duas classes de enzimas: Histona acetiltransferases (HATs) e Histona desacetilases (HDACs). HATs acetilam lisinas nas caudas N-terminais das histonas, enquanto que as HDACs catalisam a remoção destes grupos (Fig3).

A acetilação de histonas pelas HATs resulta em um DNA mais relaxado ao redor do núcleo histônico, o que permite uma maior acessibilidade da maquinaria transcricional e

consequentemente uma ativação da transcrição. A hiperacetilação de caudas histônicas é associada a uma expressão gênica aumentada. Este fenômeno é reversível graças a HDACs que promovem um maior enovelamento do DNA ao redor das histonas resultando em uma diminuição da transcrição e consequente redução ou repressão da expressão gênica. As histonas H3 e H4 são os principais alvos da HDAC1.

Sob condições normais, estes dois mecanismos acontecem de forma sincronizada estando as atividades destas enzimas em equilíbrio. Havendo um distúrbio neste equilíbrio, a expressão gênica pode ser afetada em decorrência de uma hiper ou hipacetilação das histonas.



**Figura 3. Mecanismo de regulação da expressão gênica pelas enzimas modificadoras de caudas histônicas HAT e HDAC. Adaptado de Chuana. D et al. 2009**

#### 1.4.1.1 Efeitos genéticos e epigenéticos de nanopartículas

Efeitos genéticos e epigenéticos entram no escopo da toxicidade causada por NPs. Efeitos genéticos de nanopartículas incluem danos ao DNA, que podem levar a mutações, quebras na fita de DNA e aberrações cromossômicas (Durnev *et al*, 2008). Os mecanismos para tais efeitos incluem ligação ao DNA, já que certas NPs são capazes de entrar no núcleo celular; ligação com proteínas associadas ao DNA, como por exemplo as histonas; e respostas celulares indiretas como estresse oxidativo, inflamação e ativação desregulada de vias de sinalização (Brown *et al*, 2001).

Na área da epigenética há ainda poucos estudos sobre os efeitos destas partículas em sistemas biológicos. Ainda assim, algumas nanopartículas já se mostraram epigenotóxicas. Vale ressaltar que aquelas nanopartículas engenheiradas especificamente para a terapia epigenética, como aquelas formadas por inibidores de HDACs, estão fora deste escopo.

Gong *et al*, 2012, demonstrou que nanopartículas de sílica (SiO<sub>2</sub> NPs) em células de queratinócito humano (HaCaT) diminuí a expressão do gene PARP-1, importante gene de reparo do DNA. Além disso, os níveis de DNA metilado no promotor deste gene aumentava proporcionalmente à concentração de nanopartículas de SiO<sub>2</sub>. Uma diminuição da metilação global de DNA e metiltransferases relacionadas como a DNMT1 e DNMT3a também foram relatados por Gong *et al*, 2011.

Nanopartículas também se mostraram efectoras em miRNAs (microRNAs) como, por exemplo, nanopartículas de ouro (AuNPs) (Balansky *et al*, 2013). AuNPs tornaram-se atrativas no campo da biomedicina. Estas se acumulam preferencialmente em sítios de crescimento tumoral e suas propriedades ópticas versáteis permitiram imagens celulares com grande variedade de contraste. Entretanto, efeitos epigenéticos destas partículas aparecerem intrincados a alterações nos níveis de miRNAs. Vários miRNAs relacionados a câncer de pulmão, mostraram-se alterados em células expostas a AuNPs (Ng *et al*, 2011, Lee *et al*, 2012, Vosa *et al*, 2013).

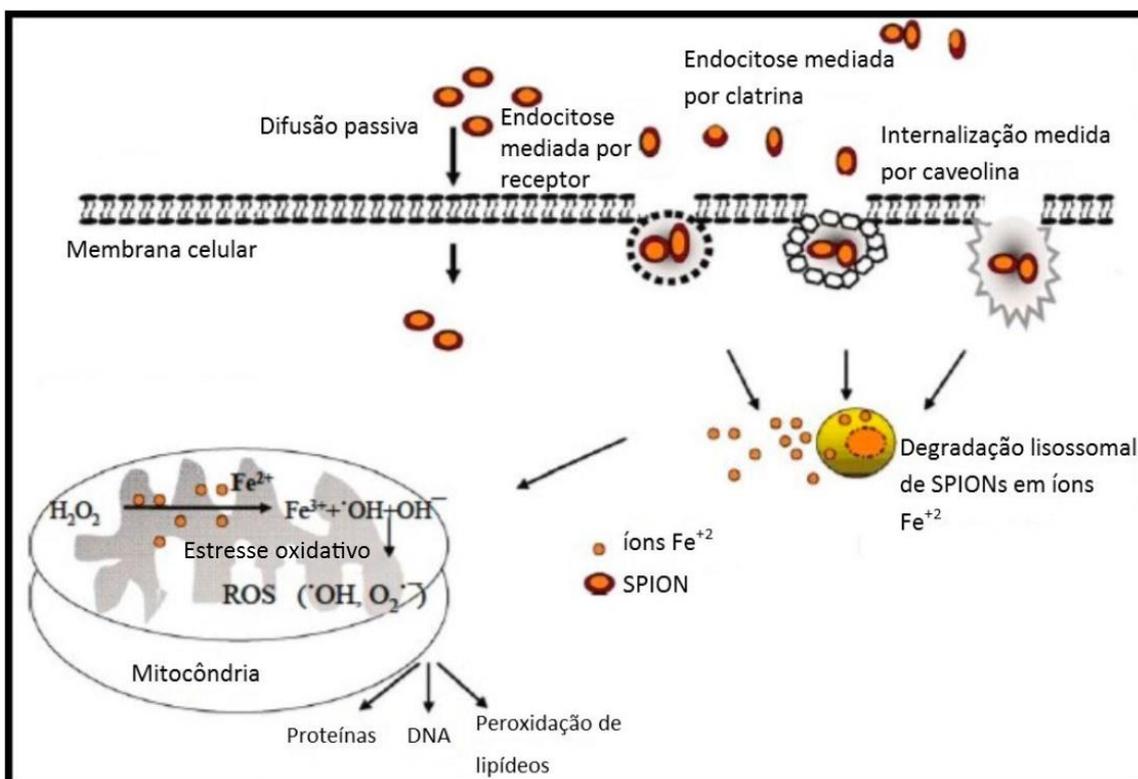
Outra modificação epigenética foi observada em estudos envolvendo quantum dots (QDs). QDs são nanocristais com propriedades ópticas particulares muito utilizados na observação de mecanismos celulares *in vitro* e em estudos *in vivo* que visam entender a biodistribuição de nanopartículas (Migita *et al*, 2014). QDs de carga negativa são rapidamente fagocitados acumulando-se no núcleo celular. Tais QDs mostraram forte interação com o núcleo histônico (Conroy *et al*, 2008). Em células de câncer mamário foi observada uma hipocetilação global de histonas, a qual Choi *et al*, 2008 associou a uma condensação da cromatina e transcrição gênica alterada para genes pro-apoptóticos.

#### 1.4.2 Ferro intracelular e estresse oxidativo

O ferro tem funções essenciais em células de mamíferos e possibilita reações vitais de enzimas contendo ferro incluindo as enzimas mitocondriais envolvidas nos complexos respiratórios, enzimas que participam da síntese de DNA e no ciclo celular, enzimas detoxificantes como a peroxidase e catalase, entre outras. Portanto, o ferro é essencial para o metabolismo e a proliferação celular. O ferro é útil do ponto de vista enzimático pela sua capacidade de ganhar e perder elétrons. Não obstante, esta habilidade nem sempre é benéfica ao organismo já que permite que o ferro participe em reações potencialmente danosas, como é o caso da geração de radicais livres.

Normalmente, o ferro livre intracelular é armazenado como um complexo ferro-ferritina que diminui a alta citotoxicidade associada com o ferro livre. Porém, sob condições patológicas (i.e. câncer, hipertensão e aterosclerose) associadas à produção de espécies reativas de oxigênio, o ferro pode ser liberado da ferritina levando a complicações decorrentes do aumento de ferro livre circulante (Stevens *et al*, 1988; Valko *et al*, 2007)

A dose de SPIONs administrada intravenosamente é responsável por 1-5% dos estoques de ferro totais no organismo (Elias *et al*, 2009). Porém, essas partículas são magneticamente dirigidas a um alvo específico (órgão ou tecido) para maximizar os benefícios da terapia, o que leva a uma alta concentração de ferro em um único local. Conseqüentemente, esta sobrecarga de ferro pode se tornar uma desvantagem por conta de um acúmulo de SPIONs e altos níveis de íons Fe livres, acarretando um desbalanço na homeostase e respostas celulares anormais como citotoxicidade, danos ao DNA, estresse oxidativo, eventos epigenéticos e processos inflamatórios. (Toyokuni *et al*, 2009)



**Figura 4. Principais métodos de entrada de SPIONs no espaço intracelular.** Aumento da concentração de ferro livre e produção de espécies reativas de oxigênio pela reação de Fenton. Adaptado de Singh *et al*, 2004.

O ferro tem sido associado ao câncer (Stevens *et al*, 1988) e vários mecanismos para a carcinogênese induzida pelo ferro já foram sugeridos (Toyokuni *et al*, 2009), incluindo a

produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem potencializar danos diretos ao DNA, proteínas e lipídeos.

Outra via pela qual SPIONs podem induzir uma toxicidade é a produção de ROS. As nanopartículas são internalizadas por diversos mecanismos, sendo o mais comum a endocitose (Fig4). Uma vez no espaço intracelular, acredita-se que as SPIONs são degradadas em íons de Fe nos lisossomos (Gupta *et al*, 2004).

O revestimento das nanopartículas também é passível de causar estresse oxidativo. Em macrófagos de ratos, por exemplo, Stroh *et al*, 2004 mostrou que SPIONs recobertas com citrato levaram a um aumento no estresse oxidativo. Este aumento, porém, foi transiente já que 24h após a incubação houve uma diminuição ao nível do controle.

Acredita-se que existam pelo menos quatro causas do estresse oxidativo em resposta a nanopartículas de ferro: a) produção direta de ROS pela superfície das SPIONs; b) por vazamento de moléculas de ferro das partículas de óxido de ferro; c) alteração da função mitocondrial d) indução de vias de sinalização celular e ativação de células inflamatórias que resultam na produção de ROS (Risom *et al*, 2005).

Vários estudos mostraram relações diretas de estresse causado por espécies reativas de oxigênio por SPIONs. Ions metálicos de transição como Fe(II) e Fe (III) podem causar um estresse oxidativo. Superóxido, produzido por processos metabólicos normais e pelo ciclo redox na célula, reage com peróxido de hidrogênio para formar radicais livres de hidroxila. Os catalisadores são os íons de Ferro que foram introduzidos no meio intracelular pelos SPIONs. Os radicais livres de hidroxila são os responsáveis pelo estresse oxidativo e o consequente dano celular. Esta reação pode ser explicada pela reações de Fenton e Harber-Weiss, como ilustrado abaixo:

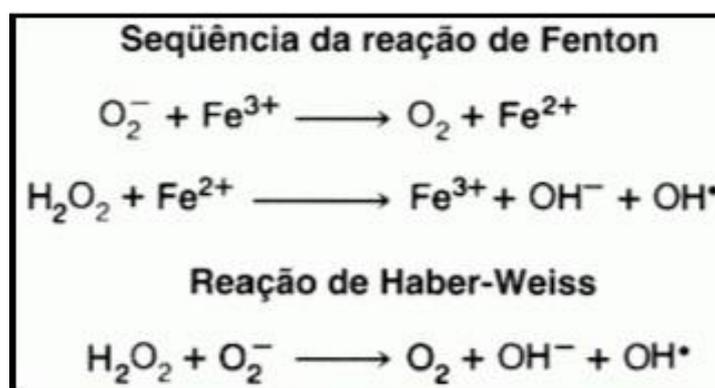


Figura 3: Reações de Fenton e Harber-Weiss.

Os radicais livres gerados por essas reações ficam disponíveis para atacar qualquer biomolécula que esteja a uma distância difusiva. van den Bos *et al*, 2003 mostrou um aumento

dose-dependente de SPIONs na peroxidação de lipídeos e Stroh *et al*, 2004 mensurou aumentos significativos na oxidação de lipídeos e proteínas em células tratadas com SPIONs.

### 1.5 Células HSG

A linhagem de células ductais tumorais de glândula submandibular humana (HSG) foi estabelecida em 1981 a partir de uma glândula submandibular humana irradiada por Shirasuna *et al* (1981). Essa glândula foi retirada cirurgicamente de um paciente japonês de 54 anos que havia recebido irradiação terapêutica por conta de um carcinoma no assoalho da boca. As células HSG foram testadas para tumorigenicidade em camundongos Balb/c, que desenvolveram massas tumorais interpretadas como adenocarcinomas (Shirasuna *et al*, 1981). Desde então, as células HSG têm sido utilizadas em diversos estudos.

Aframian *et al*, (2000) realizaram testes preliminares no campo da engenharia de tecidos visando observar melhores condições de cultivo para obtenção futura de uma glândula salivar artificial para pacientes que sofrem de hipofunção. Outros trabalhos estudaram a diferenciação celular cultivando-se essas células sobre um extrato de lâmina basal, resultando na formação de uma organização semelhante à de ácinos glandulares (Wang *et al.*, 2009) trataram essas células com substâncias terapêuticas em estudos de citotoxicidade.

A literatura é escassa em estudos com células HSG ainda que o estudo destas seja de grande importância já que são candidatas para terapias regenerativas para cânceres de cabeça e pescoço. Estas células foram utilizadas anteriormente pelo grupo em um projeto de mestrado realizado por Luciana Oliveira Pereira. Neste trabalho intitulado “*Apoptose induzida por extrato aquoso de Pteridium aquilinum em células de glândula submandibular humana (HSG) e de epitélio bucal (OSCC-3)*”. Porém, ainda não há trabalhos de perfis genéticos e epigenéticos com este tipo celular na literatura.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar e caracterizar os possíveis efeitos citotóxicos e epigenéticos em células de carcinoma de glândula submandibular humana (HSG) submetidas a exposição de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com cobertura de citrato (NPs).

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas (NPs) em células HSG.
2. Caracterizar a morfologia básica por microscopia de luz.
3. Analisar o perfil de metilação de DNA global.
4. Analisar o perfil de acetilação global de histonas H3 e H4.
5. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio
6. Quantificar por meio de PCR em Tempo Real o número de transcritos de genes relacionados a modulações epigenéticas, metabolismo do ferro e estresse oxidativo

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Síntese das Nanopartículas Magnéticas estabilizadas com citrato (NMP-citrato)**

As nanopartículas de maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) foram sintetizadas e gentilmente cedidas pela Profa. Emília Celma de Oliveira Lima do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Para prepará-las, foi utilizado o método de coprecipitação de Fe (II) e Fe (III) em solução aquosa pela reação de hidrólise alcalina e posteriormente as nanopartículas foram funcionalizadas pela adição de ácido cítrico, de acordo com Freitas *et al.* (2013). A magnetita foi precipitada pela dissolução de 2,08g de FeCl<sub>2</sub> e 5,22g de FeCl<sub>3</sub> em 380mL de água deionizada e, em seguida, adicionou-se 20mL de 25% NH<sub>3</sub> sob agitação vigorosa. Após a sedimentação do precipitado com um magneto permanente, o sobrenadante foi removido por decantação e 40mL de 2M HNO<sub>3</sub> foram adicionados ao sedimento de cor preta, mantido sob agitação por 5min. A completa oxidação da magnetita em maghemita foi realizada adicionando-se 60mL de 0,35M Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> à mistura sob agitação em sua temperatura de ebulição por 1h. Após a sedimentação e lavagem com 2M HNO<sub>3</sub>, o precipitado avermelhado foi disperso pela adição de água deionizada. Para a funcionalização das nanopartículas de maghemita, o precipitado foi tratado com solução de ácido cítrico a 0,05M sob agitação por 45min em pH 5,0. As nanopartículas de maghemita estabilizadas com citrato (NPM-citrato) foram lavadas cinco vezes com acetona para remover o excesso de ácido cítrico e foram secas em fluxo de gás nitrogênio. As NPM-citrato foram dispersas em água deionizada e mantidas sob agitação por 24h. Depois, foram centrifugadas a 750 x g por 2min e dispersas em tampão PBS (solução salina). O sobrenadante foi ajustado para pH 7,0 para produzir amostras biocompatíveis. O fluido magnético obtido foi armazenado a 4°C e a uma concentração de 9,5mgFe/mL, que pode ser determinada através de difração de raios-X segundo Freitas *et al* (2008).

#### **3.2 Manutenção e propagação das células ductais tumorais de glândula submandibular humana – HSG**

As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> em meio DMEM (GIBCO – BRL), em pH 7 suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO – BRL) acrescido de antibiótico gentamicina.

As culturas foram reestabelecidas a partir de uma alíquota armazenada em N<sup>2</sup> líquido em frascos de cultura de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Para a propagação das células em subculturas, as células foram soltas do fundo do frasco por meio de tratamento enzimático com solução de tripsina-EDTA (GIBCO – BRL) por 3 minutos a 37° C. A suspensão celular foi removida para um tubo de centrifuga contendo 1 ml de SFB (GIBCO – BRL) para inativação da tripsina. Em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos a 700 x g. As células foram contadas em câmara de Neubauer e passadas para novo frasco de cultura.

### 3.3 Tratamento das células HSG com nanopartículas magnéticas funcionalizadas com citrato (NPM-citrato) para ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade

Para os ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade foram mantidas inicialmente  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de poliestireno de 96 poços contendo 200  $\mu$ l de meio DMEM nas mesmas condições descritas no item 3.2. Após 24h, o meio DMEM com soro fetal bovino foi substituído por 200  $\mu$ l de meio DMEM sem soro a fins de estabilizar ao máximo a fase do ciclo celular em  $G_0$  mantendo a cultura o mais uniforme possível. O tratamento com as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com citrato (NPM-citrato) em diferentes concentrações foi administrado 24h depois da troca do meio, conforme a tabela 1, e os tempos considerados para cada tratamento foram de 24h e 48h.

**Tabela 1.** Tratamentos administrados às células HSG para o teste de viabilidade celular mediante ensaio de MTT.

Tratamento	Concentração de NPs (mg/mL)	Tempo de exposição
PBS	-	24h e 48h
NPM-citrato	0,04	24h e 48h
NPM-citrato	0,09	24h e 48h
NPM-citrato	0,15	24h e 48h
NPM-citrato	0,30	24h e 48h
NPM-citrato	0,75	24h e 48h
NPM-citrato	1,50	24h e 48h
NPM-citrato	3,00	24h e 48h

### 3.4 Citotoxicidade e ensaios de viabilidade celular

#### 3.4.1 Ensaio de MTT

O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico capaz de avaliar a viabilidade celular (Mosmann, 1983) a partir da metabolização do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) que ocorre apenas em células metabolicamente ativas. Nestas células, enzimas oxidorreduzases mitocondriais são capazes de clivar o anel tetrazólio presente no MTT, gerando um produto de reação denominado cristal formazan que é solubilizado em uma solução de cor roxa. A absorbância registrada em um comprimento de onda de 595nm é proporcional ao número de células metabolicamente ativas, o que permite avaliar a viabilidade celular.

Após a incubação das células HSG com os tratamentos descritos no item 3.3, removeu-se o sobrenadante da cultura e adicionou-se 150 µl de solução de MTT (1 mg/mL) em meio de cultura DMEM suplementado a 10% de SFB em cada poço. A incubação das placas foi de 4h a 37°C e atmosfera umidificada com CO<sub>2</sub> a 5%. Após o período de incubação a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan foram solubilizados com 200 µl de DMSO. Prosseguiu-se com a leitura de absorbância de cada poço em espectrofotômetro Spectramax (Molecular Devices) a 595nm. O experimento foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas.

### 3.4.2 Ensaio de LDH

A enzima lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima estável do citosol presente em todos os tipos celulares e catalisa a oxidação de lactato a piruvato na presença de NAD<sup>+</sup>. Células que sofreram lise, rapidamente liberam LDH através de suas membranas no meio extracelular. O LDH liberado no sobrenadante das culturas é mensurado por ensaio enzimático (Nachlas, 1960) que resulta na conversão de um sal tetrazólio em vermelho de formazan. A quantidade de LDH liberada é portanto, proporcional ao número de células lisadas, não-viáveis.

Para realização do ensaio, seguiu-se o mesmo padrão de tratamento descrito no item 3.3 porém com diferentes concentrações de NPM-citrato que estão descritas na tabela 2. Após incubação das células com os respectivos tratamentos, utilizou-se o kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA) seguindo especificações do fabricante. As concentrações neste ensaio foram ajustadas após a análise da morfologia de células tratadas nestas mesmas condições que será descrita no item 3.5.

**Tabela 2.** Tratamentos administrados às células HSG para o teste de viabilidade celular mediante ensaio de LDH.

Tratamento	Concentração de NPs (mg/mL)	Tempo de exposição
PBS	-	24h e 48h
NPM-citrato	0,5	24h e 48h
NPM-citrato	1,0	24h e 48h
NPM-citrato	1,5	24h e 48h
NPM-citrato	2,0	24h e 48h
NPM-citrato	2,5	24h e 48h
NPM-citrato	3,0	24h e 48h

## 3.5 Análise morfológica das células HSG tratadas com NPM-citrato

### 3.5.1 Ensaio de coloração após 24h e 48 de tratamento

Foi utilizado um conjunto de corantes Instant Prov (NewProv Ltda) gentilmente cedido pela Prof. Dra. Isabel Silva. O Instant Prov é composto por corantes ácidos e básicos corando

as estruturas celulares de acordo com suas afinidades. Os núcleos das células tomam as cores básicas, enquanto os corantes ácidos agem sobre elementos citoplasmáticos. O conjunto de três soluções consiste em Instant prov I, que tem a finalidade de fixar as células, e Instant prov II e III, que promovem a coloração do citoplasma e do núcleo, respectivamente.

Em placas de poliestireno de 24 poços, foram cultivadas inicialmente  $10^5$  células em meio DMEM suplementado a 10% de SFB. Após 24h, o meio suplementado foi trocado por meio sem soro. O tratamento foi administrado por 24h e 48h. Após cada tempo de administração do tratamento, o meio com as nanopartículas foi completamente removido e cada poço lavado com solução de PBS 1x. Foram adicionados de forma independente 300µl de solução Instant Prov I, II e III e retirados após 10, 20, e 10 segundos respectivamente. Após a remoção da solução Instant Prov III, foram adicionados 500µl de PBS 1x e prosseguiu-se para o microscópio de luz invertido AxioVert (Zeiss, USA).

### *3.5.2 Detecção da presença de Fe intracelular pelo método Azul da Prússia*

Qualquer íon férrico (+3) presente na célula se combina com ferrocianeto resultando na formação de um pigmento azul denominado de Azul da Prússia ou ferrocianeto férrico. Por ser uma técnica histológica bastante sensível, foi utilizado para detectar até as menores concentrações de ferro intracelular.

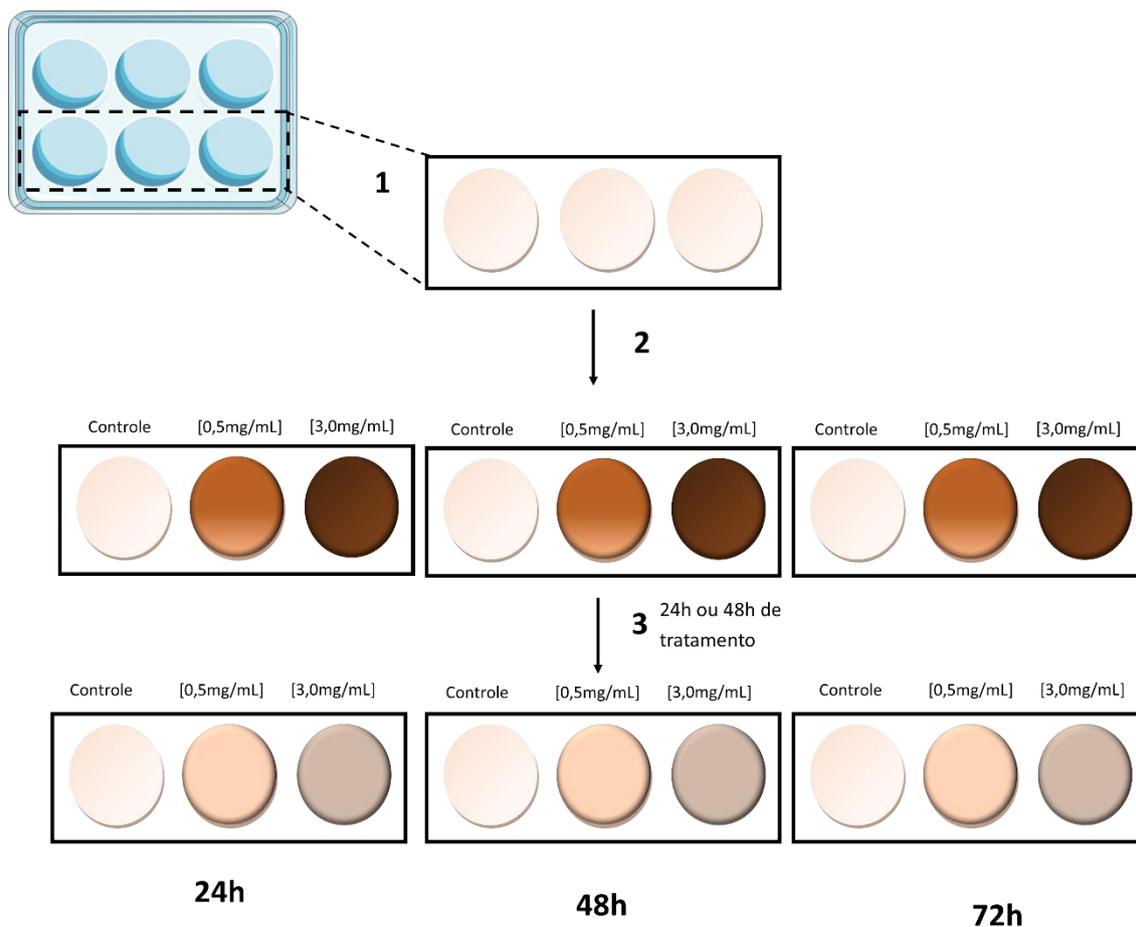
Em placas de poliestireno de 12 poços, foram cultivadas inicialmente  $10^3$  células em meio de cultura DMEM suplementado a 10% de SFB. Após 24h, os tratamentos foram administrados nas concentrações de 0,5 mg/mL e 3,0 mg/mL e a incubação procedeu-se a 37°C em ambiente úmido com CO<sub>2</sub> a 5%. Após 24h e 48h, as células foram fixadas com 1 ml solução de metanol gelado por 3 minutos. Após a fixação e aspiração do agente fixador, adicionou-se 1 ml de solução Azul da Prússia (Ferrocianeto de Potássio e HCl a 4% em proporção de 1:1 v/v) a cada poço. Após 15 minutos, foi utilizado PBS 1x para lavagem dos poços e adicionou-se 1 ml de corante vermelho neutro para contrastar o núcleo celular a fins de facilitar a visualização e distinção entre estruturas celulares e depósitos de ferro quando observadas em microscópio de luz.

### *3.5.3 Ensaio de coloração e detecção da presença de Fe após exposição transiente às NPM-citrato*

Para avaliar a morfologia das células após a retirada do meio contendo as NPM-citrato, foi desenvolvido um ensaio de exposição transiente a essas partículas (Fig4). Foram semeadas  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de poliestireno de 24 poços. Após a aderência das células, foi adicionado ao grupo controle DMEM contendo PBS a 1x e aos grupos experimentais adicionou-se NPM-citrato a 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL. Os grupos experimentais foram divididos naqueles que receberam os tratamentos por 24h e aqueles que o receberam por 48h.

A incubação procedeu-se a 37°C em ambiente úmido com CO<sub>2</sub> a 5% por 24h e 48h. Após 24h, as células foram lavadas 3 vezes com solução salina (PBS) e o meio foi substituído por meio DMEM livre de NPM-citrato suplementado a 10% de SFB. As células voltaram à incubação a 37°C em ambiente úmido com CO<sub>2</sub> a 5% por 24h, 48h e 72h.

Após cada tempo experimental (24h, 48h e 72h) As células foram coradas pelos métodos descritos nos subitens 3.5.1 e 3.5.2.



**Figura 6. Desenho experimental do ensaio transiente.** Foram semeadas  $5 \times 10^3$  células por poço (1) e tratadas com meio de cultura DMEM contendo PBS, NPM-citrato 0,5mgFe/mL e NPM-citrato 3,0mgFe/mL. Após 24h e 48h de tratamento (3), os meios contendo PBS ou NPM-citrato foram substituídos apenas por meio novo suplementado a 10% de SFB. As células foram coradas e visualizadas após 24h, 48h e 72h.

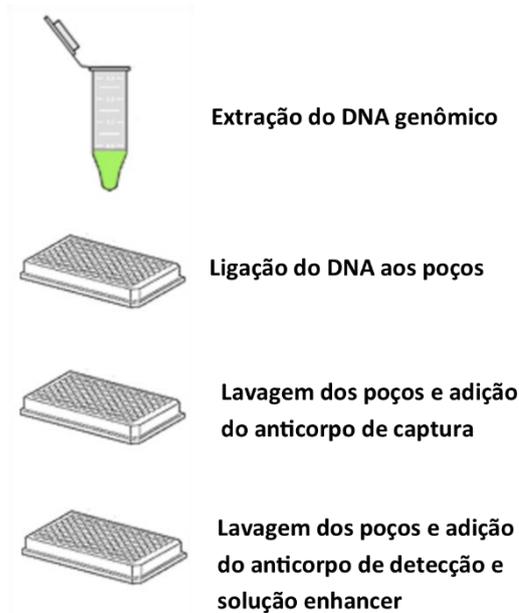
### 3.6 Análise de efeitos epigenéticos

#### 3.6.1 Perfil de metilação global de DNA de células HSG tratadas com NPM-citrato por 24h e 48h

Com o propósito de caracterizar o perfil de metilação global de DNA após a exposição das células às NPM-citrato, foi realizado o ensaio de quantificação de metilação de DNA por meio do kit MethylFlash™ Global DNA Methylation Quantification (Epigentek, USA), segundo as orientações do fabricante (Fig7).

Foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços  $5 \times 10^5$  células HSG e procedeu-se o tratamento conforme descrito na seção 3.3. Após 24h e 48h, o DNA genômico das foi extraído por meio do reagente DNAzol (Invitrogen, USA) de acordo com as orientações do fabricante. Após a incubação, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados 500 $\mu$ L de DNAzol diretamente nos poços à temperatura ambiente. Procedeu-se então a homogeneização cuidadosa para lise celular. O lisado celular foi coletado em microtubos de 1,5mL e foram adicionados 250 $\mu$ L de etanol gelado a 100%. A reação foi homogeneizada por inversão e incubada por 3min à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 5000 rpm por 2 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, o *pellet* de DNA foi lavado duas vezes, através da adição de 1mL de etanol gelado a 70% e centrifugação a 5000 rpm por 2min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram deixadas para secar por 10 min a temperatura ambiente. O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 30  $\mu$ L de água *nuclease-free*. As amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria no NanoDrop (Thermo) e uma alíquota de cada amostra foi ajustada para 50 ng/ $\mu$ L.

Para a detecção de metilação global de DNA, foram aplicados 80 $\mu$ L da solução de ligação e 2  $\mu$ L das amostras, 1  $\mu$ L do controle negativo e 1  $\mu$ L dos controles positivos nos poços da placa de 96 poços com alta afinidade por DNA. Foram utilizados 5 controles positivos (0,5;1,0;2,0;5,0;10,0 ng/ $\mu$ L) para a construção da curva padrão. Os poços foram selados com Parafilm M e incubadas a 37°C por 90 min. A solução foi então descartada e os poços foram lavados com tampão de lavagem por três vezes. Foram adicionados 50  $\mu$ L do anticorpo de captura (a diluição de 1:1000), que foi incubado por 1 h a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com tampão de lavagem por três vezes. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L do anticorpo de detecção (diluído a 1:2000 v/v), que foi incubado por 30 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com tampão de lavagem por quatro vezes. Foram adicionados 50  $\mu$ L da solução de amplificação de sinal (diluída a 1:5000), que foi incubada por 30 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com tampão de lavagem por cinco vezes. Para detectar o sinal da metilação global de DNA, foram adicionados 100  $\mu$ L da solução de desenvolvimento de coloração, que foi incubada por 10 min a temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de parada e as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços de poliestireno para a leitura da absorbância (450 nm) em espectrofotômetro EON.



**Figura 7.** Representação esquemática do método utilizado para quantificação de Metilação global de DNA utilizando o kit MethyFlash™ Global DNA Methylation Quantification (Epigentek, USA).

### 3.6.2. Análise Estatística

Para determinar a quantidade de DNA metilado no genoma em porcentagem seguiu-se orientação do fabricante (Epigentek, USA). Foi construída uma curva padrão com os valores de densidade óptica (OD) e a concentração definida dos controles positivos. Posteriormente, foi determinada a inclinação da curva a partir da regressão linear por meio do software Microsoft Excel. Depois, as ODs das amostras foram subtraídas da média da OD do controle negativo e divididas pelo valor da inclinação da curva multiplicado por 2. Os valores já se encontravam em porcentagem, pois foram adicionados em cada poço 100ng de DNA. O gráfico relativo à metilação global foi analisado pelo teste estatístico (ANOVA two-way com pós-teste Tukey), já que foram analisados dois parâmetros experimentais: tempo de exposição e concentração do tratamento.

### 3.7.3 Quantificação de acetilação das proteínas Histona H3 e H4 de células HSG tratadas com NPM-citrato por 24h

Para caracterizar uma possível modificação na acetilação das histonas H3 e H4, foram utilizados os kits *EpiQuick Global Histone H3 acetylation quantification* e *EpiQuick Global Histone H4 acetylation quantification* (Epigentek, USA). O protocolo possui 2 etapas principais:

(1) extração de histonas das células após tratamento e (2) detecção e quantificação de histonas H3 e H4 acetiladas (Fig8). Para a extração das histonas, as células HSG foram semeadas e tratadas como descrito na seção 3.3. Após 24, o meio foi retirado e as células tripsinizadas a 37°C e em seguida lavadas com PBS 1X por centrifugação a 2500 x g por 2 min. O *pellet* obtido foi ressuscitado com 100µl de solução de lise GF1 e incubadas no gelo por 5min. A solução foi então centrifugada por 30 s a 10000 x g e o pellet resultante foi ressuscitado com 300 µl de tampão de extração GF2/glicerol, homogeneizado e incubado no gelo por 5min. Procedeu-se uma centrifugação a 10000 x g por 5 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 100ul de TCA 100% e incubou-se por 30min no gelo. O precipitado foi coletado por centrifugação a 10000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi então removido e 1 mL de acetona:HCL foi adicionado. O pellet foi coletado por centrifugação a 10000 x g por 2min a 4°C e posteriormente lavado com acetona e incubado no gelo por 1 min. Seguiu-se uma centrifugação para recuperação do pellet a 10000 x g por 2 min, o sobrenadante foi removido e o pellet foi deixado por 5 min a temperatura ambiente para secar. Para dissolução do pellet, 40µl de água destilada foram adicionados, a concentração de proteína foi quantificada em NanoDrop (Thermo Scientific) e as amostras foram guardadas a – 80°C.



**Figura 8.** Representação esquemática do método utilizado para detecção de acetilação de Histonas H3 e H4 pelos kits *EpiQuick Global Histone H3/H4 acetylation quantification*.

Para a quantificação de acetilação das histonas H3 e H4, as proteínas extraídas foram ajustadas para uma concentração de 200 ng/µl com solução tampão GF4. O kit fornece os

poços em *strips* onde serão aplicadas as amostras. A cada poço foram adicionados 5 µl da solução de proteína, 5 µl de GF4 como controle negativo e 5 µl de Histona H3 ou H4 a 5 ng/µl acetiladas como controle positivo (fornecido no kit). A placa foi incubada por 60 min a 37°C em ambiente livre de umidade. Depois, foram adicionados 150 µl de tampão bloqueador (GF5) por mais 30 min a 37°C. Em seguida, a solução foi removida e os poços lavados com tampão de lavagem GF3 por três vezes. Diluiu-se o anticorpo de captura (GF7) com o tampão GF6 (1:100 v/v) e 50 µl foram adicionados a cada poço. Incubou-se a placa por 60 min a 37°C sob agitação a 100rpm. Os poços foram então lavados com tampão de lavagem GF3 por quatro vezes. Em seguida, o anticorpo de detecção (GF8) foi diluído com GF6 na proporção 1:1000 e 50 µl foram adicionados a cada poço. Após 30 min a temperatura ambiente, os poços foram lavados quatro vezes com GF3. Finalmente, 100 µl de solução de desenvolvimento (GF9) foi adicionado e incubou-se por 6 min a temperatura ambiente no escuro. 10 µl de solução de parada foi adicionada em cada poço e a absorbância foi registrada a 450 nm em espectrofotômetro EON.

Para quantificação da porcentagem de acetilação das amostras em relação ao controle, foi utilizada a fórmula fornecida pelo fabricante.

$$\frac{(\text{Média OD amostra-branco})}{(\text{OD controle-branco})} \times 5 \text{ ng}, \text{ onde } 5 \text{ equivale à quantidade utilizada do}$$

controle endógeno. A quantidade de proteína utilizada foi ajustada para 200ng. Portanto, procedeu-se com a fórmula  $(\text{ng}/200\text{ng}) \times 100\%$  para determinar a porcentagem de acetilação por amostra.

### 3.8 Análise da produção de ROS em células HSG

Pode-se mensurar a produção de espécies reativas intracelular utilizando-se o corante H<sub>2</sub>DCF-DA (Sigma-Aldrich). Este é um corante não fluorescente ligado ao diacetato. O diacetato é transportado para o interior da célula e clivado a H<sub>2</sub>DCF. O H<sub>2</sub>DCF reage com espécies reativas de oxigênio e emite uma fluorescência na cor verde. Pode-se agora mensurar qualitativa e quantitativamente a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio).

Foram semeadas 5x10<sup>3</sup> células HSG em placas de poliestireno de 96 poços e após 24h foi adicionado o fluido magnético contendo as nanopartículas de óxido de ferro nas concentrações de 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL. Após os tratamentos de 24 e 48h, foram adicionados 100 µl de H<sub>2</sub>DCF-DA a 10 µM. Após a incubação por 30 min, a 37°C no escuro, as células foram lavadas com solução salina e visualizadas em microscópio de fluorescência.

### 3.9 Extração de RNA e PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) para análise de níveis de transcritos de genes alvo

### 3.9.1 Extração do RNA total

Após o tratamento realizado como descrito no item 3.2, as NPM-citrato foram retiradas do meio celular para posterior extração do RNA celular. O RNA total das células foi extraído por meio do kit de extração de RNA Illustra RNAspin Mini (GE Healthcare), segundo as orientações do fabricante. As células HSG foram coletadas por meio de tripsinização e centrifugadas por 3 min à 100 x *g* rpm. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pellet 350  $\mu$ L de tampão de lise e 3,5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram homogeneizadas e filtradas em colunas de filtragem, por meio de centrifugação à 11000 x *g* por 1 min. A solução foi transferida para microtubos de 1,5 mL RNase-free e adicionou-se 350  $\mu$ L de etanol 70% gelado. As amostras foram então aplicadas em colunas de sílica e centrifugadas por 30seg a 8000*g*. O *flow-through* foi descartado e foram adicionados 350  $\mu$ L de tampão de dessalinização às nas colunas, que foram centrifugadas à 11000 *g* por 1min. O *flow-through* foi descartado e as amostras foram tratadas com 95  $\mu$ L de solução contendo DNase (10mg/mL) e incubadas por 25 min a temperatura ambiente. Em seguida, 200  $\mu$ L de tampão de inativação da DNase foram adicionados às colunas, que foram centrifugadas à 11000 *g* por 1 min. As colunas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem e submetidas a centrifugação por 2 min a 11000 *g*. As colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL RNase-free e as amostras foram eluídas em 60  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O RNase-free e armazenadas a -80°C. As amostras de RNA foram posteriormente quantificadas por espectrofotometria em NanoDrop2000 (ThermoScientific) e suas integridades foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X.

### 3.9.2 Obtenção dos cDNAs para ensaio de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

Para a obtenção dos cDNAs, utilizou-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) para as reações de transcrição reversa de acordo com orientações do fabricante. Para isso, 10  $\mu$ L do 2X RT Master Mix (2,0 $\mu$ L de 10X RT Buffer; 0,8 $\mu$ L de 25X dNTP Mix; 2,0 $\mu$ L 10X RT Random primers; 1,0 $\mu$ L de MultiScribe™ Reverse Transcriptase; 1,0 $\mu$ L de RNase Inhibitor; 3,2 $\mu$ L de água nuclease-free) foram adicionados em cada uma das amostras de RNA total (1 $\mu$ g de RNA em 10 $\mu$ L de água). A reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador Veriti® (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 10 min a 25 °C; 120 min a 37°C; 5 min a 85°C. As amostras foram armazenadas a -20°C. Os cDNAs resultantes foram utilizados como molde para amplificação dos genes de interesse. A quantificação dos RNAs mensageiros presentes nas diferentes condições de tratamento foi analisada por meio da técnica de PCR em Tempo Real, empregando-se o kit SYBR® Green Master Mix (Applied

Biosystems). Para isso, 2  $\mu\text{L}$  dos cDNAs; 5 $\mu\text{L}$  do SYBR® Green Master Mix; 0,2 $\mu\text{L}$  do primer forward (10 $\mu\text{M}$ ); 0,2 $\mu\text{L}$  do primer reverse (10 $\mu\text{M}$ ) e 2,6  $\mu\text{L}$  de água foram aplicados por poço em placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical (Applied Biosystems). As reações de PCR quantitativo foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50 °C por 20seg; 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min; 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min; 95 °C por 30 seg e 60 °C por 15 seg. Antes das reações de quantificação da expressão gênica, foi realizada a curva de eficiência dos primers, onde foi identificado que o GAPDH poderia ser usado como controle endógeno, pois seus valores de Ct (Cycle Threshold) não variaram significativamente entre as amostras. Os iniciadores foram obtidos da empresa Eurofins e suas sequências estão ilustradas na tabela 3.

**Tabela 3.** Sequência e tamanho dos *amplicons* dos primers para os genes COX-2, DNMT1, DNMT3a, GAPDH, HDAC1, HDAC2, FerritinaH e FerritinaL (Retirados de Logan *et al*, 2013; Waltregny *et al*, 2004; Ryott *et al*, 2011 e Huang *et al*, 2013).

<b>Nome</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Amplicon</b>
COX-2	GCACGTCCAGGAACTCCTCA	GGGGTAGGCTTTGCTGTCTG	74pb
DNMT1	GGTTCTTCCTCCTGGAGAATGTC	GGGCCACGCCGACTG	141pb
DNMT3a	CAATGACCTCTCCACGTCAAC	CATGCAGGAGGCGGTAGAA	89pb
HDAC1	ACCGGGCAACGTTACGAAT	CTATCAAAGGACACGCCAAGTG	102pb
HDAC2	TCATTGGAAAATTGACAGCATAGT	CATGGTGATGGTGTGGAAGAAG	151pb
Ferritina H	ACTGATGAAGCTGCAGAACC	GTCACCCAATTCTTTGATGG	246pb
Ferritina L	CAGCCTGGTCAATTTGTACCT	CGGTTCGAAATAGAAGCCCAGAG	65pb
GAPDH	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT	137pb

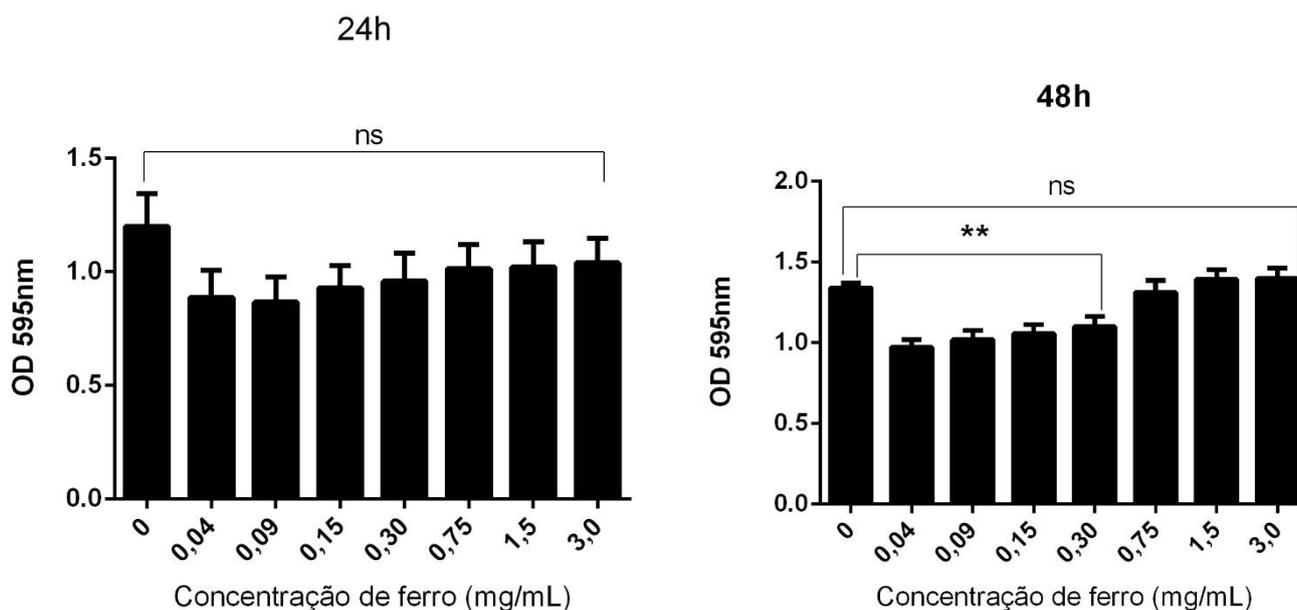
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinações das concentrações de NPM-citrato

Para determinar as concentrações de NPM-citrato foram realizados testes de viabilidade e citotoxicidade celular. Os resultados dos ensaios de MTT foram realizados 24h e 48h após os tratamentos com NPM-citrato. Após 24h de tratamento não foi observada, em nenhuma concentração, citotoxicidade celular significativa em relação ao controle (Fig9). Embora os resultados para o tratamento de 48h apresentem uma diferença estatística de citotoxicidade para as concentrações de 0,04, 0,09, 0,15 e 0,3 mgFe/mL, podemos observar que para as maiores concentrações (0,75, 1,5 e 3,0 mgFe/mL) não houve alteração. Sendo assim, considerou-se que biologicamente nenhuma das concentrações afetou de forma significativa a membrana mitocondrial.

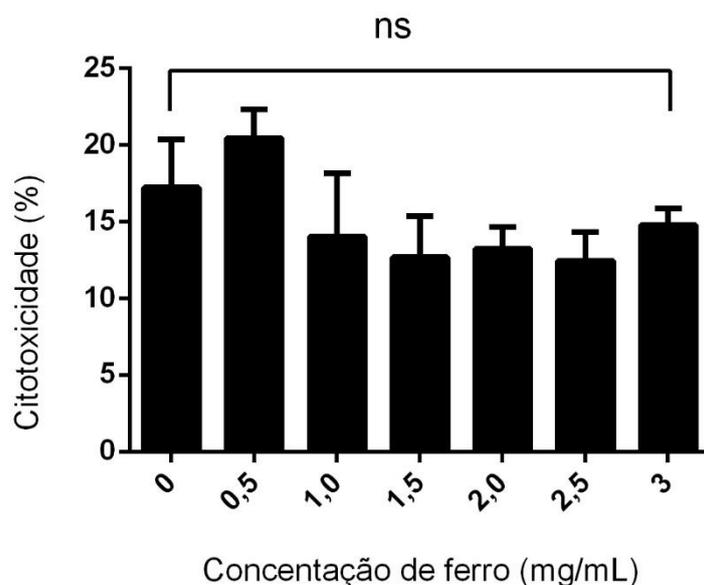
Ensaios de viabilidade requerem um certo cuidado na geração de falsos-positivos e para a obtenção de um resultado fiel, mais de uma técnica deve ser utilizada como, por exemplo, ensaios de integridade de membrana celular (Azul de Trypan e lactato desidrogenase



**Figura 9. Avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio de MTT.** Após 24h de tratamento com NPM-citrato e após 48h. Houve diferença estatística entre os tratamentos apenas para o ensaio de 48h.

– LDH). Portanto, foi realizado o teste de viabilidade celular por meio do ensaio de LDH (Fig10) para confirmar o resultado obtido por meio do ensaio de MTT (Fig9). As células com lesão na membrana liberam LDH para o meio extracelular e assim pode-se determinar a mortalidade celular. Neste ensaio os dois tempos de exposição (24 h e 48 h) foram agrupados em uma única representação gráfica já que não houve diferença significativa de citotoxicidade em nenhuma concentração ou tempo testados. Este resultado, portanto, corrobora o resultado

anterior de que as NPM-citrato nas concentrações e tempos testados não tiveram efeitos citotóxicos e não afetaram a viabilidade das células HSG. Ainda assim, é fundamental que mais estudos com células HSG e partículas de óxido de ferro sejam realizados em diferentes tempos e concentrações mais elevadas. Mahmoudi *et al*, 2009 realizou experimentos com fibroblastos de camundongo tratados com SPIONs por até 96 h e em concentrações de até 10 mgFe/mL e observou uma viabilidade celular de 80% em relação ao controle.



**Figura 10. Avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio de LDH.** nenhuma das concentrações testadas apresentou significativa citotoxicidade em relação ao controle. A citotoxicidade observada para todos os tratamentos foi de 15-20%, o que configura uma dose de NPM-citrato sub-letal para as células HSG.

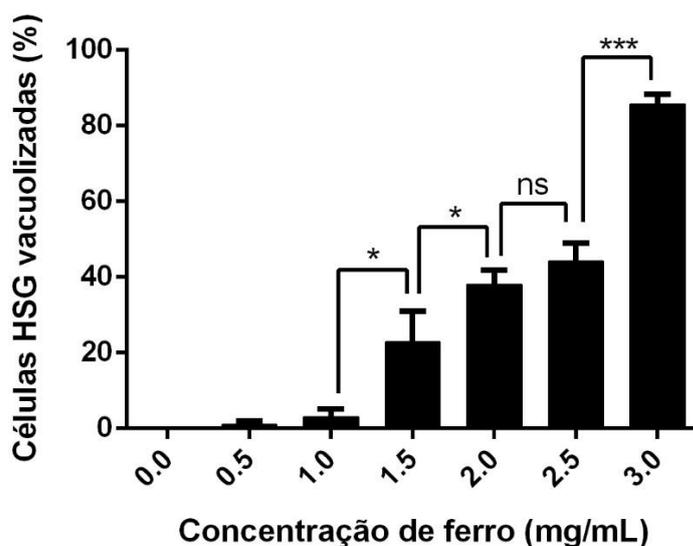
Os efeitos citotóxicos de NPM-citrato ainda são intensamente estudados e discutidos e ainda não se chegou a um consenso sobre doses e tempos dependentes necessários para causar mortalidade celular expressiva. Carneiro *et al*, 2013 e Press *et al*, 2010 comprovaram a susceptibilidade a NPMs em células de câncer de mama e macrófagos J774, respectivamente; enquanto que Huang *et al*, 2013 demonstra o contrário em células de carcinoma de pulmão A529. A citotoxicidade de NPMs depende de diversos fatores incluindo o tipo celular em estudo.

Hong *et al*, 2011 testaram a resposta de nanopartículas de ferro com diversos grupos de cobertura acoplados, incluindo o citrato, em células de fibroblasto murino. A partir de seus resultados, concluíram que houve uma leve redução da viabilidade celular (15%) dose-dependente, resultado similar ao obtido no presente trabalho. Podemos especular portanto, que a citotoxicidade primária se origina após a internalização das nanopartículas pela célula ao invés de causar um dano físico à membrana celular.

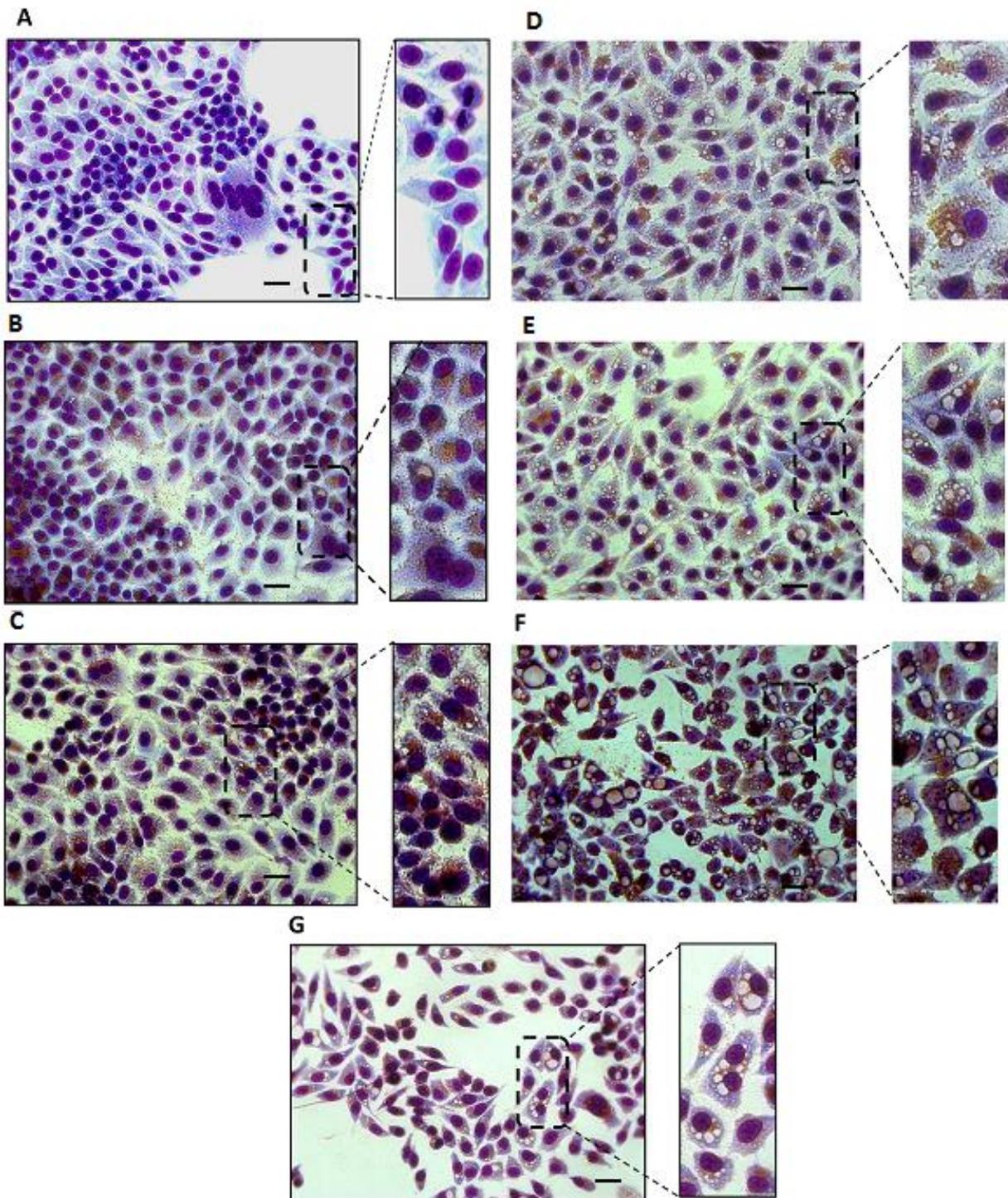
Jeng *et al*, 2006, também mostraram que o número de nanopartículas por célula assim como o número de células utilizadas também afeta o resultado da análise toxicológica. Portanto, podemos afirmar que nossos resultados são consistentes com a literatura que afirma que a toxicidade de nanopartículas depende do tipo celular, do tempo de exposição e das características (carga, tamanho, cobertura) e concentração das nanopartículas utilizadas (Mahmoudi *et al* 2012, Hassan *et al*, 2014).

#### 4.2. Análise morfológica das células HSG tratadas com NPM-citrato

Com a finalidade de melhor avaliar o comportamento celular após administração dos tratamentos com NPMs, analisou-se a morfologia celular após 24h de exposição às nanopartículas. Apesar de os resultados anteriores dos ensaios de MTT e LDH inferirem que não houve citotoxicidade por parte do fluido magnético nas concentrações administradas, a análise morfológica demonstrou que alterações morfológicas podem ser atribuídas a uma toxicidade ainda que esta não cause a morte celular. Pode-se observar na figura 11 que as células HSG encontram-se com a morfologia alterada a partir da concentração de 1,0mgFe/mL. A presença de vacúolos intracelulares e sua ocorrência é diretamente proporcional à concentração utilizada em cada tratamento (Fig12). Pouquíssimos artigos na literatura mencionam a formação destes vacúolos após exposição a SPIONs. Mahmoudi *et al*, 2009 acredita que estes vacúolos sejam formados por vesículas de gás e que estas contribuam para a toxicidade de SPIONs devido a mudanças em função proteica e equilíbrio iônico. Neste estudo publicado em 2009, células de fibroblasto de camundongo L929 apresentaram uma vacuolização similar após o tratamento com as nanopartículas de óxido de ferro. Mais estudos são necessários para total elucidação deste fenômeno.



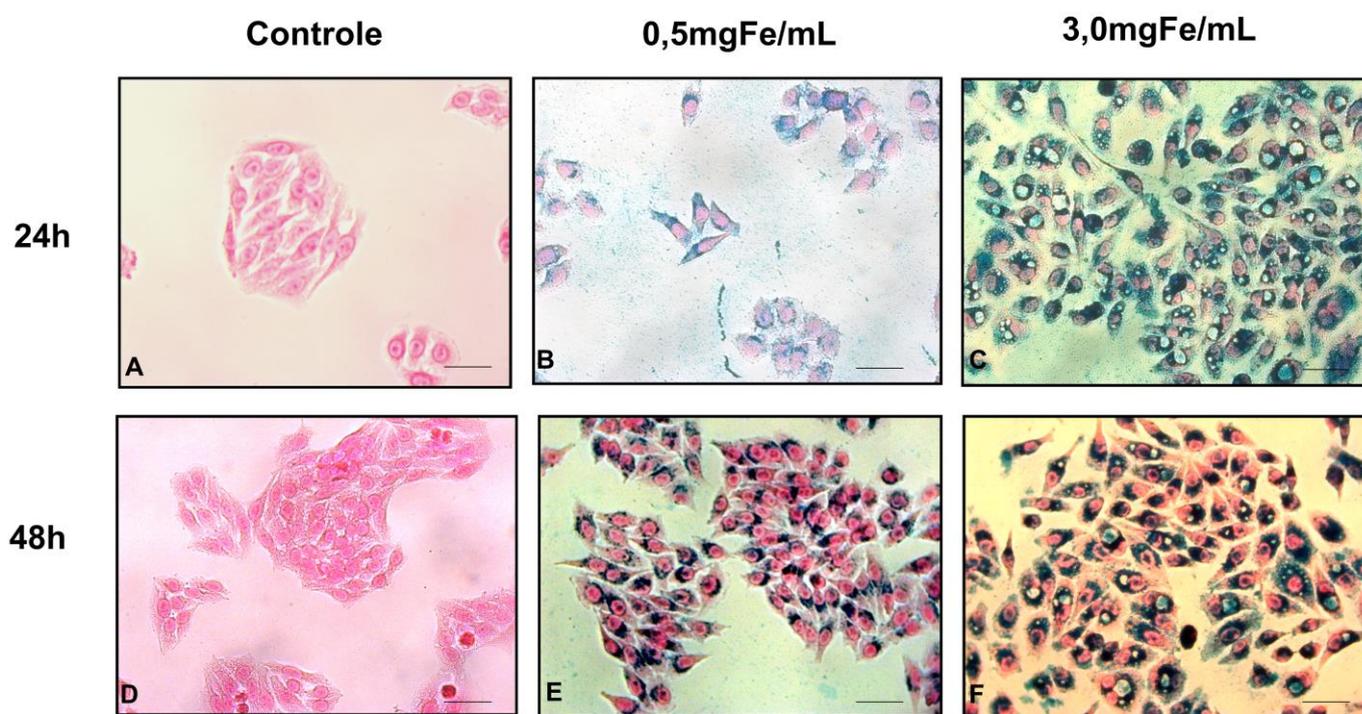
**Figura 11. Porcentagem de células HSG vacuolizadas.** À medida que a concentração de ferro intracelular aumenta, a vacuolização é crescente chegando a quase 100% de células vacuolizadas no tratamento com NPM-citrato na concentração de 3,0mgFe/mL.



**Figura 12. Células HSG coradas e observadas em microscópio de luz após 24h de exposição a NPM-citrato em diferentes concentrações. A) Controle com células não tratadas. B) 0,5mg/mL. C) 1,0mg/mL. D) 1,5mg/mL. E) 2,0mg/mL. F) 2,5mg/mL. G) 3,0 mg/mL. Os destaques em cada foto visam evidenciar a presença de vacúolos cada vez mais numerosos à medida que aumenta-se a concentração das NPM-citrato. Barra de escala: 50µm.**

### 4.3. Detecção da presença de Fe intracelular pelo método Azul da Prússia

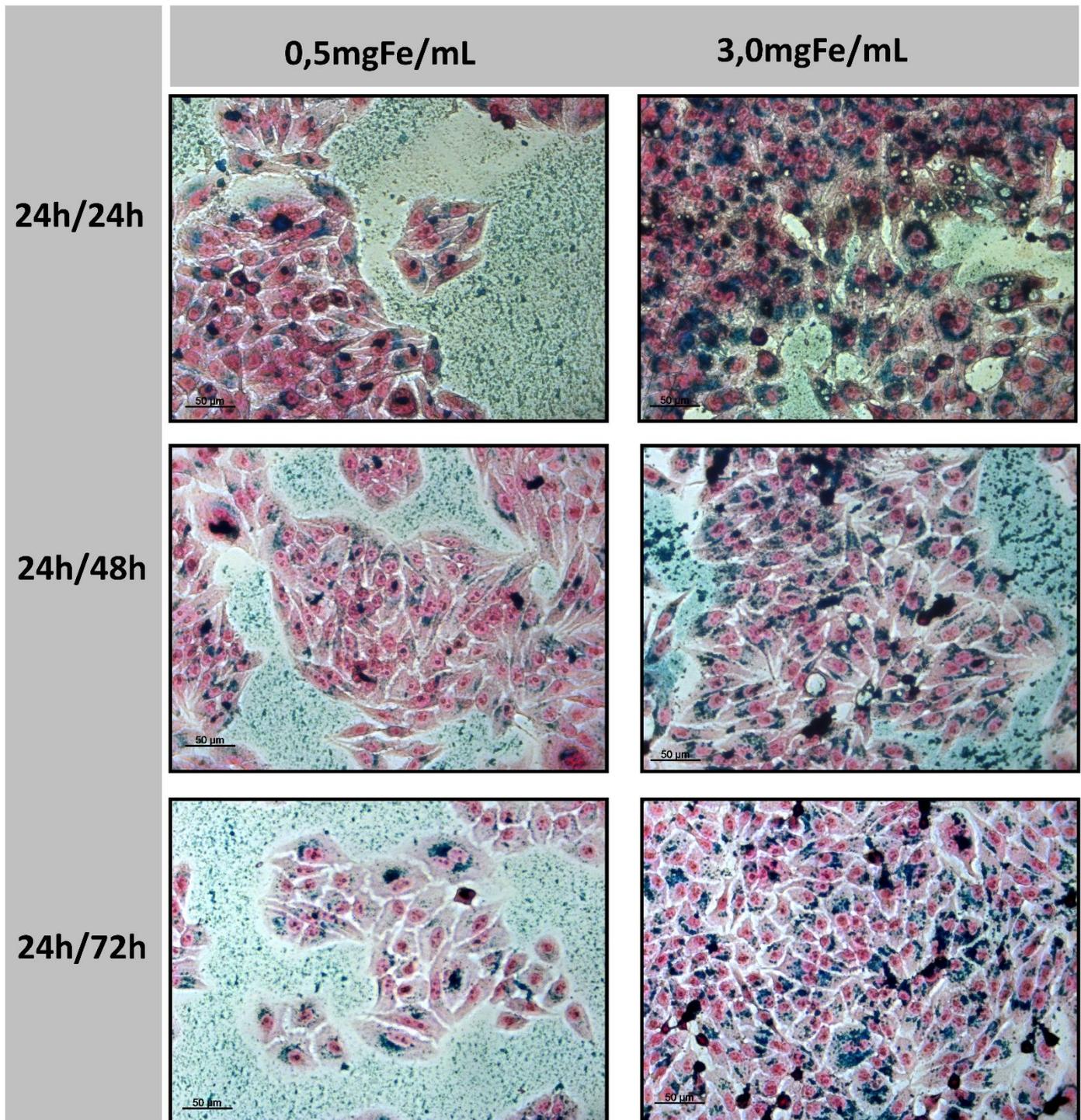
Gu *et al*, 2011 demonstrou pelo método de coloração de Azul da Prússia que em células de macrófago de murino RAW264 a internalização de SPIONs era tempo e concentração dependente. A detecção do ferro é evidente após o tratamento com as nanopartículas por 24 e 48h (Fig13). Pode-se afirmar que o ferro é internalizado e localiza-se majoritariamente no citoplasma. A presença dos vacúolos nas células expostas a 3mgFe/mL não provocou alteração visível em resposta à presença do ferro. As diferentes vias de captação celular de SPIONs (Fig4) incluem difusão passiva, endocitose mediada por receptor, endocitose mediada por clatrina e caveolina ou fagocitose (Panyam *et al*, 2002; Hillaireau *et al*, 2009). Além da captação de ferro pelas vias citadas as nanopartículas e, por consequência o ferro, também podem ser excretadas do meio intracelular (Sakhtianchi *et al*, 2013).



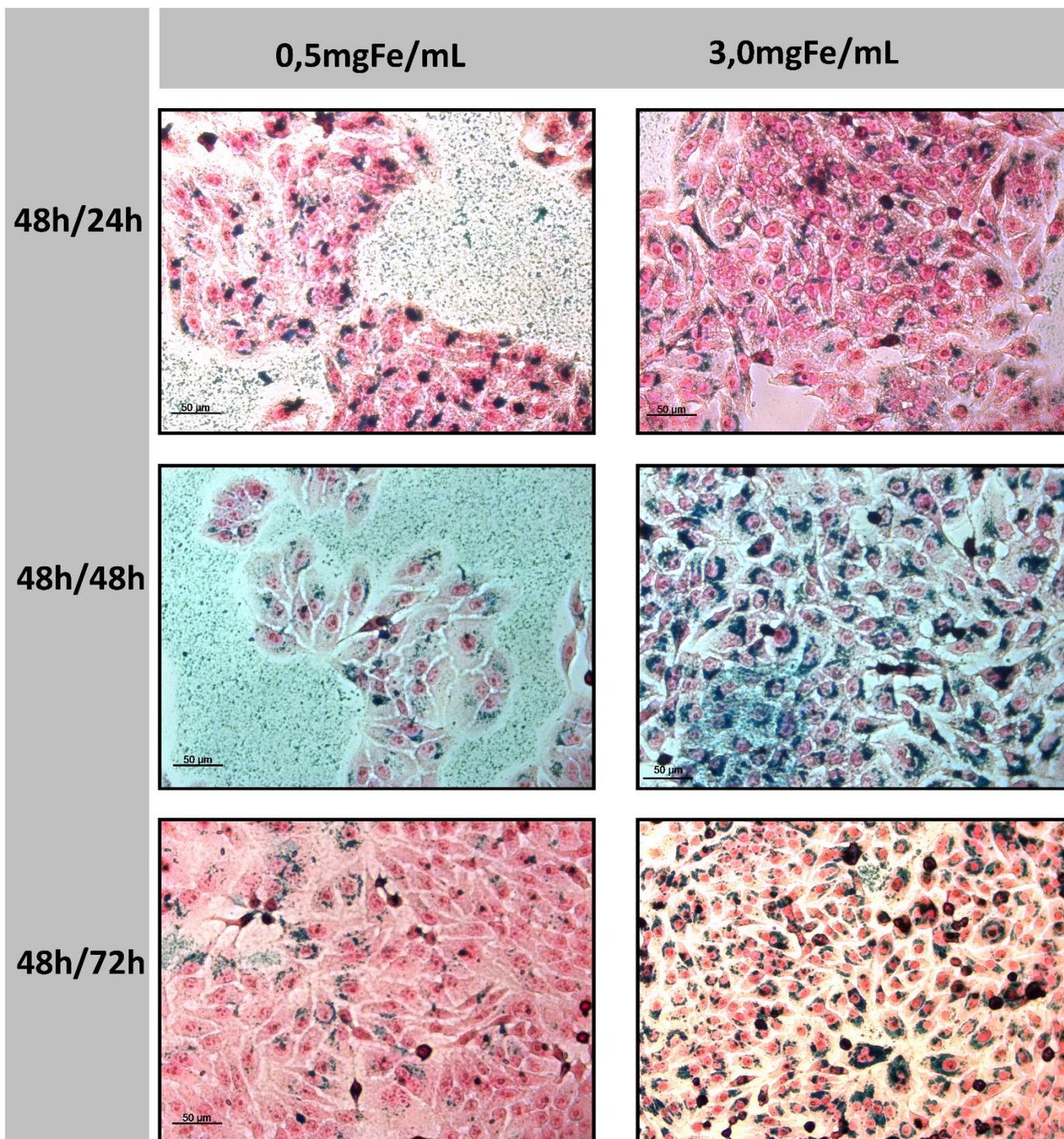
**Figura 13. Células HSG coradas pelo método Azul da Prússia após 24h e 48h de tratamento com NPM-citrato a [0,5mgFe/mL] e [3,0mgFe/mL]. Células sem tratamento (A e D); Após 24h de tratamento com [0,5mgFe/mL] (B) [3,0mgFe/mL] (C); Após 48h de tratamento com [0,5mgFe/mL] (E) e [3,0mgFe/mL] (F) Barra de escala: 50µm.**

Em geral, o destino das NPs nas células e sua distribuição nas organelas são influenciados pelas vias de captação. As características das partículas (tamanho, forma e propriedades da cobertura) bem como o tipo celular também influencia no padrão de endocitose e exocitose bem como o tempo de retenção intracelular das partículas. (Cartiera *et al*, 2009, Chu *et al*, 2011)

Wang *et al*, 2012 mediu a captação e excreção de nanopartículas de CuO em células A549 e observou que as NPs localizadas na mitocôndria e no núcleo não foram excretadas pelas células. Chu *et al*, 2011 demonstrou que NPs de sílica em lisossomos de células H1299 são exocitadas mais facilmente quando comparadas a NPs no citoplasma, enquanto que Stayton *et al*, 2009 mostrou que NPs que saem de vesículas endocíticas ou lisossomos para o citoplasma têm mais dificuldade na exocitose. Isto ocorre pois, num processo típico de exocitose, as NPs são inicialmente englobadas em lisossomos antes de serem transportadas para a membrana celular para excreção.



**Figura 14. Ensaio Azul da Prússia transiente em células HSG após 24h de tratamento.** As células foram tratadas por 24h com NPM-citrato a 0,5 e 3,0mgFe/mL. Após 24h o meio celular foi substituído por meio novo livre de nanopartículas. As células foram coradas e analisadas após 24h (24h/24h), 48h (24h/48h) e 72h (24h/72h) após a substituição do meio. Barra de escala: 50nm.



**Figura 15. Ensaio Azul da Prússia transitente em células HSG após 48h de tratamento.** As células foram tratadas por 48h com NPM-citrato a 0,5 e 3,0mgFe/mL. Após 24h o meio celular foi substituído por meio novo livre de nanopartículas. As células foram coradas e analisadas após 24h (48h/24h), 48h (48h/48h) e 72h (48h/72h) após a substituição do meio. Barra de escala: 50µm.

Com o propósito de analisar se as NPs permaneciam no espaço intracelular após a retirada do meio contendo as nanopartículas, um ensaio transiente foi estabelecido como mostrado na figura 6. As células foram tratadas com as nanopartículas a 0,5mgFe/mL e 3,0mgFe/mL por 24 (Fig 14) e 48h (Fig 15). O experimento gerou um resultado interessante pois apesar de o ferro não ter sido eliminado ou foi parcialmente eliminado, os vacúolos de gás que se formaram após a exposição de 3,0mgFe/mL não são evidenciados após a retirada das nanopartículas. Após 24h da retirada do tratamento das células tratadas por 24 e 48h restam apenas alguns vacúolos e 72h após a retirada em ambos os tempos de exposição, o fenótipo desaparece. Podemos inferir portanto, que o acúmulo de ferro não é responsável pela formação dos vacúolos de gás. A exocitose tampouco foi evidenciada já que o ferro continua presente no meio intracelular. Outros experimentos podem ser realizados para determinar se após um período maior (96h, 120h) ocorre essa excreção do ferro. Presume-se que as NPs estejam retidas em alguma organela que não os lisossomos dificultando a exocitose. Porém, mais experimentos são necessários para maiores elucidações do que pode estar ocorrendo com as nanopartículas, seu destino e vias de exocitose, se é que elas ocorrem neste tipo celular.

Como dito anteriormente, o ferro é essencial para o crescimento e homeostase celular, mas é potencialmente tóxico para células e tecidos já que o ferro em excesso pode contribuir para a iniciação e crescimento tumorais. Porém, em um estudo de Huang *et al*, 2013 o estresse oxidativo causado pela exposição a nanopartículas foi utilizado de forma benéfica para o tratamento de tumores. A  $\beta$ -lapachona ( $\beta$ -lap), uma nova droga antitumoral mostrou uma especificidade considerável ao câncer por aumentar seletivamente o estresse por espécies reativas de oxigênio (ROS) em células tumorais. Neste estudo, Huang et al demonstraram um sinergismo entre a  $\beta$ -lap e SPIONs *que* aprimorou a terapia contra o câncer. Estas SPIONs liberam seletivamente em pH ácido íons de ferro no interior de células tumorais que interagem com peróxido de hidrogênio gerado pela  $\beta$ -lap de maneira tumor-específica. Através da reação de Fenton, estes íons de ferro aumentam consideravelmente os níveis de estresse por ROS em células tumorais expostas a  $\beta$ -lap. Desta forma, o grupo autor deste trabalho, demonstrou que o estresse oxidativo pode ser utilizado de maneira favorável em novas terapias contra células tumorais.

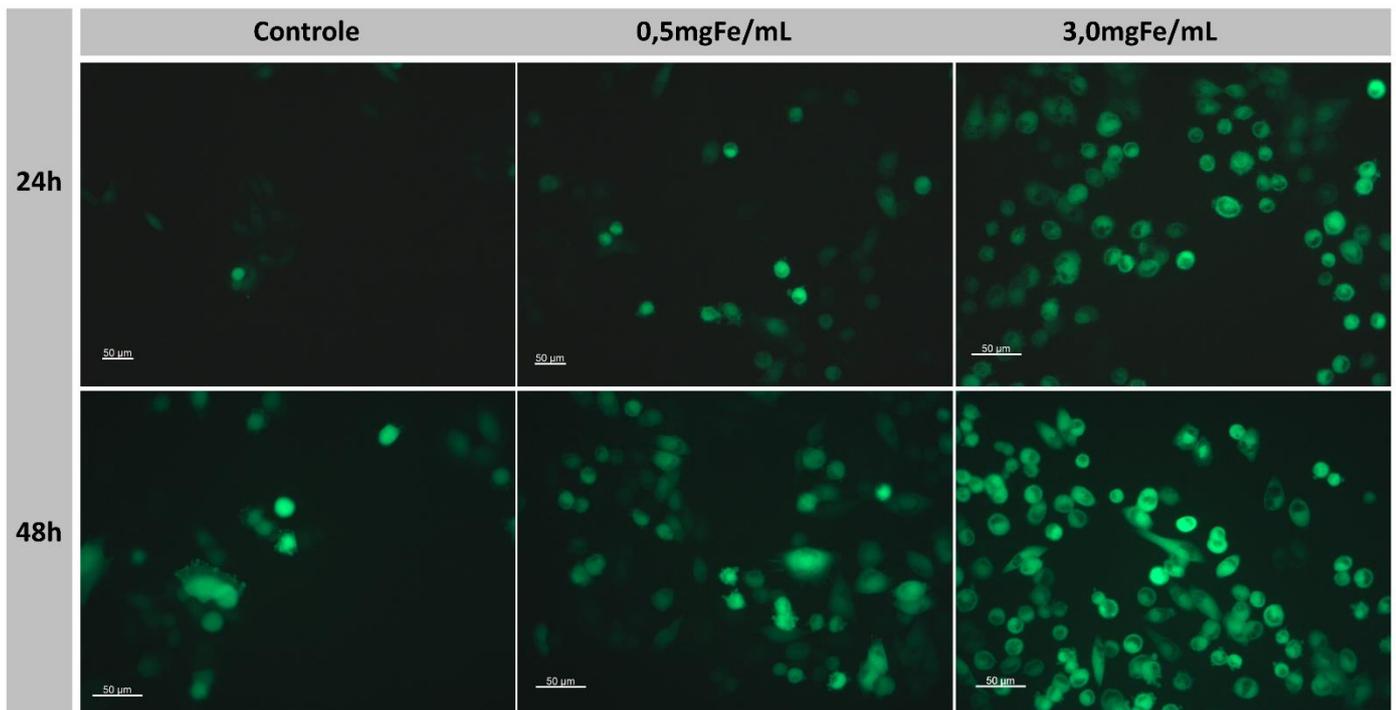
#### **4.4. Análise da produção de ROS em células HSG**

Após a captação celular, as nanopartículas permanecem em lisossomos até que sejam decompostas em ferro livre que é liberado no citoplasma. A concentração de ferro celular total aumenta e pode contribuir com variações na expressão da Ferritina e produção de espécies reativas de oxigênio. Avaliou-se, portanto, a produção de ROS em células HSG tratadas com 0,5mgFe/mL e 3,0mgFe/mL por 24h e 48h como descrito na seção 3.6 por ensaio de H<sub>2</sub>DCF-DA. A presença de espécies reativas de oxigênio relevou ser dose e tempo-dependentes.

Podemos afirmar que as nanopartículas de ferro recobertas com citrato induzem uma maior produção de espécies reativas de oxigênio podendo acarretar danos celulares decorrente de estresse oxidativo. A maioria dos eventos celulares não são independentes e isolados, portanto, um distúrbio pode causar danos em diferentes compartimentos e vias celulares, assim como uma cascata de desordem intracelular. O estresse oxidativo causado por nanopartículas, por exemplo, tem implicações diretas na expressão gênica e cada vez mais estudos, ainda que recentes, comprovam a participação de espécies reativas de oxigênio em alterações epigenéticas.

Napierska *et al*, 2012 demonstraram que nanopartículas de sílica (SiO<sub>2</sub> NPs) induziram em células epiteliais humanas o mRNA de heme oxigenase-1 (HO-1), um marcador de estresse oxidativo. A estabilidade do DNA também pode ser afetada em decorrência de danos causados pelo estresse oxidativo. Uma instabilidade pode comprometer as interações DNA – DNMTs causando uma hipometilação do DNA. Conseqüentemente, a produção de ROS pode alterar a expressão de genes que são regulados via metilação do DNA.

Foi realizado o experimento para a quantificação das espécies reativas de oxigênio, porém, os resultados foram inconclusivos devido a uma interferência na leitura da absorvância no espectrofotômetro. Essa interferência deve-se à coloração amarronzada das nanopartículas que dificulta experimentos colorimétricos ou que requerem leitura em espectrofotômetro.



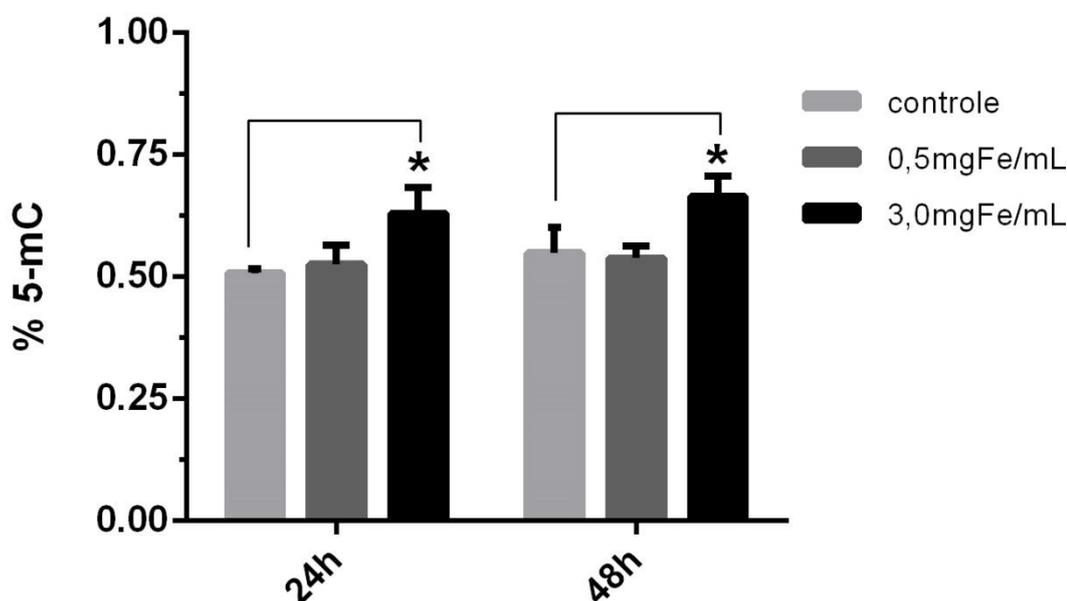
**Figura16. Presença de espécies reativas de oxigênio em células HSG tratadas com NPs a 0,5mgFe/mL e 3,0mgFe/mL por 24h e 48h. É visível que quanto maior o tempo e a concentração de exposição, maior a presença de ROS. Barra de escala: 50μm.**

#### 4.5. Análise de efeitos epigenéticos

Nanopartículas podem afetar o padrão de metilação global do DNA e/ou alterar modificações pós-traducionais em histonas. Portanto, são considerados agentes epigenéticos. (Mazumder *et al*, 2007).

Com base nesta literatura, ensaios de metilação global de DNA e de acetilação das histonas H3 e H4 fizeram parte deste estudo para melhor caracterizar o comportamento de células HSG expostas a nanopartículas recobertas com citrato.

4.5.1. Perfil de metilação global de DNA de células HSG tratadas com NPM-citrato por 24h e 48h



**Figura 17. Quantificação de metilação de DNA global.** Perfil de metilação de DNA global em células HSG tratadas com PBS, NPM-citrato 0,5mgFe/ml e NPM-citrato 3,0mgFe/ml por 24h e 48h. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one-way com pós-teste Tukey.

Foi observado um aumento na porcentagem de metil-citosina em células tratadas com 3,0mgFe/mL por 24h e 48h em relação ao controle e a células tratadas com 0,5mgFe/mL. Este ensaio não permite a identificação de regiões do DNA diferencialmente metiladas, mas informa se existem diferenças no perfil de metilação do genoma como um todo. Neste caso, podemos considerar que as nanopartículas induziram uma hipermetilação do DNA a nível global. Bonadio *et al*, 2014 relatou que as NPM-citrato em uma concentração de 60ug/mL induziram uma hipometilação de DNA em células de câncer mamário MCF-7, e que esse perfil é posteriormente restaurado. A concentração utilizada por Bonadio *et al*, foi 50 vezes menor do que a utilizada no presente trabalho. Podemos inferir portanto, que diferentes concentrações de uma mesma nanopartícula podem induzir alterações epigenéticas diferentes dependendo do tipo celular e tempo de exposição.

Em outro trabalho, partículas de sílica SiO<sub>2</sub> NPs em células de queratinócito humano (HaCaT) induziram uma hipometilação global de DNA associada a uma diminuição na expressão de DNMT1 e DNMT3a (Gong *et al*, 2010). O mesmo grupo observou que SiO<sub>2</sub> NPs foram capazes de induzir uma hipermetilação do gene PARP-1 nessas mesmas células HaCaT, com simultânea diminuição de PARP-1 a nível de expressão gênica e seus níveis proteicos. O gene PARP-1 codifica para a proteína de reparo do DNA poly-ADP-ribose

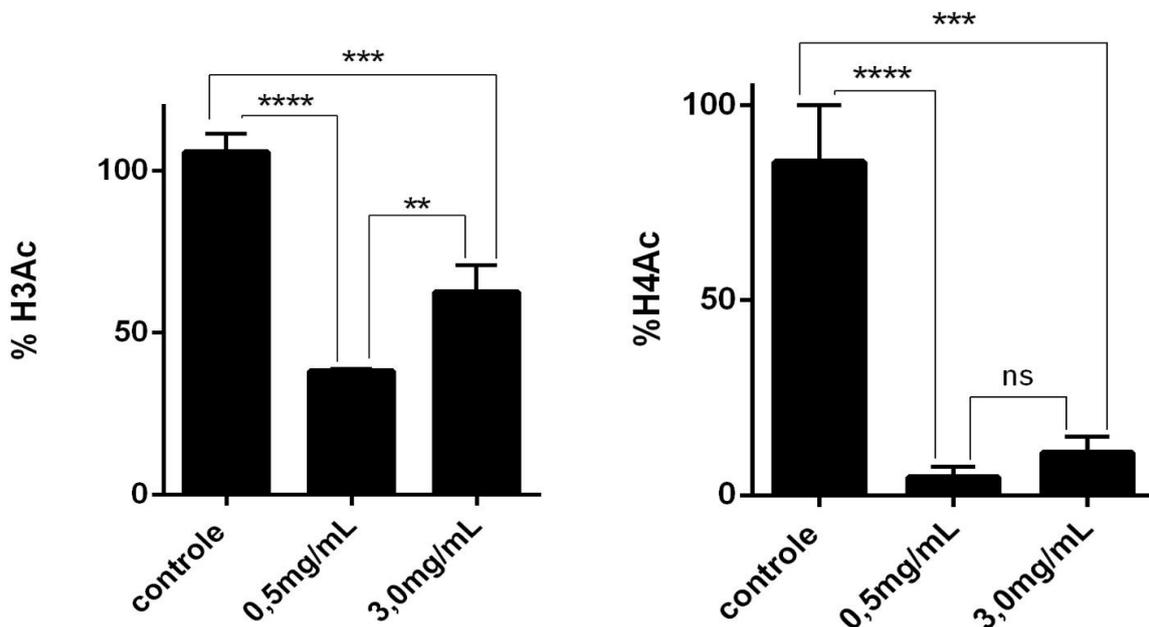
polimerase-1, ativada por quebras na fita de DNA. PARP-1 possui a função de ribosilar proteínas envolvidas no processo de reparo do DNA incluindo histonas. Esta ribosilação induz um relaxamento da cromatina que permite o acesso da maquinaria de reparo na fita de DNA (Kauppinen and Swanson, 2007).

Nosso resultado, embora preliminar, informa que há uma perturbação no perfil epigenético nas células tratadas com a maior concentração de nanopartículas testada. Tal modificação no padrão de metilação do DNA pode acarretar diferenças na expressão de genes ligados a padrões epigenéticos como DNMTs e HDACs bem como genes vitais para o correto funcionamento celular, como genes relacionados ao metabolismo do ferro, ciclo celular e apoptose, estresse oxidativo, entre outros.

Outra modificação observada neste e em outros trabalhos inclui a modificação das proteínas histonas. Pelo ensaio de quantificação de acetilação das histonas H3 e H4, foi possível analisar também os efeitos causados pelas nanopartículas a nível de modificação de histonas. Foram incluídas no trabalho as histonas H3 e H4.

#### *4.5.2. Quantificação de acetilação das proteínas Histona H3 e H4 de células HSG tratadas com NPM-citrato por 24h*

Podemos observar na figura 18 que a acetilação tanto da histona 3 quanto da histona 4 sofreu uma diminuição. Em ambas as concentrações de ferro foi observada uma diminuição na porcentagem de H3 e H4 acetiladas em relação ao controle. A acetilação da H3 diminui para 38% e 62% após os tratamentos com 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL, respectivamente. Para a H4 a hipoacetilação foi mais acentuada, diminuindo de 82% para 4% e 10% após os tratamentos com 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL, respectivamente. A acetilação e desacetilação de histonas é um mecanismo regulado por HATs e HDACs, respectivamente. A hipoacetilação, ou uma diminuição na acetilação, está relacionada a uma cromatina mais condensada e a uma repressão da transcrição. No presente trabalho foram quantificados o número de transcritos de *HDAC1* e *HDAC2* (Fig 20 e 21).



**Figura 18. Porcentagem de acetilação de Histonas H3 e H4.** Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one-way com pós-teste Tukey.

Não podemos afirmar que estas nanopartículas penetraram no núcleo causando diretamente esta modificação por interação com o DNA pois não foram realizados experimentos que comprovem as vias de entrada e tráfego intracelular destas partículas. Podemos apenas inferir que a exposição das células HSG a nanopartículas de óxido de ferro foi capaz de induzir estas alterações. Uma avaliação da exata localização e distribuição destas nanopartículas após entrada na célula complementar a explicação dos resultados obtidos neste trabalho.

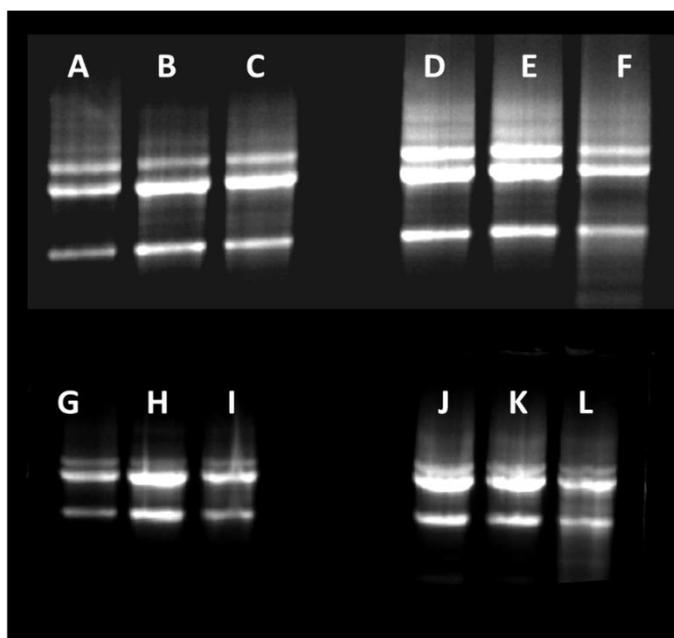
Quantum dots (QDs) em baixas concentrações são considerados ativadores epigenéticos da expressão de oncogenes. Em células de câncer de mama tratados por QDs, Choi *et al*, 2008 observou duas modificações epigenéticas: uma hipoacetilação da histona 3 e a condensação da cromatina foi associada a uma *down*-regulação na transcrição de genes antiapoptóticos. Nanopartículas de ouro (AuNPs) diminuíram a atividade de HDACs por se ligarem a grupos sulfidríla da superfície da HDAC8 (Sule *et al*, 2008).

Podemos afirmar portanto, que nossos resultados são consistentes com a literatura. Porém, vale ressaltar que cada nanopartícula apresenta um comportamento diferente em cada tipo celular, que está intimamente relacionado a suas propriedades físico-químicas, vias de entrada no espaço intracelular, localização e biodistribuição. Sendo assim, podemos apenas inferir que as modulações epigenéticas apresentadas neste trabalho se restringem às nanopartículas de óxido de ferro recobertas com citrato em células HSG. Além disso, é preciso avaliar diferenças na expressão gênica a fim de propor um mecanismo de regulação genética e

epigenética destas células quando expostas às NPs. Considerando esta afirmação, foram realizados ensaios de PCR em tempo real como sete genes para melhor descrever esta interação célula-partícula a nível de expressão de transcritos.

#### 4.6. Extração de RNA e PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) para análise do acúmulo de transcritos de genes alvo

Para a esclarecer as bases moleculares das alterações de metilação e acetilação observadas nas células HSG expostas a NPM-citrato, foi analisado o acúmulo de transcritos correspondentes aos genes de duas DNA metiltransferases (*DNMT1* e *DNMT3A*), duas histonas deacetilases (*HDAC1* e *HDAC2*), aos genes de ferritina L e H envolvidos no metabolismo do ferro (*FERRL* e *FERRH*) e ao gene *COX-2* que possui papel importante na resposta inflamatória induzida por estímulos de estresse. O RNA total das células foi extraído como descrito no item 3.9.1 e por eletroforese em gel de agarose foi possível determinar sua integridade. É possível notar que os RNAs extraídos estavam íntegros e livres de contaminação com DNA (Fig.19). Estas amostras foram utilizadas para a síntese de moléculas de cDNA e posterior quantificação relativa de transcritos *FERRL*, *FERRH*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *HDAC1*, *HDAC2* e *COX-2* em relação ao controle endógeno *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).



**Figura 19.** Eletroforese em gel de agarose a 1% das amostras de RNA utilizados na síntese de cDNAs. Os RNAs utilizados encontram-se íntegros e sem contaminação. As imagens referem-se a uma replicata biológica independente de extração de RNA de células HSG após tratamento com NPM-citrato a 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL por 24h e 48h. A, G) Controle 24h; B, H) 0,5 mgFe/mL 24h; C, I) 3,0 mgFe/mL 24h; D, J) Controle 48h; E, K) 0,5 mgFe/mL 48h F, L) 3,0 mgFe/mL 48h.

A partir dos ensaios de qRT-PCR, foram gerados dois resultados referentes ao acúmulo de transcritos dos genes citados nas células expostas por 24h e 48h às NPM-citrato nas concentrações de 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL. A diferença mais expressiva e significativa que podemos observar é o aumento do acúmulo de transcritos referentes ao gene COX-2 (Fig21).

O gene COX codifica para uma enzima chave para a conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas. A enzima COX-1 é expressa constitutivamente e é responsável pela manutenção da homeostase na maioria das células. COX-2, por outro lado, sob condições normais, é minimamente detectável, mas induzida por diferentes estímulos como fatores pró-inflamatórios, fatores de crescimento e estresse oxidativo (Seibert *et al*, 1994). Níveis de COX-2 elevados foram descritos em cânceres de cabeça e pescoço, esôfago, pâncreas, pulmão, mama e fígado. A ativação de COX-2 é um evento precoce durante a carcinogênese e participa no crescimento e migração do tumor por afetar a mitogênese, adesão celular, a apoptose e a angiogênese.

A indução do gene COX-2 envolve modificações da cromatina sendo destaque a acetilação e desacetilação de histonas. Cao *et al*, mostrou que DEP (Diesel exposure particles) aumenta a acetilação da histona H4 associada com o promotor de COX-2 e causa degradação da histona deacetilase-1 (HDAC1). A exposição ao DEP aumentou a acetilação na histona H4 associada ao promotor de COX-2, mas o mesmo não foi observado na histona H3. Após o tratamento destas células com DEP, o gene COX-2 encontrou-se superexpresso assim como a acetilação da histona H4 no promotor deste gene. Tal fenômeno é mediado pela degradação seletiva na enzima HDAC1, sugerindo portanto, que a acetilação é um fator importante na expressão de COX-2. Cao *et al*, 2007, demonstrou que partículas de diesel (DEP) são capazes de induzir a expressão do gene COX-2 em células de epitélio bronquial (BEAS-2B) a nível transcricional e proteico.

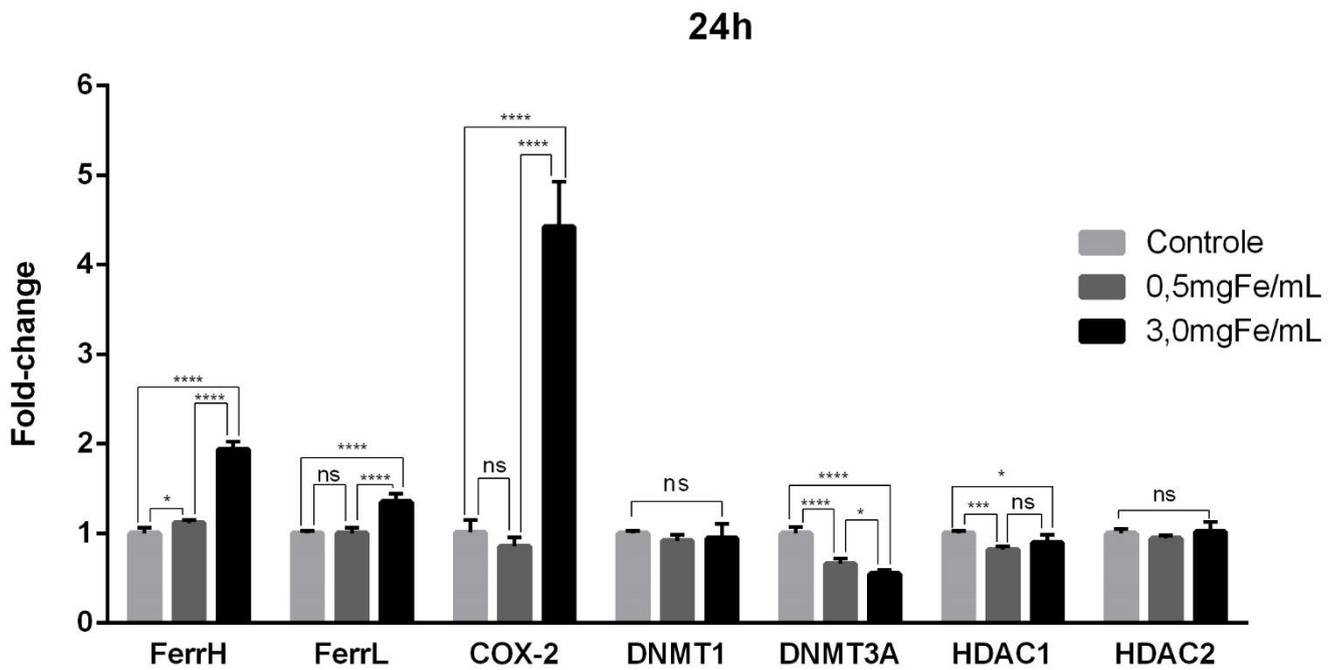


Figura 20. Quantificação dos transcritos *FERRL*, *FERRH*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *HDAC1*, *HDAC2* e *COX-2* em relação ao controle endógeno *GAPDH* após 24h de exposição a NPM-citrato. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one-way com pós-teste Tukey.

Neste trabalho, *COX-2* apresentou o mesmo perfil nos dois tempos e concentrações de

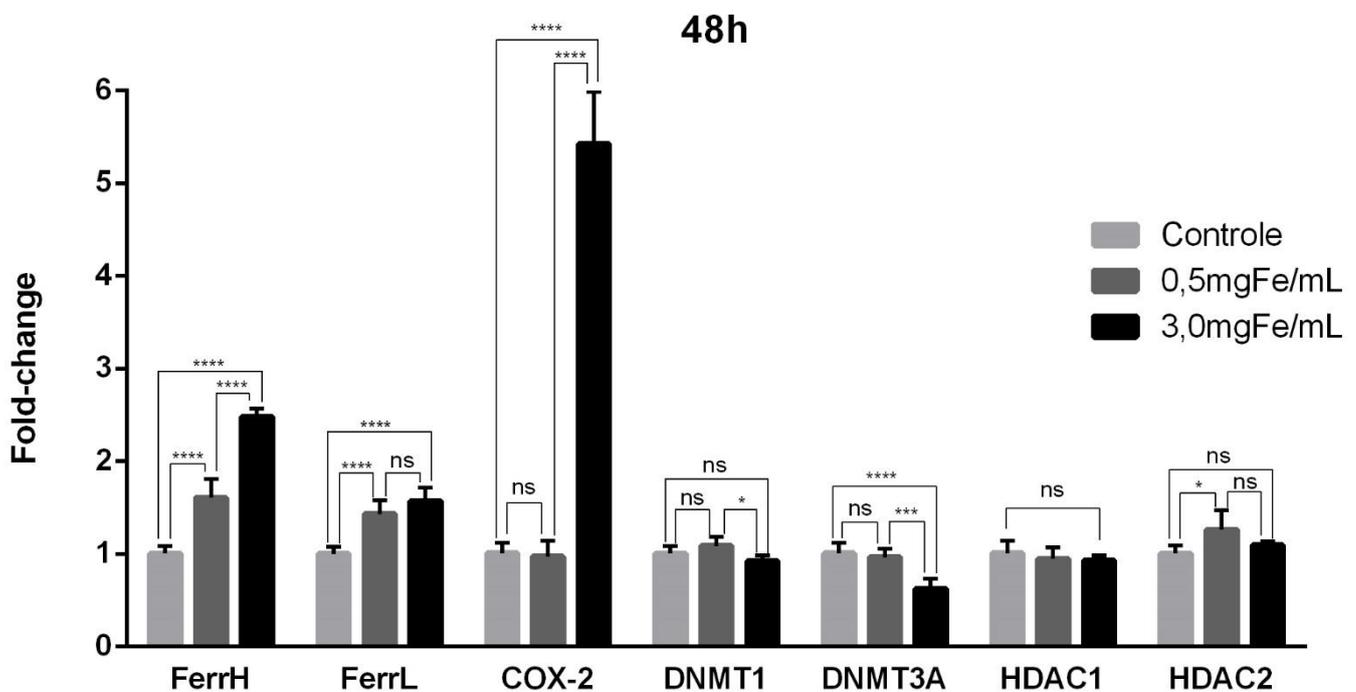


Figura 21. Quantificação dos transcritos *FERRL*, *FERRH*, *DNMT1*, *DNMT3a*, *HDAC1*, *HDAC2* e *COX-2* em relação ao controle endógeno *GAPDH* após 48h de exposição a NPM-citrato. Foi utilizado o teste estatístico ANOVA one-way com pós-teste Tukey.

exposição: o acúmulo de transcritos é visível após 24h e 48h na concentração de 3,0 mgFe/mL (Fig20 e Fig21), mas o mesmo não ocorreu na concentração de 0,5 mgFe/mL. Os transcritos de *HDAC1* e *HDAC2* também apresentaram alterações em relação ao controle (Fig20 e Fig21). Interessantemente, houve uma diminuição de *HDAC1* assim como descrito por Cao *et al*, 2007 e um aumento de *HDAC2*, o que corresponde a uma diminuição da acetilação de histonas, como observado na figura 20. Ainda que esta diminuição de *HDAC1* e aumento de *HDAC2* ocorra em tempos diferentes (24h e 48h, respectivamente), podemos considerar como eventos interligados que ocorrem em diferentes períodos. Seria interessante realizar a mesma avaliação do acúmulo de transcritos em tempos posteriores aos utilizados neste trabalho para analisar o comportamento destes genes ao longo de diferentes tempos de exposição. Considerando que as marcas epigenéticas estão em constante modificação e regulação, poderíamos esperar um comportamento diferente para cada período de exposição.

Houve ainda uma diminuição nos transcritos referentes ao gene *DNMT3a*, uma metiltransferase *de novo* após 24 h e 48 h de exposição, e uma diminuição de *DNMT1*, uma metiltransferase de manutenção, após 48 h (Fig20 e Fig21). Esta diminuição tanto das DNMTs *de novo* e de manutenção não foi o esperado já que a quantificação da metilação global de DNA indicou um aumento na metilação em células tratadas com 3,0 mgFe/mL. Seria necessário analisar a expressão de outras metiltransferases para relacionar esses dois fenômenos e assim candidatar um responsável pelo aumento da metilação.

Finalmente, os genes das Ferritinas L e H também sofreram um aumento após 24h e 48h de exposição. Em relação ao gene da Ferritina H, podemos observar um padrão semelhante em células expostas a 24h e 48h. Nos dois tempos de exposição, ocorreu um aumento no acúmulo de transcritos em relação ao controle, onde o maior aumento deu-se em células expostas à concentração de 3,0 mgFe/mL (Fig 20 e Fig 21). Apesar de menos acentuado na condição de 0,5 mgFe/mL-24h, observa-se um aumento significativo para a mesma concentração após 48h. Para o gene da Ferritina L, também houve aumento significativo dos níveis de transcritos na maior concentração (3,0 mgFe/mL) tanto em 24h como em 48h. No período de 24h, a 0,5 mgFe/mL não houve alteração em relação ao controle, mas sim em relação à concentração de 3,0 mgFe/mL (Fig20). No período de 48h observamos que entre o controle e a concentração de 0,5 mgFe/mL houve um aumento enquanto que entre as concentrações 0,5 mgFe/mL e 3,0 mgFe/mL, os níveis permaneceram constantes (Fig21). Os genes *FERRH* e *FERRL* codificam para subunidades H e L, respectivamente, da proteína Ferritina, responsável por captar os átomos livres em excesso e armazená-los, evitando assim o seu acúmulo intracelular e geração de radicais livres.

A Ferritina é uma proteína de 24 sub-unidades compostas por dois tipos de subunidades: subunidade da Ferritina de cadeia pesada e subunidade de cadeia leve. Esta proteína é regulada pelas proteínas reguladoras de ferro (IRP1 e IRP2 – iron-regulatory protein), que reprimem a expressão de Ferritina pós-transcricionalmente (Waldvogel-Abramowski *et al*, 2014).

Tanto a downregulação quanto a upregulação de Ferritina podem contribuir para a sobrevivência do tumor dependendo do contexto celular (Alkhateeb et al, 2013). A upregulação da Ferritina pode contribuir com a sobrevivência de células inflamatórias, enquanto que sua downregulação pode aumentar a disponibilidade metabólica do ferro nas células tumorais, ainda que ao custo de um estresse oxidativo persistente.

Neste trabalho, houve um aumento no acúmulo de transcritos da Ferritina L e H, provavelmente como consequência do excesso de ferro intracelular. Seria interessante avaliar os níveis de expressão de outros genes relacionados ao metabolismo do ferro como as proteínas reguladoras da homeostase do ferro (IRP-1 e IRP2); o transportador de  $\text{Fe}^{+2}$  DMT1 (Divalent metal transporter); transferrina (TF) e o receptor de transferrina (TFR1).

Além disso, uma análise da expressão de outros genes relacionados ao estresse oxidativo nos proporcionaria um melhor entendimento desta resposta. Os antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, a catalase, que decompõe  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , e a glutathiona peroxidase, outra enzima responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos, seriam os principais candidatos.

## **CONCLUSÕES**

## 5.CONCLUSÕES

Vários estudos sobre SPIONs, incluindo os aprovados comercialmente como agentes de contraste (Feridex® e Resovist®) afirmam que estas nanopartículas são biocompatíveis e não apresentam citotoxicidade. O conceito de biocompatibilidade está focado na citotoxicidade observada. Porém, o critério que define a toxicidade de nanopartículas precisa ser aprimorado já que cada vez mais estudos apontam respostas celulares aberrantes, que incluem o estresse oxidativo, danos ao DNA e alterações na expressão gênica, decorrentes da exposição a SPIONs com ausência de citotoxicidade.

Não existe nenhum consenso sobre os riscos, tolerância e toxicidade para a maioria dos nanomateriais. É comum encontrar na literatura opiniões divergentes sobre a segurança de um mesmo nanomaterial em um mesmo sistema biológico (Jones & Grainger, 2009).

Singh et al, 2008 enumeraram várias questões que ainda necessitam se esclarecimento antes da aprovação clínica do uso de SPIONs. Tais questões incluem: a dinâmica de biodistribuição e excreção destas nanopartículas; o impacto que estas nanopartículas teriam na morfologia e funções das células expostas; a degradação das SPIONs que acontece nos lisossomos com geração de íons de ferro livre e o impacto em vários processos celulares; a resposta de órgãos e maquinarias celulares a SPIONs ou como as SPIONs são processadas através de processos endocíticos em diferentes tecidos. Estas perguntas são essenciais não só para a continuação do uso destas nanopartículas na medicina mas também para o estabelecimento de novas terapias a serem adotadas pela comunidade médica.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem novas características da interação das NPM-citrato com células HSG a serem descritas. Não podemos ainda nos posicionar sobre a segurança destas nanopartículas no microambiente *in vitro* das células HSG. O que podemos afirmar é que os resultados obtidos neste trabalho caracterizam o comportamento destas células à exposição a nanopartículas de maghemita recobertas com citrato. É possível que todos os resultados aqui descritos estejam interligados e sejam explicados com base no que já se conhece sobre nanopartículas. Porém, outros experimentos devem ser realizados para afirmar os eventos observados. Não há literatura disponível sobre o comportamento das células HSG expostas a NPM-citrato sendo este o primeiro a elucidar os efeitos desta interação.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXIOU, C., SCHMID, R. J., JURGONS, R., KREMER, M., WANNER, G., BERGEMANN, C., PARAK, F. G. (2006). Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. **European Biophysics Journal**, 35, 446–450.
- ALKHATEEB, A. A., HAN, B., & CONNOR, J. R. (2013). Ferritin stimulates breast cancer cells through an iron-independent mechanism and is localized within tumor-associated macrophages. **Breast Cancer Research and Treatment**, 137, 733–744.
- BONADIO, R. S. (2014). Perfil de metilação global de DNA em células MCF-7 e MCF-10A após exposição transiente de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato.
- CAO, D., BROMBERG, P. A., & SAMET, J. M. (2007). COX-2 expression induced by diesel particles involves chromatin modification and degradation of HDAC1. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 37(2), 232–9.
- CARNEIRO, M. L. B., PEIXOTO, R. C. A., JOANITTI, G. A., OLIVEIRA, R. G. S., TELLES, L. A. M., MIRANDA-VILELA, A. L., BÃO, S. N. (2013). Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, 11(li), 4.
- CARTIERA, M. S., JOHNSON, K. M., RAJENDRAN, V., CAPLAN, M. J., & SALTZMAN, W. M. (2009). The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. **Biomaterials**, 30, 2790–2798.
- CHOI, A. O., BROWN, S. E., SZYF, M., & MAYSINGER, D. (2008). Quantum dot-induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells. **Journal of Molecular Medicine**, 86(3), 291–302.
- CHU, Z., HUANG, Y., TAO, Q., & LI, Q. (2011). Cellular uptake, evolution, and excretion of silica nanoparticles in human cells. **Nanoscale**, 3, 3291–3299.
- CONROY, J., BYRNE, S. J., GUN'KO, Y. K., RAKOVICH, Y. P., DONEGAN, J. F., DAVIES, A., VOLKOV, Y. (2008). CdTe nanoparticles display tropism to core histones and histone-rich cell organelles. **Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)**, 4(11).
- DREADEN, E. C., ALKILANY, A. M., HUANG, X., MURPHY, C. J., & EL-SAYED, M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, 41(7), 2740–79.
- DURNEV, A. D. (2008). Toxicology of nanoparticles. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, 145(1), 72–4.
- ELIAS, A., & TSOURKAS, A. (2009). Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. **American Society of Hematology**, 720–726.
- FREITAS, E. R. L. DE, SANTOS, R. L. DOS, LIMA, E. C. D. O., & GUILLO, L. A. (2013). Feeder-free culture of human embryonic stem cell line BG01V/hOG using magnetic field-magnetic nanoparticles system. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie**, 67, 17–21.

- GONG, C., TAO, G., YANG, L., LIU, J., LIU, Q., & ZHUANG, Z. (2010). SiO<sub>2</sub> nanoparticles induce global genomic hypomethylation in HaCaT cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 397(3), 397–400.
- GONG, C., TAO, G., YANG, L., LIU, J., LIU, Q., LI, W., & ZHUANG, Z. (2012). Methylation of PARP-1 promoter involved in the regulation of nano-SiO<sub>2</sub>-induced decrease of PARP-1 mRNA expression. **Toxicology Letters**, 209(3), 264–9.
- GRUNSTEIN, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. **Nature**, 389, 349–352.
- GU, J., XU, H., HAN, Y., DAI, W., HAO, W., WANG, C., CAO, J. (2011). The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. **Science China. Life Sciences**, 54(9), 793–805.
- GUPTA, A. K., & CURTIS, A. S. G. (2004). Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, 15(4), 493–6.
- HASSAN, S., & SINGH, A. V. (2014). Biophysicochemical Perspective of Nanoparticle Compatibility: A Critically Ignored Parameter in Nanomedicine. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 14, 402–414.
- HILLAIREAU, H., & COUVREUR, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 66(17), 2873–96.
- HONG, S. C., LEE, J. H., LEE, J., KIM, H. Y., PARK, J. Y., CHO, J., HAN, D.W. (2011). Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. **International Journal of Nanomedicine**, 6, 3219–31.
- JAE, H. S., METZGER, S. K., & SCHOENFISCH, M. H. (2007). Synthesis of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, 129, 4612–4619.
- JENG, H. A., & SWANSON, J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering**, 41, 2699–2711.
- KAUPPINEN, T. M., & SWANSON, R. A. (2007). The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. **Neuroscience**, 145(4), 1267–72.
- LEE, H. W., LEE, E. H., HA, S. Y., LEE, C. H., CHANG, H. K., CHANG, S., SEO, J. W. (2012). Altered expression of microRNA miR-21, miR-155, and let-7a and their roles in pulmonary neuroendocrine tumors. **Pathology International**, 62(9), 583–91.
- MAHMOUDI, M., HOFMANN, H., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., & PETRI-FINK, A. (2012). Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Chemical Reviews**, 112(4), 2323–38.
- MAZUMDER, A., & SHIVASHANKAR, G. V. (2007). Gold-nanoparticle-assisted laser perturbation of chromatin assembly reveals unusual aspects of nuclear architecture within living cells. **Biophysical Journal**, 93, 2209–2216.

- MIGITA, S., MOQUIN, A., FUJISHIRO, H., HIMENO, S., MAYSINGER, D., WINNIK, F. M., & TANIGUCHI, A. (2014). Quantum dots induce heat shock-related cytotoxicity at intracellular environment. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, 50(4), 367–72.
- MOONAT, S., & PANDEY, S. C. (2012). Stress, Epigenetics, and Alcoholism. **Alcohol Research : Current Reviews**, 34, 495–505.
- MOROZ, P., JONES, S. K., & GRAY, B. N. (2001). Status of hyperthermia in the treatment of advanced liver cancer. **Journal of Surgical Oncology**, 77, 259–269.
- NACHLAS, M. M., MARGULIES, S. I., GOLDBERG, J. D., & SELIGMAN, A. M. (1960). THE determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. **Analytical Biochemistry**, 1, 317–326.
- NAQVI, S., SAMIM, M., ABDIN, M. Z., AHMED, F. J., MAITRA, A. N., PRASHANT, C. K., & DINDA, A. K. (2010). Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. **International Journal of Nanomedicine**, 5, 983–989.
- NG, C.-T., DHEEN, S. T., YIP, W.-C. G., ONG, C.-N., BAY, B.-H., & LANRY YUNG, L.-Y. (2011). The induction of epigenetic regulation of PROS1 gene in lung fibroblasts by gold nanoparticles and implications for potential lung injury. **Biomaterials**, 32(30), 7609–15.
- PANYAM, J., & LABHASETWAR, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 55(3), 329–347.
- RISOM, L., MØLLER, P., & LOFT, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. **Mutation Research**, 592(1-2), 119–37.
- SAKHIANCHI, R., MINCHIN, R. F., LEE, K.-B., ALKILANY, A. M., SERPOOSHAN, V., & MAHMOUDI, M. (2013). Exocytosis of nanoparticles from cells: role in cellular retention and toxicity. **Advances in Colloid and Interface Science**, 201-202, 18–29.
- SEIBERT K, ZHANG Y, LEAHY K. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 1994;91(25):12013-12017.
- SINGH, N., JENKINS, G. J. S., ASADI, R., & DOAK, S. H. (2010). Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). **Nano Reviews**, 1, 1–15.
- STEVENS, R. G., JONES, D. Y., MICOZZI, M. S., & TAYLOR, P. R. (1988). Body iron stores and the risk of cancer. **New England Journal of Medicine**, 319, 1047–1052.
- STROH, A., ZIMMER, C., GUTZEIT, C., JAKSTADT, M., MARSCHINKE, F., JUNG, T., ... GRUNE, T. (2004). Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. **Free Radical Biology and Medicine**, 36, 976–984.
- SULE, N., SINGH, R., & SRIVASTAVA, D. K. (2008). Alternative modes of binding of recombinant human histone deacetylase 8 to colloidal gold nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 4, 463–468.
- TOYOKUNI, S. (2009). Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease. **Cancer Science**.

- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M., & TELSER, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39, 44–84.
- VAN DEN BOS, E. J., WAGNER, A., MAHRHOLDT, H., THOMPSON, R. B., MORIMOTO, Y., SUTTON, B. S., TAYLOR, D. A. (2003). Improved Efficacy of Stem Cell Labeling for Magnetic Resonance Imaging Studies by the Use of Cationic Liposomes. **Cell Transplantation**, 12, 743–756.
- VÕSA, U., VOODER, T., KOLDE, R., VILO, J., METSPALU, A., & ANNILO, T. (2013). Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. *International Journal of Cancer*. **Journal International Du Cancer**, 132(12), 2884–93.
- WADDINGTON, C. H. (1959). Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. **Nature**, 183, 1654–1655.
- WALDVOGEL-ABRAMOWSKI, S., WAEBER, G., GASSNER, C., BUSER, A., FREY, B. M., FAVRAT, B., & TISSOT, J.-D. (2014). Physiology of iron metabolism. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, 41(3), 213–21.
- WANG, Z., LI, N., ZHAO, J., WHITE, J. C., QU, P., & XING, B. (2012). CuO nanoparticle interaction with human epithelial cells: Cellular uptake, location, export, and genotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, 25, 1512–1521.
- YOO, C. B., & JONES, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature Reviews. Drug Discovery**, 5(1), 37–50.

