

## **NANOBIOTECNOLOGIA: PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO COLORIMÉTRICO DO MTT (BROMETO DE 3-[4,5-DIMETIL-TIAZOL-2-IL]-2,5-DIFENIL-TETRAZÓLIO), PARA AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO (A549).**

**BILHALVA, Alexandre Ferreira<sup>1\*</sup>; SCHULTZE, Eduarda<sup>1</sup>; BECK, Ruy Carlos Ruver<sup>2</sup>; COLLARES, Tiago<sup>3</sup>; SEIXAS, Fabiana Kömmling<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Grupo de Pesquisa em Oncologia, Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>3</sup>Grupo de Pesquisa em Oncologia, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

\* alexandre.1290@hotmail.com

### **INTRODUÇÃO**

Muitos ensaios biológicos necessitam a análise da sobrevivência, ou proliferação de células. Essas avaliações podem ser realizadas através do ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio). Neste método é feita avaliação da atividade metabólica das células, quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH. Esse processo químico resulta na produção de cristais de formazan, intensamente corados, no interior das células. (A. Nicolau, 1999).

Um fato importante nesse ensaio é que somente células viáveis, que possuem enzimas mitocondriais ativas, podem transformar o composto MTT, da forma de sal para a forma cristalina, os cristais de formazan (Mosmann, 1983). Esses cristais posteriormente serão diluídos com solventes orgânicos, como por exemplo, o DMSO (Dimetilsulfóxido), permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria (Gerlier.D, 1986).

A tretinoína, também conhecida como ácido retinóico, é um derivado dos retinóides, que exerce atividade antiproliferativa em diversos tipos de tumores. Este composto tem sido usado como adjuvante no tratamento de leucemia promielocítica aguda com excelentes índices de remissão da doença (Huang, 1988). Entretanto, células de adenocarcinoma de pulmão humano em geral exibem uma forte resistência aos efeitos da tretinoína (Geradts, 1993), a qual parece estar relacionada com a deficiência no *up-take* celular de tretinoína nesse tipo de célula (Kawakami, 2006). Uma estratégia para aumentar a atividade antiproliferativa de tretinoína é aumentar a internalização celular do composto através de carreadores como lipossomas ou outras vesículas como nanocápsulas ou nanoesferas.

Nanocápsulas são estruturas poliméricas que contém um núcleo oleoso capaz de carrear moléculas altamente lipofílicas como a tretinoína. Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína foram previamente descritas como tendo uma alta eficiência antitumoral contra células leucêmicas (Ourique, A.F, 2010).

Neste trabalho, foi avaliada a influência das lavagens prévias no ensaio colorimétrico de MTT no resultado de proliferação de células de adenocarcinoma de pulmão (A549) quando tratadas com tretinoína nanoencapsulada, tretinoína livre, nanocápsulas vazias.

## **METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)**

As células de adenocarcinoma de pulmão (A549) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Elas foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), obtidos respectivamente da Vitrocell Embriolife (Campinas, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, USA). As células cresceram a 37 °C em estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

As células foram submetidas a um teste de triagem para a determinação da dose citotóxica de tretinoína. As células foram semeadas numa densidade de 10<sup>4</sup> células por poço em uma placa de 96 poços contendo 100 µL de DMEM + 10% de FBS (soro fetal bovino) em cada poço. Após 24 horas em estufa, a morfologia celular foi avaliada em microscópio e foram testadas as seguintes concentrações de tretinoína livre (TT): 160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5 e 1 µM nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para tanto, foi utilizada uma alíquota de tretinoína diluída em DMSO na concentração de 50.000 µM, previamente preparada para que a concentração de DMSO nos poços não ultrapassasse 0,2%, o que poderia ser tóxico para as células. Além disso, na mesma placa foram realizados os controles negativos: DMEM+FBS; DMSO e branco (sem células).

Após determinada a concentração citotóxica de tretinoína livre (TT), foram testadas nanocápsulas associadas à tretinoína com núcleo lipídico (TT-LCNC) na concentração de 0,5mg/mL e também foram avaliadas nanocapsulas de núcleo lipídico vazias (LCNC) (Ourique, A.F, 2007).

A fim de avaliar a possível interferência das nanocápsulas na formação dos cristais de formazan, foram realizados dois grupos com protocolos diferentes de MTT: 1 – com lavagem prévia a colocação do composto; 2 – sem lavagem prévia. Diferentes concentrações de TT-LCNC e LCNC foram testadas para avaliar o efeito dose-dependente na atividade antiproliferativa da formulação.

O ensaio colorimétrico foi realizado da seguinte maneira: após 72 horas de incubação das células com as respectivas concentrações de drogas, o meio foi removido. No grupo 1, no qual houve a lavagem com o PBS, foi adicionado 100µL de PBS (Tampão fosfato-salino) em cada poço, para a retirada de possíveis impurezas, como nanocápsulas, e então, a cada poço foi adicionado 20 µL de MTT (5mg/mL) com 180 µL de DMEM+FBS. No grupo 2 não foi realizada a lavagem com PBS. Após 2 horas na estufa, os cristais de formazan formados pela degradação do MTT pelas células vivas foram diluídos pela adição de DMSO e a leitura da reação foi feita em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Cada resultado foi proveniente da média das absorbâncias de 4 poços diferentes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 72 horas, o grupo com lavagem prévia a incubação com o MTT apresentou maior coloração principalmente nos poços tratados com nanocápsulas brancas, o que evidencia a interferência de resíduos de nanocápsulas na formação dos cristais de formazan.

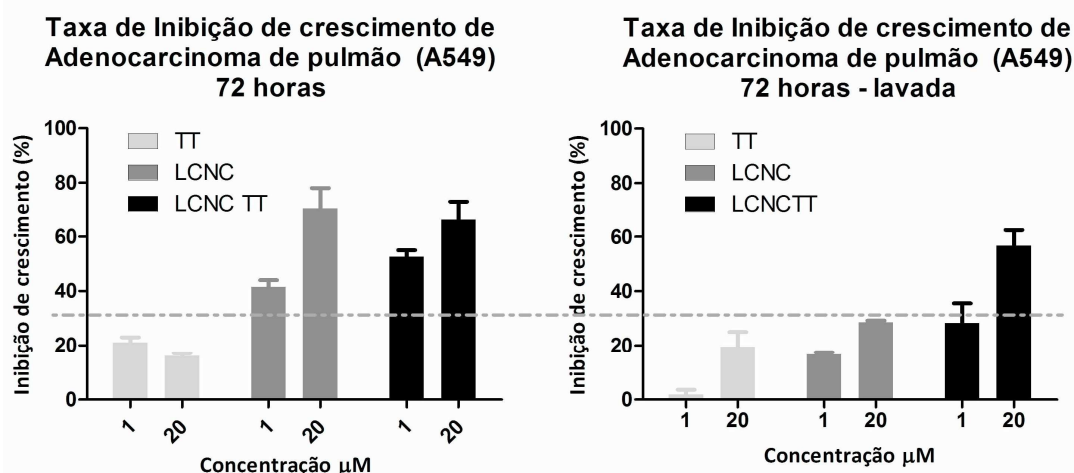


Figura 1 – Comparação da inibição do crescimento onde houve a lavagem com PBS – grupo 1, e sem lavagem com PBS – grupo 2.

TT – Tretinoína livre; LCNC – Nanocápsulas de núcleo lipídico vazias; LCNC TT - nanocápsulas de núcleo lipídico com determinada concentração de tretinoína.

Além disso, através de outros testes, como citometria de fluxo, live dead e análise microscópica da cultura celular, percebeu-se que as células tratadas com LCNC não sofrem toxicidade, o que não condiz com os resultados obtidos do ensaio do MTT e do espectrofotômetro quando não há o processo de lavagem.

A não detecção do composto MTT reduzido pelas células gerou um resultado falso, que demonstrava uma alta inibição do crescimento celular, principalmente pelas nanocápsulas brancas, como demonstrado nos gráficos, em comparação com o processo em que ocorreu a lavagem

Existem poucos artigos na literatura que demonstrem a interação do MTT com nanocompostos. Entretanto, hoje já se sabe que materiais nanoestruturados como nanotubos de carbonos de parede única podem influenciar no ensaio do MTT. Esses nanotubos se ligam aos cristais de formazan, e formam aglomerados que não permitem que os cristais sejam solubilizados, não sendo detectados no espectrofotômetro e alterando, assim, os resultados (J. M. Wörle-Knirsch, 2006), (Belyanskaya.L, 2007).

## CONCLUSÃO

Após a avaliação dos resultados, percebe-se que a lavagem dos poços com PBS, precedendo a aplicação do MTT, fornece resultados mais realistas em relação à proliferação celular, pelo fato de que essa lavagem retira as nanocápsulas que restaram nos poços após a retirada do meio de cultivo. A maneira como as

nanocápsulas interferem na formação dos cristais de formazan, influenciando os resultados do ensaio colorimétrico ainda precisa ser elucidada.

Desta forma, percebe-se a importância da padronização de ensaios colorimétricos, como o MTT, quando realizados em experimentos que envolvam nanocompostos.

## REFERÊNCIAS

BELYANSKAYA, L; MANSER, P; SPOHN, P; BRUININK, A; WICK, P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. **Carbon**. Gallen, Suíça. V.45 p. 2643 – 2648. 2007.

**CONFERÊNCIA NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE**, 6, Lisboa, 1999 - "Actas da 6.ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente". Lisboa : Universidade Nova, 1999. vol. 2, p. 789-798.

GERADTS, J; CHEN, JY; EDWARD, K; JAMES, R.; YANKASKAS, R; NIEVES, L; MINNA, J.D. Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. **Cell Growth & Differentiation**. Bethesda, EUA, v.4 p.799 – 809. 1993.

GERLIER, D; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of immunological Methods**. Lyon, França. v.94 n. 1-2, p. 57 - 63. 1986.

HUANG, ME; YE, Y.C; CHEN, SR; CHAI, JR; LU, JX; ZHOA, L; GU, LJ; WANG, ZY. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Blood**. Shanghai, China, v.62 n.2 p.567 – 572. 1988

MOSMANN, Tim. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, Palo Alto, EUA, v. 65, p. 55 - 63, 1983.

OURIQUE, A.F; POHLMANN, A.R; GUTERRES, S.S; BECK, R.C.R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International journal of Pharmaceutics**. Santa Maria, Brasil v.352 p.1 – 4. 2008.

WÖRLE-KNIRSCH, J.M; PULSKAMP, K; KRUG, H.F. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. **Nano Letters**. Karlsruhe, Alemanha v.6 n.6 p.1261 – 1268. 2006.