

Citotoxicidade de nanopartículas de ouro (AuNP) com coroa monoproteica de albumina em células de carcinossarcoma Walker 256

Palavras-Chave: 1. nanopartícula de ouro; 2. coroa de albumina; 3. citotoxicidade.

Autores(as):

1. GIOVANA HELENA PERES BIM, IB – UNICAMP

2. LUANA PEREIRA CARDOSO, IB - UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). MARCELO BIPO DE JESUS (orientador), IB - UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas apresentam diversos materiais que compõem sua estrutura, como: lipídios, carbono, polímeros, dendrímeros e metais (e.g., ferro, prata, ouro). Esta última supracitada, em especial a nanopartícula de ouro (AuNP), é uma opção promissora para diagnósticos e tratamentos de cânceres, devido sua alta biocompatibilidade e facilidade de modificação química de sua superfície. No entanto, é de suma necessidade obter uma melhor compreensão das AuNPs em relação aos seus efeitos biológicos, tendo em vista que as propriedades físicas e químicas das nanopartículas são dependentes de fatores, como: composição, forma, tamanho e natureza de superfície (MENDES, et al. 2022; LEE, et al. 2022). E esses aspectos afetam a citotoxicidade do nanomaterial, tornando um alvo de maior investigação (JOSEPH, et al. 2023).

As nanopartículas, em contato com fluidos biológicos, adsorvem proteínas em maiores quantidades do que outras biomoléculas (ACHILLI, et al. 2022). Sendo assim, a coroa biomolecular é composta por uma maior porcentagem de proteínas. Dentre estas, nas AuNPs, a coroa dura é formada predominantemente por albumina, a proteína mais abundante do plasma, portanto a coroa de albumina é um dos fatores determinantes de variações da ação das AuNPs no organismo (CHANDRAN, et al. 2017).

Tratamento com AuNPs na área médica visam minimizar o impacto em tecidos saudáveis e impedir a proliferação das células tumorais (MUSSETTI and HUANG, 2018). No entanto, para uma melhor aplicabilidade das AuNPs, é necessário conhecer seus efeitos físico-químicos para maior controle das respostas biológicas decorrentes de seu uso. Um desses efeitos e, o mais importante, é a citotoxicidade do complexo nanopartícula-coroa, que determina a diminuição ou potencialização do efeito citotóxico (PAN, et al. 2012).

Os aspectos mencionados são subjetivos a vários fatores, complexos e pouco compreendidos, ressaltando ainda o fato de ser um assunto da atualidade na medicina moderna, só evidencia cada vez mais a importância de pesquisas sobre as nanopartículas e sua natureza de superfície, em especial a coroa biomolecular. Portanto, essa primeira etapa do projeto de pesquisa inclui experimentos de caracterizações físico-químicas, ensaios de citotoxicidade, ensaios de viabilidade celular, combinados com microscopia de fluorescência e seguidos de análises de imagem.

2. OBJETIVOS

Determinar as características físico-químicas das AuNPs, avaliar a influência da monocoroa de albumina na citotoxicidade das AuNPs nas células de carcinossarcoma de Walker 256.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro

Para a síntese de Nanopartículas de Ouro (AuNPs), 0,05g de citrato de sódio di-hidratado foi diluído em 5ml de água destilada (concentração de 5%), e 0,0097g de cloreto de ouro foi diluído em 100ml de água destilada (molaridade de 250mM). A solução de cloreto de ouro foi aquecida a 80°C e, em seguida, a solução de citrato de sódio foi rapidamente adicionada. Após a adição de citrato ao ouro, a solução ficou em rotação a 1600 rpm por 45 minutos sob aquecimento para manter uma temperatura de 80°C e, em seguida, foi removida do aquecimento para esfriar enquanto ainda era agitada e, posteriormente, armazenada na geladeira em um recipiente de vidro.

3.2 Formação de Coroa Monoproteica

A formação da coroa monoproteica da Albumina do Soro Bovino (BSA) foi induzida pela incubação da AuNP em BSA (Sigma Aldrich, A7906-50G). A concentração de BSA utilizada foi de 1mg/ml, onde a AuNP foi incubada por 1 hora a 37°C e, em seguida, centrifugada a 14.880 rcf (11.000 rpm) por 30 minutos a 4°C. Após a formação do pellet, o sobrenadante foi removido por pipetagem, e 1.000µL de PBS foi adicionado para remover as proteínas não ligadas ao complexo nanopartícula-coroa, seguido de centrifugação novamente por 20 minutos. Após a segunda lavagem do pellet, este foi ressuspensionado em 100µL de PBS e armazenado na geladeira em recipiente de vidro para uso no dia seguinte. O sobrenadante removido entre cada centrifugação foi armazenado em tubos eppendorf de 1,5ml para análise proteica no sobrenadante por BCA e para confirmação da formação de coroa monoproteica por SDS-PAGE.

3.3 Confirmação da Formação de Coroa Monoproteica na AuNP

A confirmação da formação da coroa de albumina na nanopartícula de ouro foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Inicialmente, 100µL de AuNP com coroa de albumina foram adicionados a 40µL de tampão de amostra de Laemmli contendo 10µL de DTT, sendo estas, as amostras a serem corridas no gel.

Para o SDS-PAGE, utilizou-se um gel de poliacrilamida a 12% (resolving gel) e de 3,5% (stacking gel) e, após sua polimerização, foram adicionados 8µL de peso molecular ao primeiro poço, 10µL das amostras (as soluções descritas acima dos sobrenadantes das centrifugações e a AuNP com BSA coroa) e 10µL do controle (solução BSA descrita acima). Tanto as amostras quanto o controle foram aquecidos a 100°C no termobloco (banho seco) antes de serem adicionados aos poços de gel. A eletroforese foi realizada a 120 V e 300 mA por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi colocado por 30 minutos em solução fixadora contendo ácido acético, metanol e água (10:50:60) e, em seguida, corado com Coomassie blue por 12 horas sob agitação. Após, a coloração do fundo do gel foi removida por seguidas lavagens com solução de coreto de sódio 0.5M. Finalmente, o gel foi escaneado, e as bandas foram comparadas usando análise semiquantitativa por densitometria no software FIJI (SCHINDELIN, J. 2012).

3.4 Quantificação de proteínas por BCA

O sobrenadante foi analisado utilizando o kit *BCA Protein Assay* (Santa Cruz Biotechnology) seguindo o protocolo do fabricante. O objetivo desta análise é quantificar proteínas do sobrenadante que não se ligaram a nanopartícula, a fim de determinar a eficiência das lavagens e centrifugações.

3.5 Avaliação do Tamanho Hidrodinâmico de Nanopartículas e do Potencial Zeta

O espalhamento dinâmico de luz (DLS), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons (PCS), foi usado para medir o diâmetro médio das partículas e a distribuição de tamanho das nanopartículas dispersas no líquido (ASHIZAWA, K. 2019). Todas as medidas foram realizadas em triplicata, com 15 corridas cada, à temperatura de 25°C e tempo de repouso de 1 minuto antes das medidas. O equipamento utilizado para a análise foi o ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK), e a cubeta utilizada foi do tipo DTS0012. A análise do potencial Zeta foi realizada pelo método de eletroforese com laser Doppler com uma cubeta DTS1070 no mesmo equipamento.

3.6 Quantificação da concentração do complexo AuNP-Corona por UV-Vis

A análise UV-Vis foi realizada no equipamento Cytation5 usando o adaptador TAKE3, com 2 μ L das amostras de nanopartículas sem coroa em concentrações conhecidas para criar uma curva linear padrão, onde a absorbância do pico de densidade óptica aumenta de forma dependente da concentração. A partir dessa curva ($Y=0,0002*X+0,0429$) e $R^2=0,9382$, quantificou-se a concentração de nanopartículas presentes no complexo AuNP-Corona.

3.7 Caracterização de AuNP por TEM

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) permite observar nano estruturas, organelas e interfaces em diferentes tipos de amostras de origem animal, humana, vegetal e mineral. Com formação de imagens em grandes aumentos através de um feixe de elétrons de alta voltagem (BURGHARDT, R. C. and DROLESKEY, R. 2006). As AuNPs foram caracterizadas por TEM, a fim de observar o tamanho da AuNP e se houve formação ou não do halo de BSA envolta da AuNP-Corona. Para essas investigações, amostras de AuNP e AuNP-Corona foram coletadas diretamente após a formação da coroa e incubadas com acetato de uranila a 1% sobre grades de cobre revestidas com filme de formvar. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 Spirit BioTWIN, operado a 80 kV. As imagens obtidas pela TEM foram, posteriormente, analisadas pelo ImageJ a qual foi feita através da medição do diâmetro de cada nanopartícula, até obter um N relevante de aproximadamente 50 para cada (AuNP e AuNP-Corona).

3.8 Cultivo de células de carcinossarcoma de Walker 256

A linhagem celular de carcinossarcoma Walker 256 foi cultivada em meio 199 suplementado (10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina-estreptomicina) a 37°C e 5% de CO₂. A passagem dessas células foi realizada semanalmente a cada 2 dias, onde as células eram desprendidas do substrado usando 1ml de tripsina 0,1%, depois foram adicionados 4ml de meio 199 completo para inativação. Entre 2ml – 3ml de células foram pipetados e o volume final de 5 mL completados com o meio de cultura suplementado.

3.9 Tratamento de Células com AuNP

Células de Walker 256 foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/ml em meio completo de 199 e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio completo foi removido, e as células foram tratadas com meio não suplementado 199 contendo nanopartículas de ouro não revestida com a coroa em uma metade e nanopartículas revestidas com coroa na outra metade. Os poços controle foram tratados apenas com meio 199 não suplementado. As concentrações dos tratamentos para determinar o IC₅₀, foram: 150 μ M; 100 μ M; 75 μ M; 50 μ M; 25 μ M; 10 μ M; 1 μ M; 0.1 μ M e 0.01 μ M.

3.10 Ensaio de Viabilidade Celular utilizando Calceína AM, Análise de Imagem e IC50

A citotoxicidade foi avaliada pelos métodos de Calceína AM e marcação com Iodeto de Propídio e Hoechst para aumentar a robustez dos resultados. Foi preparada uma solução de Calceína AM (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, 0,025 μ mol L⁻¹), Iodeto de propídio (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, 1 μ g mL⁻¹) e Hoechst (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, 1 μ g mL⁻¹) em FluoroBrite™ DMEM. Após 24h de tratamento, 50 μ L desta solução foram adicionados às células e incubados por 30 min a 37 °C e 5 % de CO₂. Posteriormente, as imagens foram adquiridas utilizando o equipamento Cytation 5 em quatro campos diferentes em cada poço e em três canais de fluorescência (DAPI, PI e GFP) usando a objetiva de 4x. A análise de imagens foi realizada usando o software Gen5 (versão 3.12, BioTek Instruments). Os núcleos corados com Hoechst (imagens adquiridas no canal DAPI) e núcleos corados com o iodeto de propídio (imagens adquiridas no canal canal PI) foram segmentados e os objetos foram contados. O número de células viáveis foi calculado subtraindo a contagem de núcleos corados com PI (consideradas células mortas) dos núcleos corados com Hoechst (consideradas 100%). A porcentagem de viabilidade foi determinada usando a equação: % de viabilidade = (células tratadas viáveis / células controle viáveis) \times 100, fornecendo a

porcentagem de células viáveis por poço (DE LIMA, L. et al, 2024). Os valores gerados foram inseridos no software GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA) para calcular o IC50.

4. RESULTADOS

A síntese de AuNP mostrou baixa polidispersão (PDI) de $0,215 \pm 1,513$ e potencial Zeta de $-24,21 \pm 2,518$ mV. Para determinar a formação da coroa de albumina na AuNP, determinamos a extensão de centrifugação necessária de acordo com a presença de proteína no sobrenadante por BCA. Após uma centrifugação, recuperamos $566,33 \pm 32,82$ µg/ml e após a segunda a quantidade foi indeterminada. A formação de coroa foi confirmada por SDS-Page e Microscopia Eletrônica de Transmissão, e um aumento no diâmetro das partículas (AuNP: média de 17,44nm em frequência relativa de 22%; AuNP-Coroa: média de 22,64nm em frequência relativa de 20%). A viabilidade celular foi avaliada por fluorescência da Calceína AM após 24 horas de incubação na presença de AuNP e AuNP-Coroa e as imagens foram capturadas com o equipamento Cytation5, mostrando baixa mortalidade celular no controle (~5%). O valor de IC50 foi calculado usando o software GraphPad Prism, para AuNP e complexo AuNP-Coroa o valor foi de ~100µM. Por fim, os resultados dos ensaios de citotoxicidade revelaram que tanto as AuNPs quanto o complexo AuNP-Coroa apresentaram valores semelhantes de IC50, indicando que a monocoroa de BSA não teve efeito significativo sobre a citotoxicidade das AuNPs.

5. CONCLUSÃO

Utilizando técnicas como DLS, Potencial Zeta, TEM, UV-vis e SDS-Page, foi possível observar mudanças significativas no comportamento das AuNPs após a formação da coroa. A técnica de UV-vis foi boa na determinação da concentração de AuNP-Coroa, a partir da concentração estimada de AuNP. O DLS indicou aumento no tamanho hidrodinâmico da AuNP após a adsorção da albumina, e o Potencial Zeta tornou-se menos negativo, confirmando a modificação da carga superficial. Esses resultados foram corroborados pela TEM, que também observou aumento no diâmetro da AuNP com coroa, indicando a formação da coroa de albumina. O SDS Page demonstrou que houve a formação de coroa na nanopartícula, com concentração de 1mg/ml de BSA escolhida para ensaios celulares. O BCA, por sua vez, indicou que apenas duas centrifugações foram suficientes para remover ligações inespecíficas. Os testes de citotoxicidade (IC50) não apresentaram diferenças significativas entre AuNP e AuNP-Coroa, sugerindo que a tendência a agregação das nanopartículas, induzida pela BSA, pode ter influenciado esses resultados. Estudos anteriores confirmam que a formação da coroa proteica pode alterar a carga superficial e o comportamento de agregação das nanopartículas, o que, por sua vez, afeta suas interações biológicas. Em suma, a formação da coroa de albumina altera significativamente as propriedades da AuNP, aumentando seu tamanho e modificando sua carga superficial. No entanto, essas mudanças não resultaram em diferenças significativas na citotoxicidade, porém um estudo futuro dos mecanismos de internalizações poderá esclarecer melhor sobre isso.

6. BIBLIOGRAFIA

- ACHILLI, E.; FLORES, C. Y.; TEMPRANA, C. F.; et al. **Enhanced gold nanoparticle-tumor cell recognition by albumin multilayer coating**, in: OpenNano, v. 6, p. 100033, 2022.
- ASHIZAWA, K. **Nanosize Particle Analysis by Dynamic Light Scattering (DLS)**, in: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan v. 139, 2019.
- BURGHARDT, R. C. and DROLESKEY, R.; **“Transmission electron microscopy.”** in: Current protocols in microbiology vol. 2, 2006.
- CHANDRAN, P.; RIVIERE, J. E.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. **Surface chemistry of gold nanoparticles determines the biocorona composition impacting cellular uptake, toxicity and gene expression profiles in human endothelial cells**, in: Nanotoxicology, v. 11, n. 4, p. 507–519, 2017.

- JOSEPH, X; AKHIL; ARATHI; et al. **Toxicity Assessment of Nanoparticle. In: Biomedical Applications and Toxicity of Nanomaterials.** [s.l.]: Springer, 2023.
- LEE, E.; LEE, M.; KWON, S.; et al. **Systematic and mechanistic analysis of AuNP-induced nanotoxicity for risk assessment of nanomedicine,** in: Nano Convergence, v. 9, n. 1, 2022.
- DE LIMA, L; FERREIRA, A; et al. **Tongue depressor (bio)sensors: A fast decentralized self-testing of salivary biomarkers for personalized medicine,** Chemical Engineering Journal, v. 494, 2024.
- MENDES, C.; THIRUPATHI, A.; CORRÊA, M. E. A. B.; et al. **The Use of Metallic Nanoparticles in Wound Healing: New Perspectives,** in: International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 23, p. 15376, 2022.
- MUSETTI, S.; HUANG, L. **Nanoparticle-Mediated Remodeling of the Tumor Microenvironment to Enhance Immunotherapy,** in: ACS Nano, v. 12, n. 12, p. 11740–11755, 2018.
- PAN, Y.; BARTNECK, M.; JAHNEN-DECHENT, W., Chapter Eleven - **Cytotoxicity of Gold Nanoparticles,** in: Nanomedicine: Infectious Diseases, Immunotherapy, Diagnostics, Antifibrotics, Toxicology and Gene Medicine, v. 509, 2012.
- SCHINDELIN, JOHANNES et al. **“Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.”,** in: Nature methods vol. 9, 2012.
- THERMOFISHER; INVITROGEN REAGENTS, in: **“www.thermofisher.com”.** Accessed 30 June 2024.