



ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE E FIBROBLASTOS BOVINOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Michele Munk Pereira¹; Humberto de Mello Brandão²; Nádia Rezende Barbosa Raposo¹; Juliane Dornellas Nunes²; Eliangela de Moraes Teixeira³; Luiz Sérgio de Almeida Camargo²; Luiz Henrique Capparelli Mattoso³.

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

³ Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, Brasil

*e-mail de contato; humberto@cnppl.embrapa.br

Projeto Componente: PC6 Plano de Ação: PA2

Resumo

A citometria de fluxo é uma técnica que vem sendo utilizada intensivamente em vários estudos de atividade celular e, mais recentemente, na interação de nanomaterias com as células. O objetivo deste estudo foi avaliar a interação de nanofibras de celulose (NFC) e fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* por citometria de fluxo. Em altas concentrações (>100 µg/mL), as NFC induziram mudanças no tamanho e granularidade dos fibroblastos. Os resultados apresentados demonstraram que a citometria de fluxo pode ser usada como uma alternativa metodológica na avaliação da morfologia de células de mamíferos expostas a NFC auxiliando nos estudos de toxicidade.

Palavras-chave: nanofibras de celulose, morfologia, granularidade, citotoxicidade.

Introdução

A citometria de fluxo é um método quantitativo que vem sendo amplamente utilizado para monitorar interações físicas entre nanomaterias e células [1, 2, 3, 4]. Essa técnica possibilita a análise de um grande número de células em pouco tempo (10.000 células/s) [5].

A leitura das células pelo citômetro é baseada na dispersão da luz que fornece diversas informações acerca da célula. Por exemplo, o parâmetro FSC (*Forward Scatter Signal*) é relativo ao tamanho da célula e o SSC (*Side Scatter Signal*) representa a complexidade intracitoplasmática que caracteriza a granularidade interna da célula. Utilizando estes parâmetros, o objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente, por citometria de

fluxo, a interação de nanofibras de celulose (NFC) e fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

Materiais e métodos

As amostras de NFC, obtidas por hidrólise ácida empregando-se solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 60% (v/v), foram produzidas e caracterizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) na sede da Embrapa Instrumentação Agropecuária em São Carlos (SP).

Fibroblastos bovinos adultos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubados a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Após atingir a confluência de 60%, as células foram expostas as NFC (diâmetro: 6-18 nm; comprimento: 85-225

SP 5764
P. 186

μm) por 24h em diferentes concentrações: 0 (controle); 0, 02; 0, 2; 0, 5; 1, 0; 1, 5; 100; 200; 400; 800; 1000; 2000; 3000 e $5000\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, as células foram coradas com iodeto de propídio ($50\mu\text{g/mL}$) e avaliadas por citometria de fluxo, empregando o equipamento FACScalibur (Becton Dickinson, São Jose, CA) equipado com um laser de $585\pm 42\text{nm}$. Foram realizadas três repetições em triplicata. A análise foi realizada após contagem de 10.000 eventos por replicata e os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software WinMDI versão 2.9.

A análise estatística foi realizada por ANOVA e as medias comparadas pelo teste de *Student Newman Keus*.

Resultados e discussão

As células exposta a baixas concentrações de NFC (0,02 a $1,5\mu\text{g/mL}$) não apresentaram alterações nos parâmetros FSC e SSC quando comparado ao grupo controle (Fig. 1). Entretanto, as células cultivadas com altas doses de NFC ($>100\mu\text{g/mL}$) apresentaram diminuição do FSC e aumento do SSC (Fig. 2).

FSC e SSC são parâmetros citométricos rotineiramente utilizados para mensurar tamanho e granularidade celular e revelam a internalização e acúmulo de nanomateriais dentro das células [3]. Em especial, o aumento de SSC pode ser devido à presença de nanomateriais adsorvidos ou endocitados à célula [4]. A avaliação desses parâmetros citométricos é importante, uma vez que outros estudos revelaram que o acúmulo de nanomateriais altera a morfologia celular produzindo efeitos endotóxicos [6]. Além disso, a diminuição de FSC indica encolhimento celular e alterações citoplasmáticas que são características da fase inicial da apoptose [2].

No presente estudo, a alteração de FSC e SSC foi evidente em maiores concentrações de NFC, possivelmente por maior adsorção de nanofibras na membrana plasmática ou seu acúmulo no citoplasma.

Os resultados apresentados demonstraram que a citometria de fluxo pode ser usada como uma alternativa metodológica na avaliação da morfologia de células de mamíferos expostas a NFC. Esses dados são úteis em estudos de toxicidade, uma vez que a interação de NFC com células podem ter implicações citotóxicas.

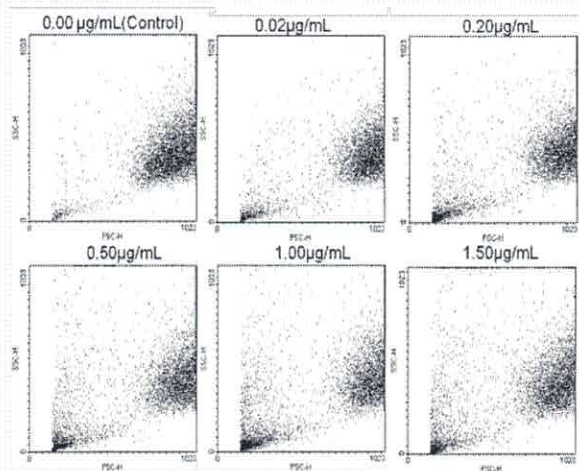


Fig 1. Influência de NFC sobre a morfologia de fibroblastos bovinos. Citograma bidimensional em *dot plot* de FSC (escala linear) X SSC (escala logarítima) demonstrando que células tratadas com NFC nas concentrações de 0,02; 0,20; 0,50; 1,00 e $1,50\mu\text{g/mL}$ não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados quando comparadas ao grupo controle.

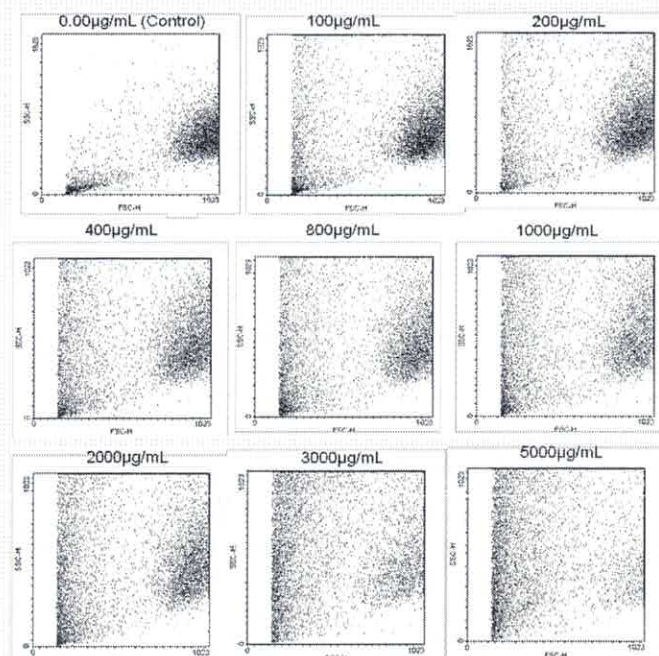


Fig 2. Influência de NFC sobre a morfologia de fibroblastos bovinos. Citograma bidimensional em *dot plot* de FSC (escala linear) X SSC (escala logarítima) demonstrando que células tratadas com NFC nas concentrações de 100, 200, 400, 800, 1000, 2000, 3000 e $5000\mu\text{g/mL}$ apresentaram alterações nos parâmetros avaliados quando comparadas ao grupo controle.

Conclusões

Em altas concentrações (>100 µg/mL), as NFC induziram mudanças no tamanho e granularidade dos fibroblastos.

Agradecimentos

À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES 04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede AgroNano e ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA).

Referências

1. D. Cai; D. Blair; F.J. Dufort; M.R. Gumina; Z. Huang; G. Hong; D. Wagner; D. Canahan; K. Kempa; Z.F. Ren; T.C. Chiles. *Nanotechnology*. 2008, *19*, 1.
 2. C.I. Vamanu; M.R. Cimpan; P.J. Høi; S. Sørnes; S.A. Lie; N.R. Gjerdet. *Toxicol. In Vitro*. 2008, *7*, 1689.
 3. R.M. Zucker; E.J. Massaro; K.M. Sanders; L.L. Degn, W.K. Boyes. *Cytometry A*. 2010, *77*, 677.
 4. S.K. Sohaebuddin; P.T. Thevenot; D. Baker; J.W. Eaton, L. TANG. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre Toxicology*. 2010, *7*.
 5. R. Elbez; B.H. McNaughton; L. Patel; K.J. Pienta; R. Kopelman. *PLoS ONE*. 2011, *6*, 28475.
 6. H. Suzuki; T. Toyooka; Y. Ibuki. *Environ. Sci. Technol.* 2007, *41*, 3018.
-