

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**ANAIS DO VII WORKSHOP DA REDE DE
NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis
Caue Ribeiro
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Editores

Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: cnpdia.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Sandra Protter Gouvea
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dra. Lucimara Aparecida Forato

Revisor editorial: Valéria de Fátima Cardoso
Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Ângela Beatriz De Grandi
Imagem da capa: Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus
Loures Mourão, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2013): tiragem 50

Todos os direitos reservados.
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).
CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação

Anais do VII Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio –
2012 - São Carlos: Embrapa, 2012.

Irregular
ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
III. Ribeiro, Caue. IV. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. V. Embrapa Instrumentação.

© Embrapa 2013

NANOFIBRAS DE CELULOSE MODULAM A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA AO ESTRESSE CELULAR E APOPTOSE EM FIBROBLASTOS MAMÍFEROS

Michele Munk Pereira, Nádia Rezende Barbosa Raposo, Roberta Brayner, Virginia de Oliveira, Carolina Capobiango Romano Quintão, Luiz Sérgio de Almeida, Camargo, Luiz Henrique Capparelli Mattoso, Humberto de Mello Brandão

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG. Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), Universidade de Paris Diderot 7, Paris, França. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP.
mimunkbio@gmail.com; humberto.brandao@embrapa.br

Projeto Componente: PC6 **Plano de Ação:** PA2

Resumo

As nanofibras de celulose (NFC) podem ser aplicadas na construção de matrizes poliméricas, liberação controlada de fármacos, *gene delivery* e engenharia tecidual. Entretanto, pouco se conhece sobre seus efeitos em células de mamíferos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das NFC na expressão de genes de estresse celular (HSP70.1, PRDX1) e apoptose (BCL-2, BAX) em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. A concentração de 100 µg mL⁻¹ de NFC não induziu a sobre-regulação gênica, porém 2000 e 5000 µg mL⁻¹ de NFC aumentou a quantidade de RNAm para HSP70.1, PRDX1 e BAX. Portanto, nas condições testadas, elevadas concentrações de NFC alteraram a expressão de genes biomarcadores de estresse celular e apoptose.

Palavras-chave: nanomateriais, citotoxicidade, biomarcadores.

Publicações relacionadas

PEREIRA, M.M.; BARBOSA, N.R.; BRAYNER, R.; TEIXEIRA, E.M.; OLIVEIRA, V.; QUINTÃO, C.C.R.; CAMARGO, L.S.A.; MATTOSO, L.H.C.; BRANDÃO, H.M. Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, v. 24, p. 075103, 2013.

Introdução

As NFC são nanomateriais atrativos devido as suas propriedades de hidrofiliabilidade, flexibilidade, resistência mecânica, ampla capacidade de modificação química, e são também biodegradáveis (KOLAKOVIC et al., 2011) Porém, para o uso seguro desse novo nanomaterial, são necessários estudos que avaliem seu potencial efeito citotóxico. Em células pulmonares humanas foi observada baixa toxicidade das NFC (CLIFT et al., 2011). Porém outro trabalho revelou efeitos genotóxicos desse nanomaterial em células vegetais (LIMA et al., 2012). Assim, mais estudos são necessários para o melhor entendimento da interação das NFC e as estruturas biológicas. O objetivo deste estudo foi quantificar a abundância de transcritos envolvidos

com a resposta ao estresse celular (HSP70.1, PRDX1) e regulação da apoptose (BAX e BCL-2) em fibroblastos expostos à NFC.

Materiais e métodos

A cultura celular e as condições de exposição as NFC mediante contato direto foram realizadas de acordo com normas da ISO 10993-5 “*Biological evaluation of medical devices Test for cytotoxicity: in vitro methods*”. Fibroblastos bovinos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubados a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade.

Após atingir a confluência de 60%, as células foram expostas às NFC (diâmetro: 6-18 nm; comprimento: 85-225 µm) por 24 h em diferentes concentrações: 0 (controle); 100; 2000 e 5000 µg mL⁻¹. Posteriormente, o RNA foi extraído

utilizando-se o kit comercial *RNeasy Micro kit* (Qiagen). A transcrição reversa foi obtida com o kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen), produzindo um volume final de 20 μL (~16.000 ng) de cDNA por reação. A PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). A reação contendo cDNA, par de *primers*, *Master Mix* (dNTPs, referência passiva-ROX, *SYBER Green*) e 0,1 U de Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 μL , foi incubada a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de pareamento específica para cada *primer*, por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles negativos foram preparados, nos quais o cDNA foi omitido durante a reação. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra (de todos os grupos) das respectivas repetições em placas ópticas de reação de 96 poços (*Applied Biosystems*) e amplificadas no aparelho de PCR em tempo real (*ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems*).

A quantificação relativa dos RNAm foi realizada pelo *Relative Expression Software Tool* (REST®). $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão (EP) da média.

Resultados e discussão

Em fibroblastos expostos a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC, a abundância de transcritos para HSP70.1 (1,00 \pm 0,13), PRDX1 (1,16 \pm 0,18) e BCL-2 (1,22 \pm 0,26) foram similares ($P > 0,05$) ao controle (Fig.1). Porém, fibroblastos expostos a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC, os genes para HSP70.1 (1,57 \pm 0,43), PRDX1 (1,41 \pm 0,39) e BAX (1,41 \pm 0,36) foram sobre-regulados ($P < 0,05$) quando comparados ao controle (Fig.1). De forma similar, a concentração de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC induziu uma maior expressão ($P < 0,05$) de HSP70.1 (1,74 \pm 0,26), PRDX1 (1,38 \pm 0,29) e BAX (1,33 \pm 0,17) que o grupo controle (Fig.1).

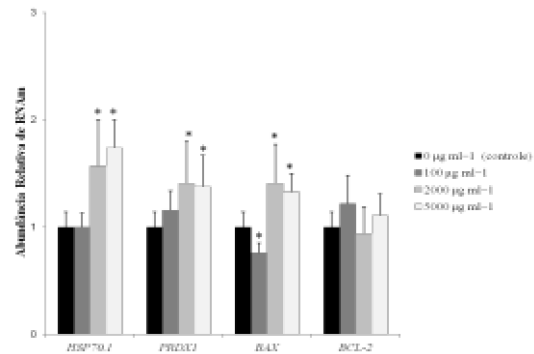


Fig. 1 Expressão relativa (média \pm EP) dos transcritos para *Heat shock protein 70.1* (HSP70.1), Peroxiredoxina 1 (PRDX1), *B cell leukemia 2 associated X protein* (BAX) e *B-cell leukemia protein-2* (Bcl-2) em fibroblastos bovinos cultivados sem nanomateriais (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ grupo controle) e com NFC nas concentrações de 100, 2000 e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A expressão dos grupos NFC foram comparadas com o grupo controle (expressão relativa = 1,00). * $P > 0,05$.

Porém, a abundância de transcritos para BCL-2 não foi alterada ($P > 0,05$; Fig. 1). Os genes BAX (pro-apoptótico) e BCL-2 (anti-apoptótico) expressaram proteínas que regulam a morte celular em resposta a estímulos apoptóticos (VAN DELFT; HUANG, 2006). A ação de BAX é neutralizada quando é formado um heterodímero com BCL-2. Portanto, a relação BAX:BCL-2 determina a sobrevivência celular (BASU; HALDAR, 1998). No presente estudo, a relação de transcritos BAX:BCL-2 em fibroblastos expostos a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC foi menor que 1 (Tab. 1), enquanto nas células expostas a 2000 e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os valores foram maiores que 1 (Tab.1). A maior proporção de BAX quando comparado ao BCL-2 pode acarretar uma maior tendência à apoptose.

Tab 1. Taxa de expressão de RNAm para BAX:BCL-2 em fibroblastos expostos a NFC

Grupos	BAX*	BCL-2*	Relação BAX:BCL-2
Controle	1	1	1
100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC	0,76 \pm 0,09 ^a	1,23 \pm 0,26 ^a	0,62 ^a
2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC	1,41 \pm 0,36 ^b	0,94 \pm 0,25 ^b	1,50 ^b
5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC	1,33 \pm 0,17 ^b	1,11 \pm 0,20 ^c	1,20 ^c

*Valores de expressão para *B cell leukemia 2 associated X protein* (BAX) e *B-cell leukemia protein-2* (Bcl-2) em fibroblastos expostos a NFC quantificados por PCR em tempo real. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ao nível de 5%

Por outro lado, na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC a maior abundância de transcritos para BCL-2 (Fig. 1) e a baixa relação BAX:BCL-

2 (Tab. 1), pode ocasionar em fibroblastos menos suscetíveis à apoptose. De forma semelhante, outros nanomateriais aumentaram os níveis de BAX em células pulmonares de ratos tratadas com NTC (RAVICHANDRAN et al., 2010). Células humanas de fígado humanas expostas a nanopartículas de dióxido de titânio segundo Yoo et al. (2012) e células plmonares A549 expostas a nanopartículas de pratas (LEE et al., 2011).

No presente estudo, o gene BAX foi sub-regulado em baixas concentrações (Fig. 1). Interessantemente, trabalhos anteriores demonstraram que nanopartículas de quitosana promovem a sub-regulação de BAX prevenindo a apoptose (HAN et al., 2012). Futuros estudos são necessários para compreender os mecanismos de sub-regulação de BAX em células expostas a nanomateriais, como as NFC e sua implicação na apoptose celular.

Conclusões

Os resultados de PCR em tempo-real demonstraram que em altas concentrações (2000 e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de NFC, os transcritos relacionados a estresse celular e apoptose foram sobre-regulados nos fibroblastos. Esses dados sugerem que HSP70.1, PRDX1, BAX e BCL-2 são bons biomarcadores de resposta de citotoxicidade em células expostas a nanomaterais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa. À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede AgroNano e ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA).

Referências

BASU, A.; HALDAR, S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Molecular Human Reproduction*, v. 4, p 1099–1109, 1998

CLIFT, M.J.; FOSTER, E.J.; VANHECKE, D.; STUDER, D.; WICK, P.; GEHR, P.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; WEDER, C. Investigating the Interaction of Cellulose Nanofibers Derived from Cotton with a Sophisticated 3D Human Lung Cell Coculture. *Biomacromolecules*, v. 12, p. 3666–3673, 2011

HAN, L.; DU, L.B.; KUMAR, A.; JIA, H.Y.; LIANG, X.J.; TIAN, Q.; NIE, G.J.; LIU, Y. Inhibitory effects of trolox-encapsulated chitosan nanoparticles on tert-butylhydroperoxide induced RAW264.7 apoptosis. *Biomaterials*, v. 33, n. 33, p. 8517–8528, 2012

International standard ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices. 1992. Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods.

KOLAKOVIC, R.; PELTONEN, L.; LAAKSONEN, T.; PUTKISTO, K.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. Spray-Dried Cellulose nanofibers as novel tablet excipient. *AAPS Pharmaceutical Scientists Technology*, v.12, n.4, p. 1366-1373, 2011

LEE, Y.S.; KIM, D.W.; LEE, Y.H.; OH, J.H.; YOON, S.; CHOI, M.S.; LEE, S.K.; KIM, J.W.; LEE, K.; SONG, CW. Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC ζ -dependent signaling in A549 lung cells. *Archives of Toxicology*, v. 85, n.12, p. 1529–1540, 2011

LIMA, R.; FEITOSA, L.O.; MARUYAMA, C.R.; BARGA, M.A.; YAMAWAKI, P.C.; VIEIRA, I.J.; TEIXEIRA, E.M.; CORREA, A.C.; MATTOSO, L.H.C.; FRACETO, L.F. Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 3555–3565, 2012

RAVICHANDRAN, P.; BALUCHAMY, S.; SADANANDAN, B.; GOPIKRISHNAN, R.; BIRADAR, S.; RAMESH, V.; HALL, J.C.; RAMESH, G.T. Multiwalled carbon nanotubes activate NF- κ B and AP-1 signaling pathways to induce apoptosis in rat lung epithelial cells. *Apoptosis*, v. 15, p. 1507–1516, 2010

VAN DELFT, M.F.; HUANG, D.C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Research*, v. 16, p. 203–213, 2006

YOO, K.C.; YOON, C.H.; KWON, D.; HYUN, K.H.; WOO, S.J.; KIM, R.K.; LIM, E.J.; SUH, Y.; KIM, M.J.; YOON, T.H.; LEE, S.J. Titanium dioxide induces apoptotic cell death through reactive oxygen species-mediated Fas upregulation and Bax activation. *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, p. 1203–1214, 2012