

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E SUA ASSOCIAÇÃO COM ECHISTATINA VISANDO À AÇÃO ANTITUMORAL

C.M.F. SOUZA¹, L.F. LIMA¹, M. FAVARO², G.S. MAGALHÃES³, A.R. AZZONI¹

¹ Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química

² Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia

³ Instituto Butantan, Laboratório de Imunopatologia

E-mail para contato: camilasouza1@usp.br

RESUMO – *Nanopartículas de ouro (AuNP) são biocompatíveis, apresentam baixa citotoxicidade e grande versatilidade de funcionalização, podendo ligar-se a diferentes biomoléculas. Uma potencial aplicação é o transporte direcionado de drogas antitumorais. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e caracterização de novas nanopartículas formadas por ouro coloidal e proteínas capazes de direcionar drogas para o interior de células tumorais. Para este fim, nanopartículas de ouro foram sintetizadas e combinadas à proteína Echistatina, capaz de direcionar a AuNP para células que superexpressam a integrina $\alpha v \beta 3$, comum em tumores agressivos. As nanopartículas foram sintetizadas por redução em citrato de sódio e apresentaram diâmetros hidrodinâmicos entre 35 e 40 nm e potencial zeta de -25 mV. A seguir, as proteínas Echistatina e GFP foram adsorvidas na AuNP para estudos de transfecção e viabilidade em células U-87 e HeLa. Os ensaios iniciais apresentaram boas perspectivas, uma vez que as células U-87 demonstraram alta susceptibilidade à Echistatina comparada à HeLa, que se mostrou pouco suscetível devido à baixa expressão de integrinas $\alpha v \beta 3$ na membrana, demonstrando que existe especificidade e direcionamento da AuNP para tumores que superexpressam este receptor.*

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia possibilitou que agentes terapêuticos pudessem ser encapsulados ou adsorvidos em materiais nanoparticulados, e entregues de maneira seletiva para células alvo (CARVALHO *et al.*, 2019). Diferentes tipos de sistemas de administração de medicamentos têm sido desenvolvidos, podendo ocorrer através de dendrímeros, lipossomas, nanotubos de carbono e polímero, cerâmica, sílica e nanopartículas metálicas, como o ouro e prata (CARVALHO *et al.*, 2019). As nanopartículas de ouro exibem propriedades interessantes por serem, em geral, biocompatíveis, com baixa citotoxicidade e boa capacidade de funcionalização, podendo carregar diversas biomoléculas alvos incluindo pequenas moléculas de fármaco, peptídeos, proteínas e ácidos nucléicos (PALMA, 2017).

Diversos métodos de síntese de nanopartículas podem ser encontrados na literatura, resultando em nanopartículas nos mais variados tamanhos e formatos. Convencionalmente, o método de Turkevich *et al.* (1951) é amplamente utilizado na síntese de nanopartículas de

ouro, em que o cloreto de ouro III é reduzido a ouro metálico na presença de citrato de sódio.

Uma forma potencialmente interessante de direcionamento é por meio de receptores expressos nas membranas das células. A integrina $\alpha\beta_3$ é um receptor transmembrana altamente expresso em alguns tipos de cânceres com fenótipos metastáticos e de rápida proliferação, dentre eles tumores sólidos de glioblastoma, osteosarcoma, melanoma e tumores pancreáticos. Portanto, medicamentos funcionalizados com moléculas capazes de interagir especificamente com integrinas de células tumorais poderiam, potencialmente, serem usados como drogas antitumorais com menores efeitos colaterais. Neste contexto, o presente trabalho visa ao estudo de complexos AuNPs com a proteína Echistatina, uma molécula que atua como antagonista da integrina $\alpha\beta_3$, isolada da serpente *Echis carinatus* (SIQUEIRA *et al.*, 2019), com vistas ao transporte e direcionamento de drogas para células tumorais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Síntese das nanopartículas de ouro: nanopartículas de ouro foram sintetizadas em triplicata, de acordo com o protocolo de Turkevich *et al.* (1951) com modificações propostas por PALMA (2017), através da redução do ouro por citrato de sódio. Em resumo, 95 mL de uma solução de 0,27 mM de cloreto de ouro (III) trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) foram aquecidos até 98°C, sob agitação vigorosa. Ao atingir esta temperatura, adicionou-se 5 mL de uma solução de 6,8 mM de citrato de sódio tribásico dihidratado.

2.2. Caracterização das nanopartículas de ouro: Após síntese, foram realizados ensaios de caracterização físico-química, através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e determinação do Potencial Zeta por meio do equipamento (ZetaSizer Nano ZS90, MalvernTM), como descrito por PALMA (2017).

2.3. Funcionalização das nanopartículas de ouro com proteínas: As proteínas Echistatina e GFP (proteína verde fluorescente), obtidas segundo descrito por SIQUEIRA *et al.*, (2017), foram adsorvidas em diferentes razões mássicas à superfície das nanopartículas de ouro, seguindo os volumes apresentados na Tabela 1. Sempre em tampão PBS (0,5x), proteínas e AuNPs foram incubadas por 20 min antes de serem adicionadas às células.

Tabela 1 – Volumes utilizados na formulação (AuNPs + Proteínas) para o ensaio de direcionamento das nanopartículas e viabilidade celular

Amostra	Tampão PBS 0,5x (μL)	AuNP (μL)	GFP* (μL)	Echistatina** (mL)
Controle 1	68	2,0
Controle 2	45	20	5,0	...
1	43	20	5,0	2,0
2	41	20	5,0	4,0
3	37	20	5,0	8,0
4	30	20	5,0	15

* Concentração_{GFP} = 1,0 mg/mL; Concentração_{ECH} = 0,330 mg/mL.

2.4. Ensaio de transfecção: As células selecionadas para estudo foram a U-87 linhagem

primária de glioblastoma com alta expressão de integrina e He-la (*Human epitheloid carcinoma*) de tumor cervical pouco permissiva à Echistatina. As células foram cultivadas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂, em placas de 96 poços. Após atingirem aproximadamente 70-80% de confluência, foram expostas aos complexos (e controles) apresentados na Tabela 1. A citotoxicidade dos complexos foi determinada pelo método WST-1 (Roche), após 6h e 24h de exposição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese de nanopartículas de ouro utilizada neste experimento foi realizada de acordo com o método Turkevich utilizando citrato de sódio como agente redutor. Ao final da reação (15 min), as AuNPs apresentaram o aspecto vermelho rubro, típico de ouro coloidal (Figura 1). Os ensaios de caracterização destas partículas indicaram diâmetros hidrodinâmicos entre 35 e 40 nm e potencial zeta de -25 mV.



Figura 1 – Reação de síntese das AuNPs após 3 min e 15 min, respectivamente.

A seguir, as proteínas Echistatina e GFP foram adsorvidas na AuNP para estudos de transfecção e viabilidade em células U-87 e HeLa. Estudos preliminares indicaram alta eficiência de adsorção das proteínas Echistatina e GFP na AuNP (dados não apresentados). Ainda que iniciais, os estudos de transfecção dos complexos AuNP+Ech+GFP indicam que as células U-87 tiveram maior susceptibilidade à Echistatina comparada à HeLa, pela maior expressão de integrinas αvβ3 na membrana. Como demonstrado anteriormente por Siqueira *et al.* (2019), a interação entre a Echistatina com as integrinas nas membranas das células aderentes levam ao descolamento da célula e, a seguir, morte celular. A maior susceptibilidade à Echistatina leva a célula a perder o formato alongado, perda de aderência à placa e formação de agregados (Figura 2). Em uma relação dose-dependente, os estudos de viabilidade indicam que a célula U87 é mais suscetível às AuNPs contendo Echistatina adsorvida, uma indicação de direcionamento da nanopartícula. Em breve, pretendemos também acompanhar a entrada das AuNPs nas células por fluorescência via proteína GFP.

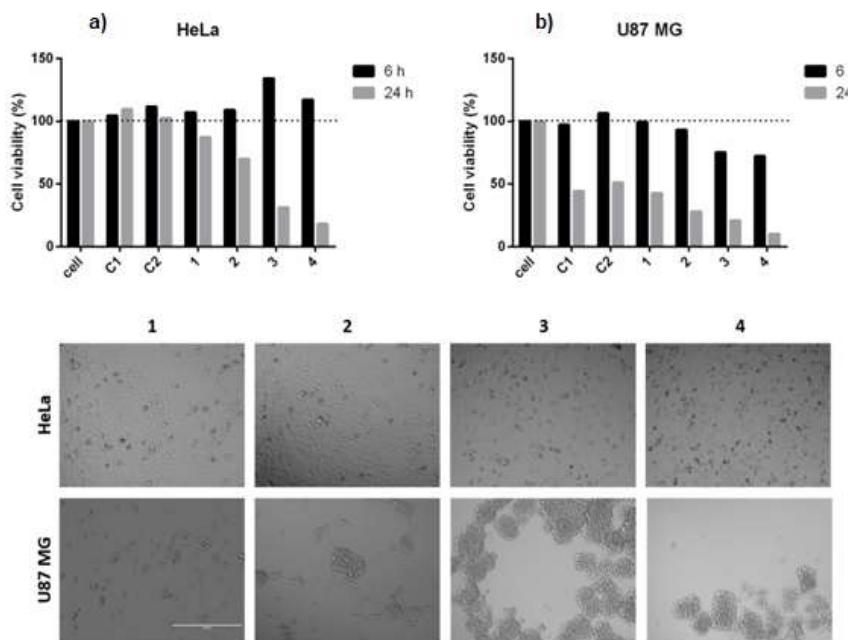


Figura 2 – Ensaio de viabilidade celular (WST-1) e microscopia óptica das células U87 e HeLa, expostas por 6 ou 24h aos complexos apresentados na Tabela 1.

3. CONCLUSÃO

Os ensaios preliminares indicam sucesso na capacidade de direcionamento das nanopartículas de ouro complexadas à Echistatina, frente a tipos celulares com variável expressão de receptores integrina $\alpha v \beta 3$, oferecendo boas perspectivas para atuação em tumores que superexpressam esse marcador tumoral.

4. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processos 430205/2018-0 e 304125/2018-0).

5. REFERÊNCIAS

CARVALHO, A.; FERNANDES, A. R.; BAPTISTA, P. V. Nanoparticles as Delivery Systems in Cancer Therapy: Focus on Gold Nanoparticles and Drugs. *Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, pg 257-295, 2019.

PALMA, M. M. Desenvolvimento de nanopartícula metal-proteína para entrega de DNA em estudos de terapia e vacinação gênica. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2017.

SIQUEIRA, R. A. G. B.; CALABRIA, P.A.L. *et al.* When spider and snake get along: Fusion of a snake disintegrin with a spider phospholipase D to explore their synergistic effects on a tumor cell. *Toxicon*, v. 168, pg 40-48, 2019.