TRABALHO COMPLETO
FULL PAPER
XXVIII SEPE
Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão
Teaching, Research and Extension Symposium
ISSN: 2316-9745
24 A 26 DE SETEMBRO DE 2024
SEPTEMBER 24th to 26th, 2024
UFN
https://doi.org/10.48195/sepe2024.28419

# PERFIL DE SEGURANÇA *IN VITRO* DE UMA NANOPARTÍCULA BIOGÊNICA DE $Li_2O$ EM CÉLULAS NEURONAIS-*LIKE*

**Gabriela Geraldo Sangoi[1*]; Taíse Regina Schuster Montagner[2]; Djenifer Letícia Ulrich Bick[2]; Daniel Moro Druzian[1]; Sthéfany Nunes Loureiro[3]; Leandro Rodrigues Oviedo[1]; William Leonardo da Silva[1]; Alencar Kolinski Machado[1]**

## RESUMO

Doenças neuropsiquiátricas, como o transtorno bipolar, por exemplo, têm sido relacionadas com a disfunção mitocondrial. Logo, o desenvolvimento de agentes que atuem na reversão dos problemas mitocondriais, tem sido de interesse científico. O carbonato de lítio é o principal estabilizador do humor prescrito para sujeitos com essa doença. Contudo, dados os possíveis efeitos de toxicidade, o uso da nanotecnologia pode ser uma valiosa ferramenta para aprimorar a ação deste medicamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de segurança *in vitro* de uma nanopartícula de óxido de lítio em células neuronais-*like*. Para isso, após a produção e caracterização das nanoestruturas de óxido de lítio, células neuronais-*like* foram tratadas com diferentes concentrações desta formulação. Assim, foi observado que a maioria das concentrações testadas apresentaram perfil de segurança *in vitro* satisfatório, demonstrando o potencial da nanoformulação em ser testadas quanto ao seu perfil de eficácia de células neuronais.

**Palavras-chave**: Nanotecnologia; Síntese Verde; Citotoxicidade.

## ABSTRACT

Neuropsychiatric diseases, such as bipolar disorder, for example, have been related to mitochondrial dysfunction. Therefore, the development of agents that act to reverse mitochondrial problems has been of scientific interest. Lithium carbonate is the main mood stabilizer prescribed for subjects with this disease. However, given the possible toxicity effects, the use of nanotechnology can be a valuable tool to improve the action of this medicine. Thus, the objective of this work was to evaluate the in vitro safety profile of a lithium oxide nanoparticle in neuronal-like cells. For this, after the production and characterization of lithium oxide nanostructures, neuronal-like cells were treated with different concentrations of this formulation. It was observed that most of the concentrations tested presented a satisfactory in vitro safety profile, demonstrating the potential of the nanoformulation to be tested for its efficacy profile on neuronal cells.

[1]* Programa de Pós Graduação em Nanociências – Universidade Franciscana – Santa Maria, RS - gabriela.sangoi@ufn.edu.br
[1] Programa de Pós Graduação em Nanociências – Universidade Franciscana – Santa Maria, RS – daniel.druzian@ufn.edu.br; leandro.oviedo@ufn.edu.br; w.silva@ufn.edu.br; alencar.machado@ufn.edu.br
[2] Curso de Biomedicina - Universidade Franciscana – Santa Maria, RS – taise.schuster@ufn.edu.br; djenifer.ulrich@ufn.edu.br
[3] Curso de Engenharia Química - Universidade Franciscana – Santa Maria, RS – s.loureiro@ufn.edu.br

**Keywords:** *Nanotechnology; Green Synthesis; Cytotoxicity.*

**Eixo Temático:** Atenção Integral e Promoção à Saúde.

## 1. INTRODUÇÃO

Entende-se por disfunção mitocondrial todo e qualquer desbalanço na cadeia de transporte de elétrons (CTE) presente no interior da mitocôndria, organela essa muito importante para o metabolismo celular, pois é responsável pela produção de ATP (adenosina trifosfato), fornecendo energia à célula (Prasun, 2020). Um desequilíbrio na produção de ATP ou no funcionamento da CTE, pode desencadear a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estabelecimento do estresse oxidativo, ocorrendo simultaneamente uma diminuição na produção e liberação de ATP (Brookes, 2005). Tal evento acaba proporcionando um ambiente citotóxico, promovendo a indução inflamatória por meio da sinalização via DAMP (Padrões Moleculares Associados à Patógenos). Além disso, esta condição também proporciona um mal funcionamento celular, o que desencadeia em algumas patogenias, como por exemplo a Síndrome de Leigh - uma doença neurodegenerativa que afeta crianças até 3 meses de idade, promovendo fraqueza generalizada e perda do tônus muscular – e doenças neurospiquiátricas, como por exemplo, o transtorno bipolar – disfunção mitocondrial no complexo I - e esquizofrenia – disfunção no completo V da mitocôndria (Bhatti; Bhatti; Reddy, 2017).

Em relação às doenças neuropsiquiátricas, sabe-se que a fisiopatologia destas doenças ainda não é completamente elucidada (Malhi *et al*., 2013). Entretanto, novos achados científicos acerca da inflamação crônica e estresse oxidativo exacerbados, envolvendo o mal funcionamento mitocondrial, acabam sendo alvos de estudos para novos tratamentos alternativos à estas doenças, tendo como alvo, por exemplo, a disfunção mitocondrial (Andreazza *et al*., 2010; Berk *et al*., 2011).

Dentre os fármacos existentes para o tratamento do transtorno bipolar, por exemplo, o carbonato de lítio é considerado o padrão ouro de tratamento atualmente e embora seu mecanismo de ação não seja bem compreendido, este fármaco é o estabilizador humoral mais utilizado nos protocolos farmacológicos (Malhi *et al*., 2013). Entretanto, pacientes que fazem uso deste medicamento, devem realizar exames periódicos de dosagem deste metal no sangue, análises hematológicas e de

funcionamento renal devido ao perfil de citotoxicidade que ele apresenta em uso crônico (NHS, 2013).

Para tanto, o uso da nanotecnologia ajudaria a promover quiçá uma diminuição na citotoxidade ocasionada pelo uso crônico do carbonato de lítio, uma vez que materiais em escala nanométrica, por apresentarem um aumento da área superficial, proporcionam mais contato do ativo à célula, levando a provável diminuição na concentração da dose efetiva e ação continuada do ativo no alvo celular (Hubbs *et al*., 2011). Além disso, devido ao tamanho nanométrico, as nanopartículas podem permear mais facilmente a membrana celular e até mesmo a barreira hemato-encefálica, visando neste caso o tratamento alternativo às doenças neuropsiquiátricas.

Dessa forma, nanopartículas de óxido de lítio ($Li_2ONPS$) vêm sendo estudadas, devido à sua estabilidade química e ação promissora atrelada à nanotecnologia seria uma alternativa terapêutica ao transtorno bipolar, visando a regulação da disfunção mitocondrial.

Para a síntese dessas nanopartículas, o uso da síntese verde é ambientalmente benéfico, uma vez que a redução do precursor ocorre por meio da ação antioxidante de compostos encontrados em plantas, sem a ação de solventes inorgânicos e/ou orgânicos para tal reação química, promovendo menos dejetos ao ambiente (de Menezes *et al*., 2024). À exemplo de antioxidantes para esta síntese biogênica, podemos citar os flavonoides, comumente encontrados em diversas matrizes químicas de plantas e extratos. Como exemplo pode ser citado o açaí, um fruto da região amazônica que possui sua matriz química rica em antocianinas e flavonoides com ação antioxidante já bem estabelecida (Davidson *et al*., 2022; Machado *et al.*, 2016).

Assim, a utilização de $Li_2ONPS$ como estabilizador humoral, a partir da regulação da disfunção mitocondrial acaba sendo uma potencial alternativa terapêutica, uma vez que o carbonato de lítio, é o padrão ouro de tratamento neste caso e sua ação em escala nanométrica é mais promissora ainda devido características anteriormente citadas. Logo, o objetivo inicial desta pesquisa é realizar um perfil de segurança *in vitro* em células neuronais, utilizando uma curva de concentrações de $Li_2ONPS$ para determinar a citotoxidade desses nanomaterias.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Delineamento experimental

Este estudo caracteriza-se como um estudo experimental *in vitro* em células neuronais-*like* (SH-SY5Y) e foi realizado no Laboratório de Cultura Celular e Efeitos Bioativos da Universidade Franciscana.

### 2.2 Produção e caracterização das nanopartículas de óxido de lítio

As $Li_2O$NPS foram previamente produzidas de acordo com a metodologia descrita por Senthilkumar *et al. (*2017). Para a síntese biogênica, utilizou-se o extrato de açaí liofilizado como agente redutor na reação.

As amostras obtidas foram caracterizadas por difração de raios X (DRX) antes de serem administradas à cultura celular.

### 2.3 Cultura celular e tratamentos

As células SH-SY5Y foram comercialmente obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (código 0223) e cultivadas sob as condições ideais de cultivo celular em estufa de $CO_2$ 5% e utilizando meio DEMEM F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* F-12) (Sigma-Aldrich® – código D8437) contendo 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich® – código F7524), 1% de antibiótico (penicilina 10.000U/ estreptomicina 10mg/mL) (Sigma-Aldrich® – código P4333) e 1% de antifúngico (anfotericina B 250 µg/mL) (Sigma-Aldrich® – código A2942).

Após possuir o número ideal de células para os tratamentos, a linhagem celular foi plaqueada em uma densidade de $2x10^5$ células/mL em placas ELISA de 96 poços e após aderirem ao fundo da placa, foram submetidas ao tratamento com as $Li_2O$NPS em uma curva de concentrações de 1 - 150 µg/mL durante 24, 48 e 72 horas de incubação. O peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) (10 µmol $L^{-1}$) foi utilizado como controle positivo de dano celular. Após os tempos de exposição, foram realizados testes colorimétricos e fluorimétricos para determinação da viabilidade e proliferação celular, bem como o perfil oxidativo das células frente a esta amostra, determinando assim o perfil de segurança *in vitro* das $Li_2O$NPS em células neuronais-*like*.

### 2.4 Determinação da viabilidade e proliferação celular

A análise de viabilidade e proliferação celular das células SH-SY5Y foi realizada via ensaio MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)* de acordo com Kang *et al*. (2010). O reagente MTT acaba interagindo com enzimas mitocondriais de células viáveis e promove a formação de cristais de formazan de coloração roxa. Com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) ao final do processo, os cristais são externalizados para o meio extracelular, permitindo a leitura colorimétrica. A leitura da absorbância ocorreu em 570 nm em um leitor de placas *Synergy* HTX *(Bio tek*).

### 2.5 Mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio

Para mensuração de ERO, foi utilizado o ensaio da 2,7 dihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) *(*Sigma-Aldrich® - D6883) de acordo com a metodologia descrita por Esposti (2002). Este ensaio tem por base o reagente DCFH-DA que é desacetilado por enzimas esterases mitocondriais em diclorodihidrofluoresceína (DCFH) e este em contato com as ERO, acaba se tornando diclorofluoresceína (DCF). A intensidade da fluorescência foi determinada em uma emissão de 488 nm e excitação de 525 nm em um leitor de placas placas *Synergy* HTX *(Bio tek*).

### 2.6 Mensuração indireta dos níveis de óxido nítrico

Para análise dos níveis indiretos de óxido nítrico (ON), foi determinado os níveis de nitrato e nitrito utilizando o reagente de *Greiss,* segundo Choi *et al*. (2012). Tal reagente em contato com compostos nitrílicos gera uma absorbância que pode ser lida em 540 nm de absorbância. A leitura foi realizada em leitor de placas *Synergy* HTX *(Bio tek*).

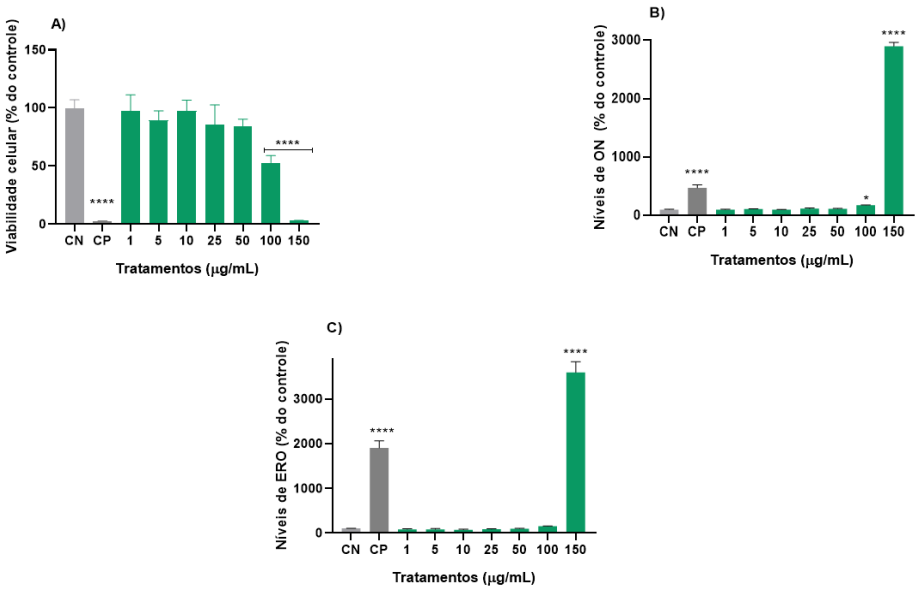
### 2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram primeiramente postulados em planilhas do programa Microsoft Excel® 2013 e posteriormente foi realizado a análise estatística dos mesmos através do *software GraphPad Prism* (versão 8) via anova de uma via seguido de *post-hoc* de *Tukey*. Foram considerados significativos os resultados com $p< 0,05$*, $p<0,001$**, $p<0,001$*** e $p<0,0001$****.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

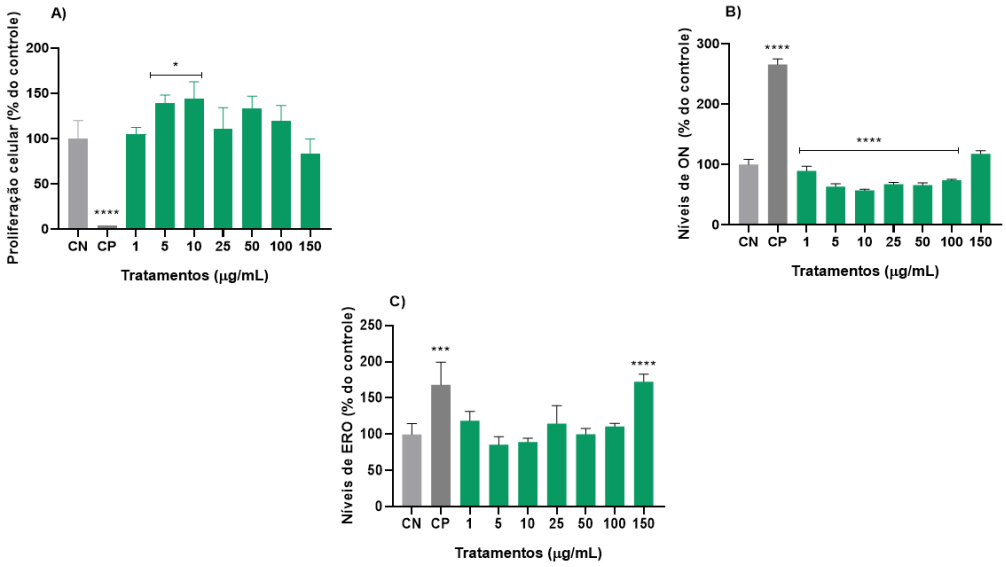
Como resultados da análise do perfil de segurança das $Li_2ONPS$ em neurônios-*like,* pode-se determinar que tal nanopartícula é considerada segura em 24, 48 e 72h, na maioria das concentrações testadas. Após 24h de incubação, apenas as concentrações de 100 e 150 µg/mL reduziram a viabilidade em comparação ao controle negativo (CN) (figura 1A). Neste mesmo período de incubação, foi observado que apenas essas duas concentrações mais altas elevaram os índices de ON (figura 1B), enquanto que 150 µg/mL também aumentou a geração de ERO (figura 1C).

**Figura 1 –** Determinação do perfil de segurança de $Li_2ONPS$ durante 24h de incubação para (a) ensaio MTT, (b) ensaio ON e (c) ensaio DCF



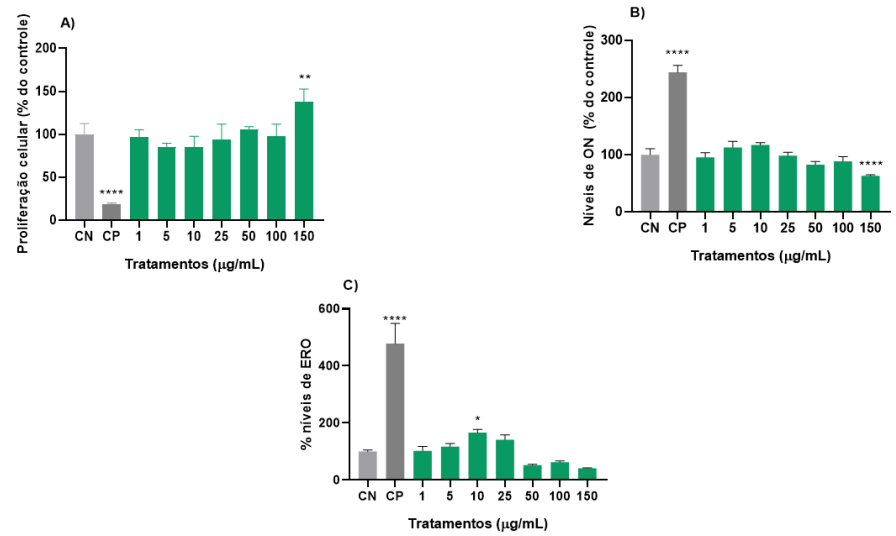

Já em 48h observou-se aumento proliferativo nas concentrações de 5 e 10 µg/mL comparados ao CN (figura 2A), houve ainda aumento de ERO apenas na concentração de 150 µg/mL (figura 2C) e diminuição de ON em praticamente todas as concentrações das nanopartículas (1-100 µg/mL) (figura 2B).

**Figura 2** - Determinação do perfil de segurança de $Li_2ONPS$ durante 48h de incubação para (a) ensaio MTT, (b) ensaio ON e (c) ensaio DCF




Quanto a análise de 72h, apenas a concentração de 150 µg/mL foi capaz de causar um aumento proliferativo significativo nas células (figura 3A) quando comparado ao CN, o que pode ser atrelado também ao fato de que esta concentração neste determinado tempo, conseguiu reduzir os níveis de ON (figura 3B) em relação ao CN, proporcionando um ambiente favorável de cultivo para estas células. Já quanto ao perfil do metabolismo oxidativo, foi observado que nenhuma concentração elevou significativamente os índices de Erro durante 72h (figura 3C), com exceção da concentração de 10 µg/mL. A concentração de 150 µg/mL, a qual foi responsável pelo aumento do estresse oxidativo nos demais períodos de incubação, não causou danos em 72h, demonstrando assim que em uma exposição crônica as $Li_2$ONPS ocorrem um efeito potencialmente benéfico às células.

**Figura 3** - Determinação do perfil de segurança de $Li_2$ONPS durante 72h de incubação para (a) ensaio MTT, (b) ensaio ON e (c) ensaio DCF




A molécula gasosa ON é considerada um marcador pró-inflamatório, uma vez que está relacionada ao metabolismo oxidativo, por exemplo, sendo seu parâmetro analisado como um marcador de toxicidade celular (Alvarez; Radi, 2003). Já as ERO, são variadas, incluindo moléculas radicalares, como o radical superóxido, ou não radicalares, como o $H_2O_2$. As ERO em níveis basais são essenciais para a ativação de diferentes mecanismos intracelulares. Contudo, quando seus níveis excedem a capacidade antioxidante endógena, o estresse oxidativo é estabelecido, podendo levar a diferentes danos celulares como consequência e até mesmo a ativação inflamatória, uma vez que são eventos retroalimentados (Poli *et al*., 2004; Kim; Chen; Andreazza, 2015).

O ensaio MTT é um teste amplamente usado para determinar a viabilidade celular promovendo análise do perfil de segurança *in vitro* (Kroll *et al*., 2009), tal avaliação é relacionada a alterações celulares oriundas da exposição à substâncias (Freshney, 2010). Apesar de inédito na literatura o uso de óxido de lítio ($Li_2O$) em um sistema bio, o metal presente nesta fórmula é capaz de interagir beneficamente com células neuronais, sendo por esta razão a primeira escolha para o tratamento de trasntorno bipolar por exemplo, sendo assim, acredita-se que sua interação com o meio de cultura, facilitou sua dissipação perante a célula, o que promoveu sua ação na redução de ON, por exemplo.

## 4. CONCLUSÃO

Com os resultados descritos, acredita-se que os tratamentos aqui descritos mostram-se, em grande maioria, seguros para próximos testes de perfil de eficácia *in vitro*, com análises de expressão gênica de genes relacionados à CTE, por exemplo.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) e à Universidade Franciscana pelo fomento recebido para o desenvolvimento do projeto.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, B.; RADI, R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 295-311, 2003.

ANDREAZZA, A. C. *et al*. Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the pré-frontal cortex of patients with bipolar disorder. **Archives of General Psychiatry,** v. 67, p. 360-368, 2010.

BERK, M. *et al*. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 804–817, 2011.

BROOKES, P. S. Mitochondrial H (+) leak and ROS generation: an odd couple, Free Radic. **Biology and Medicine,** v. 38, p. 12–23, 2005.

BHATTI, J.S; BHATTI, G. K; REDDY, P.H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - a step towards mitochondria based therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Diseases**, v. 1863, p. 1066–1077, 2017.

CHOI, W. S. *et al.* The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS stimulated RAW264. 7 macrophage cells. **Cellular Immunology,** v. 280, n. 2, p. 164-170, 2012.

DAVIDSON, C. B. *et al*. Potencial anti-inflamatório do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. em células pulmonares ativadas. **Disciplinarum Scientia**, v. 23, p. 1-12, 2022.

De MENEZES, L. B. et al. Calcium oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization and photocatalytic activity for application in yellow tartrazine dye removal. **Journal of Photochestry and Photobiology A**, v. 447, p. 115182-115192.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods.** v. 26, p. 335-340, 2002.

FRESHNEY, R, I. **Culture of animals cells: a manual of basic technique and specialized applications**. John Wiley & Sons, ed. 7, 2010.

HUBBS, A. F. *et al*. Nanotoxicology-A Pathologist's Perspective. **Toxicologic Pathology,** v. 39, p. 301-324, 2011.

KANG, K. S. *et al*. Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells *In Vitro* and In Vivo via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. **PlosOne,** v. 5, n. 4, 2010.

KIM, H. K.; CHEN, W.; ANDREAZZA, A. C. The Potential Role of the NLRP3 Inflammasome as a Link between Mitochondrial Complex I Dysfunction and Inflammation in Bipolar Disorder. **Neural Plasticity,** v. 2015, p. 1-10, 2015.

KROLL, A. *et al*. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. **Journal oh Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 370-377, 2009.

MACHADO, A. K. *et al*. Neuroprotective Effects of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone In Vitro Exposure. **Oxid. Med. Cell. Longev,** v. 2016. p. 1-14, 2016.

MALHI, G. S. *et al*. Potencial Mecanism of Action of Lithium in Bipolar Disorder. **CNS Drugs**, v. 27, p. 135-153, 2013.

NHS. **Guideline for the Management of Patients on Lithium**. Forth Valley: NHS, 2013.

POLI, G. *et al*. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 9, 1163-1182, 2004.

PRASUN, P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. **BBA- Molecular Basis of Disease,** v. 1866, p. 165838-165843, 2020.

SENTHILKUMAR, N. *et al*. Synthesis of ZnO nanoparticles using leaf extract of *Tectona grandis* (L.) and their anti-bacterial, anti-arthritic, anti-oxidant and *in vitro* cytotoxicity activities. **New Journal of Chemistry**, v. 41, p. 10347-10356, 2017