

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LÍQUIDOS TRATADOS COM PLASMA EM PRESSÃO ATMOSFÉRICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO*

Diego Verduino Das Neves<sup>1</sup>

Professor Nilson Cristino da Cruz<sup>2</sup>

Professora Elaine Conceição de Oliveira<sup>3</sup>

Aluno do CST Diego Verduino das Neves; e-mail: diegoverduino@hotmail.com<sup>1</sup>

Professor da Unesp Sorocaba; e-mail: nilson.cruz@unesp.br<sup>2</sup>

Professor da Fatec; e-mail: elainecoliveira@hotmail.com<sup>3</sup>

**Área do conhecimento:** Ciências da Saúde, Imunologia, Fisiologia, Imunoterapia.

**Palavras-chave:** Plasma Atmosférico. Melanoma. Terapia do câncer.

## INTRODUÇÃO

O Plasma em Pressão Atmosférica (PPA) vem sendo muito estudado em diversas áreas, que vão desde aplicações a materiais até tratamentos de doenças como o câncer. O Plasma é a combinação de um componente físico, a corrente elétrica e um componente químico que é um gás (ar comprimido, hélio, argônio entre outros). A corrente elétrica em contato com o gás estimula seus elétrons que passa para um estado parcialmente ionizado e altamente reativo. O gás ionizado em contato com o ar gera espécies reativas do oxigênio (ROS) e espécies reativas do nitrogênio (RNS), entre outros produtos (XIANG et al., 2018). Essas espécies são radicais livres que incluem algumas formas de oxigênio como, ozônio ( $O_3$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical de dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), radicais orgânicos, elétrons, íons energéticos e partículas carregadas (GUMBEL et al., 2017). Espécies reativas, possuem atividade sobre células e tecidos causando danos irreversíveis na membrana plasmática e mudanças nos processos de regulação intracelular. O PPA tem apresentado resultados promissores quando aplicado diretamente no tumor, ou indiretamente através da aplicação de líquidos expostos ao PPA.

O melanoma cutâneo é uma das formas mais agressivas de câncer de pele e uma das principais causas de mortalidade por câncer devido ao seu poder metastático. O melanoma é um dos tipos de câncer considerado mais comum no mundo inteiro, com uma das maiores incidência sendo no Brasil. O melanoma surge através da transformação dos melanócitos, que são células produtoras da melanina, que são responsáveis pela pigmentação e foto proteção da pele, olhos, epitélios da mucosa e meninges (BOTTI et al., 2013). Em estágios mais avançados do câncer, alguns tratamentos como a quimioterapia mostram uma eficácia limitada, além do desenvolvimento de resistência a diferentes tipos de drogas antitumorais. Neste trabalho, em parceria com o Prof. Nilson Cristino da Cruz do Laboratório de plasma da UNESP Sorocaba (Laptec) estamos investigando os efeitos de líquidos tratados a plasma sobre células tumorais *in vitro* utilizando o cultivo bidimensional 2D e cultivo tridimensional 3D.

## OBJETIVO

Avaliar os efeitos de líquidos tratados com plasma em pressão atmosférica em células do câncer de pele.

## METODOLOGIA

**Linhagens celulares:** melanoma murino (B16F10) e fibroblasto murino (L929) foram mantidas em garrafas de cultura de 25 e 75  $cm^2$  com meio de cultivo RPMI (SIGMA – Aldrich) acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de Glutamina e 1% de antibiótico (meio completo), onde as garrafas

permanecem em incubadora com temperatura de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a confluência necessária.

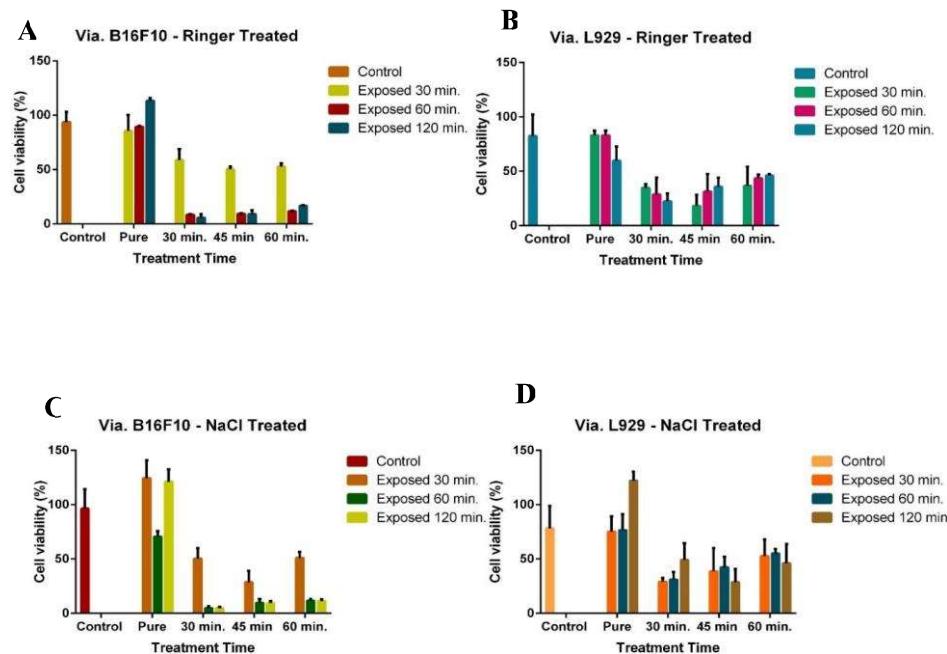
**Cultivo celular:** 24h antes de iniciar o tratamento, as células aderidas em garrafas de cultura foram tripsinizadas (Tripsina EDTA – Vitrocell Brasil) e transferida para tubos graduados estéreis. Os tubos foram centrifugados á 1200 rpm por 10 minutos, posteriormente as células foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração 1x10<sup>4</sup> célula/ml. As placas foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> até o início dos experimentos

**Tratamento a plasma e cultivo celular:** O aparelho usado para tratamento das soluções foi o Jet KINPen Med (Neoplas Tools, Greifswald Germany) do Laptec (UNESP Sorocaba). As soluções usadas foram o Soro Fisiológico á 0,9% e Ringer Lactato, que foram tratados por diferentes tempos. A exposição dos líquidos ao plasma foi feita com 5 Litros de gás por minuto com tempos de 30, 45 e 60 min e posteriormente foram esterilizados usando filtro de 0,22 µm. Finalizado os tratamentos, as células B16F10 e L929 foram expostas as três soluções por 30, 60 e 120 minutos. Posteriormente o NaCl e Ringer foram retirados, o meio de cultura completo foi adicionado a cada poço, estas placas foram devolvidas a incubadora de CO<sub>2</sub> por 24h. Para avaliar a capacidade dos líquidos interferir no crescimento celular foi utilizado o teste do MTT. As soluções foram congeladas por 10 semanas e o mesmo teste foi realizado, para que pudesse verificar se o congelamento poderia manter o tratamento com o PPA.

**Viabilidade celular por MTT:** O teste de MTT consiste em um ensaio que avalia a atividade de enzimas mitocondriais que possuem a capacidade de converter o MTT (sal de tetrazólio) de cor amarela em formazan (cristais insolúveis de cor roxa) indicando a viabilidade celular (MAGALHÃES, THÁ e LEME, 2018). O MTT foi preparado na concentração de 5mg/mL de PBS estéril. Uma solução contendo 20 µL de MTT 5mg/mL foi preparada com 150 µL de meio completo, onde foi efetuado um cálculo para determinar a quantidade aproximada para todos os poços de ambas as placas de modo que cada poço recebesse 170 µL (Meio + MTT). Posteriormente ao período de incubação das células com o tratamento, o meio de cultivo que continha as soluções foi retirado de cada poço e foi acrescentada 170 µL/poço do meio com MTT. A placa foi levada à estufa e permaneceu durante 1 hora para atividade do sal de tetrazólio, em seguida este meio foi retirado e acrescentamos 100 µL de DMSO, incluindo as células controle e um poço escolhido para conter só o DMSO (branco), para a análise em leitor de Elisa em comprimento de onda de 540 nm, O valor do branco foi subtraído de todos os outros para indicação em densidade ótica de células vivas. Quanto maior a absorbância medida pelo aparelho, maior será o número de células viáveis.

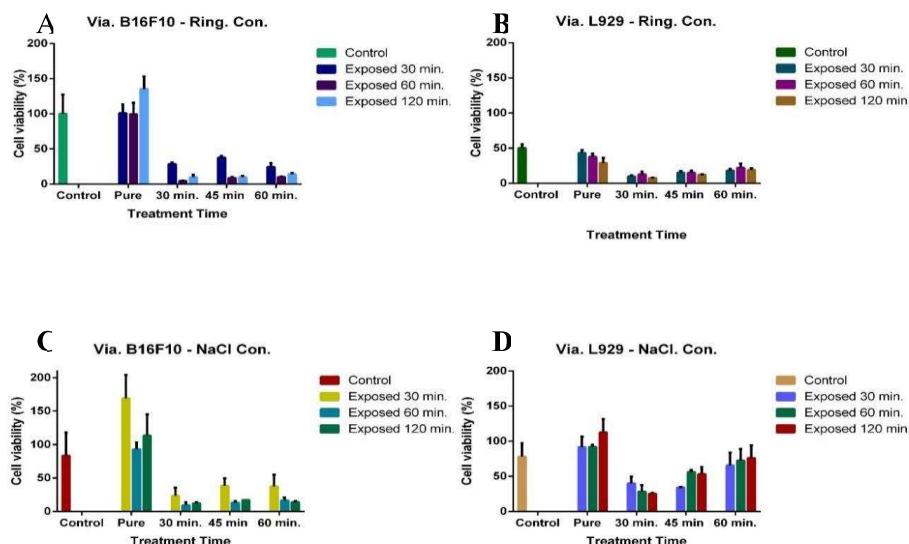
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analizando os gráficos nas Figura 2 e Figura 3, podemos constatar que ambas das soluções tratadas tiveram efeitos satisfatórios sobre o melanoma, tivemos uma redução na quantidade de células viáveis em relação as células que não foram submetidas a nenhum tratamento e também temos como comprovar que somente as soluções puras não fazem tanto efeito nas células tumorais, como parâmetro de comparação usamos células saudáveis para avaliação das soluções, e tivemos o resultado de que as soluções tratadas afetam minimamente as células saudáveis, levando em consideração que o nosso organismo produz e degrada as espécies reativas do oxigênio, onde por exemplo, o peróxido de hidrogênio, uma das espécies que possui maior tempo de vida é degradado em nosso organismo naturalmente e é transformado em água (H<sub>2</sub>O) e di oxigênio (O<sub>2</sub>), já na célula tumoral não ocorre isso, ela não possui esse fatores naturais de degradação, onde esses óxidos se ligam á outros componentes como o ferro (Fe), que são tóxicos para a célula, como a célula tumoral não possui esse mecanismo de degradação é interessante o estudo dessa ligação e sinalização, outro ponto que chegamos, os tratamentos não são tão prejudicais as células saudáveis, as soluções congeladas como mostram



**Figura 2.** Viabilidade celular do melanoma murino (B16F10) (2A e 2C) e Fibroblasto murino (L929) (2B e 2D), por tempo de tratamento e períodos de exposição, cada barra indica o tempo de exposição, no eixo horizontal da esquerda para direta, as soluções de NaCl 0,9% e Ringer Lactato foram tratadas no mesmo dia da exposição.

os gráficos tiveram seu feito melhorado conforme o tempo de congelamento, notamos também que, quanto menor o tempo de tratamento e maior o período de exposição, o tratamento foi mais efeto, onde quanto maior os tempos de tratamento, os efeitos não se alteravam muito. Esse é um passo importante que demos, onde podemos definir um melhor tempo de tratamento e exposição.



**Figura 3.** Viabilidade celular do melanoma murino (B16F10) (3A e 3C) e Fibroblasto murino (L929) (3B e 3D), por tempo de tratamento e períodos de exposição, cada barra indica o tempo de exposição, no eixo horizontal da esquerda para direta, as soluções de NaCl 0,9% e Ringer Lactato foram tratadas e congeladas por 75 dias.

## CONCLUSÃO

Podemos concluir que as Células de Melanoma Murino (B16F10), são mais suscetíveis ao tratamento dessas duas solução NaCl 0,9% e Ringer Lactato tratadas com o Plasma em Pressão Atmosférica, reduzindo a quantidade de células vivas e não tendo um impacto tão agressivo as células saudáveis de

Fibroblasto Murino (L929), com destaque para a solução de Ringer Lactato congelada que teve um efetividade maior sobre as tumorais de Melanoma Murino em especial no tratamento de 30 minutos com exposição de 60 minutos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTTI, G. *et al.* Microenvironment and tumor progression of melanoma: new therapeutic prospectives. **Immunotoxicol.**, v.10, n.3, p.235-52, 2013.

GÜMBEL D, BEKESCHUS S, GELBRICH N, NAPP M, EKKERNKAMP A, KRAMER A, STOPE MB. Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Osteosarcoma. **Int J Mol Sci.** 2017 Sep 19;18(9):2004.

XIANG L, XU X, ZHANG S, CAI D, DAI X. Cold atmospheric plasma conveys selectivity on triple negative breast cancer cells both in vitro and in vivo. **Free Radic Biol Med.** 2018 Aug 20;124:205-213.