

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

Diego Verduino Das Neves¹
Professor Nilson Cristino da Cruz²
Professora Elaine Conceição de Oliveira³

Aluno do CST Diego Verduino das Neves; e-mail: diegoverduino@hotmail.com¹
Professor da Unesp Sorocaba; e-mail: nilson.cruz@unesp.br²
Professor da Fatec; e-mail: elainecoliveira@hotmail.com³

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 (O₃), ânion superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical de dióxido de nitrogênio (NO₂), 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 cm² 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 CO₂, até atingirem a confluência necessária.

Cultivo celular: 24h antes de iniciar o tratamento, as células aderidas em garrafas de cultura foram tripsinizadas (Trypsina EDTA – Vitrocell Brasil) e transferida para tubos graduados estéreis. Os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos, posteriormente as células foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração 1x10⁴ célula/ml. As placas foram mantidas em incubadora de CO₂ 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 a 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 CO₂ 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 amarelada 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 (H₂O) e di oxigênio (O₂), 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 prejudiciais as células saudáveis, as soluções congeladas como mostram

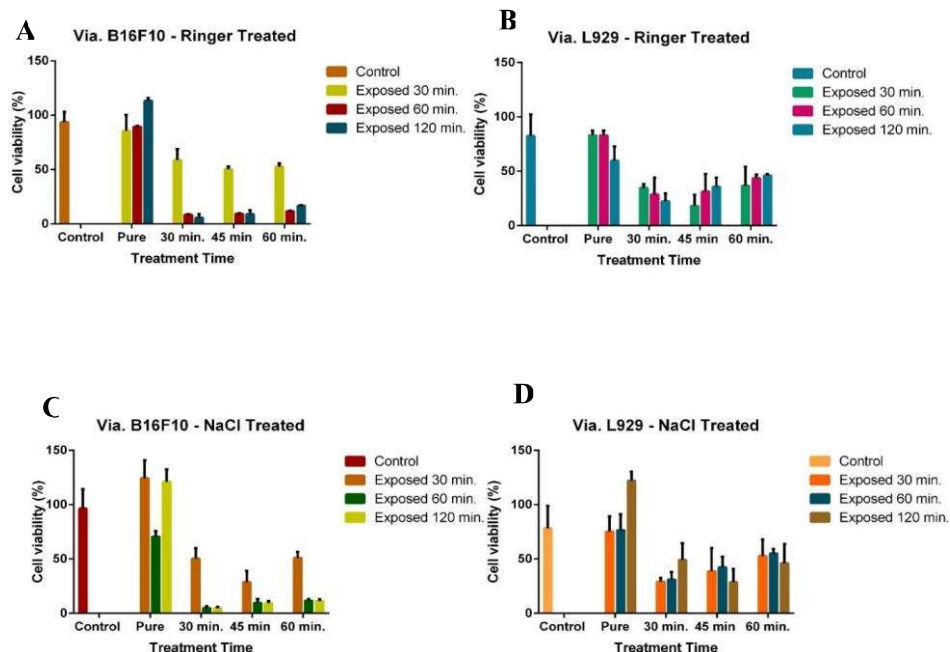


Figura 2. Viabilidade celular do melanoma murino (B16F10) (2A e 2C) e Fibroblasto murino (L929) (2B e 2D), por tempo de tratamento e períodos de exposição, cada barra indica o tempo de exposição, no eixo horizontal da esquerda para direita, as soluções de NaCl 0,9% e Ringer Lactato foram tratadas no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

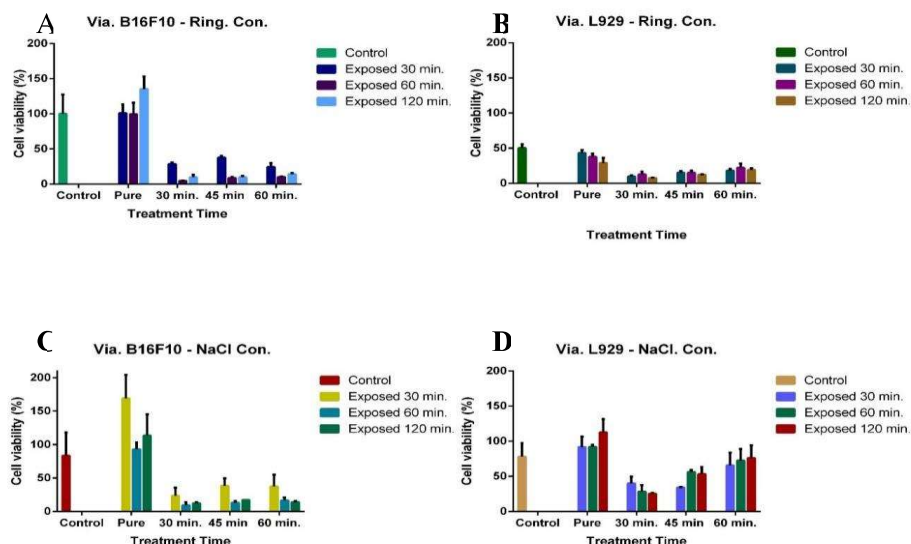


Figura 3. Viabilidade celular do melanoma murino (B16F10) (3A e 3C) e Fibroblasto murino (L929) (3B e 3D), por tempo de tratamento e períodos de exposição, cada barra indica o tempo de exposição, no eixo horizontal da esquerda para direita, as soluções de NaCl 0,9% e Ringer Lactato foram tratadas e congeladas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