

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
CAMPUS VIÇOSA - MG  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL**

**THANYANNE RAFAELA DE MORAIS FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIBERADORAS DE  
QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS**

**VIÇOSA  
2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
CAMPUS VIÇOSA**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIBERADORAS DE  
QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS**

Aluna: Thanyanne Rafaela de Moraes Ferreira  
Orientadora: Anesia Aparecida dos Santos

Monografia, apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Viçosa  
como requisito para obtenção do título de bacharel  
em Ciências Biológicas.

**VIÇOSA  
2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
CAMPUS VIÇOSA**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS LIBERADORAS DE  
QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS**

Monografia, apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Viçosa  
como requisito para obtenção do título de bacharel  
em Ciências Biológicas.

APROVADA: 28 de novembro de 2025



Documento assinado digitalmente

**THANYANNE RAFAELA DE MORAIS FERREIRA**

Data: 01/12/2025 22:07:10-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Thanyanne Rafaela de Moraes Ferreira  
(Autora)



Documento assinado digitalmente

**ANESIA APARECIDA DOS SANTOS**

Data: 02/12/2025 10:33:02-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Dra. Anésia Aparecida dos Santos  
(Coordenadora)  
Departamento de Biologia Geral – UFV

**VIÇOSA  
2025**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que em sua imensa bondade me abençoou imensamente durante toda a minha vida e à Nossa Senhora Aparecida, que sempre intercedeu por mim quando precisei, dando-me forças e coragem para continuar.

Aos meus pais, que são meu alicerce e não mediram esforços para que eu pudesse me formar, me apoiando e incentivando em todos os momentos.

À Ayla, que me proporcionou momentos de alegria, amor e distração em meio ao caos da graduação.

À minha orientadora, Anésia, e aos membros da banca, Amanda Gonçalves e Márcia Esteves, pela orientação e apoio.

À FAPEMIG, à CAPES e ao CNPq pelo fomento a esta pesquisa.

## RESUMO

O câncer é considerado uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, representando um grande problema de saúde pública. Uma das formas de tratamento amplamente utilizadas no tratamento de diferentes tipos de câncer tem sido a quimioterapia, apesar de causar efeitos adversos. A doxorubicina (DOX) se destaca por ser considerada um dos fármacos mais eficazes aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA). A fim de contornar o surgimento dos efeitos colaterais, urge a necessidade de desenvolvimento de estratégias para aprimorar os tratamentos. Nesse contexto, a nanotecnologia desponta como uma alternativa promissora para o direcionamento e liberação controlada do fármaco. Neste estudo, investigou-se a citotoxicidade da DOX pura em linhagens celulares normais e tumorais, bem como a capacidade de automontagem da proteína capsidial do *Sida yellow spot virus* (SiYSV) em moléculas de dsDNA e a eficiência dessas nanopartículas como carreadoras de quimioterápicos. Os resultados demonstraram que a proteína capsidial é capaz de interagir e formar nanopartículas estáveis e não tóxicas para as células. Além disso, demonstrou-se que a linhagem tumoral apresenta maior sensibilidade à DOX do que as células normais e que as nanopartículas carregadas com o fármaco apresentaram citotoxicidade diferenciada quando comparadas com a droga livre. Deste modo, apesar de serem necessários mais estudos, o presente trabalho apresenta uma alternativa inovadora e potencialmente viável, bem como reforça a possibilidade de aplicação da nanotecnologia no tratamento do câncer.

**Palavras-chave:** Câncer; doxorubicina; nanotecnologia; citotoxicidade; proteína.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	10
2.1.    Objetivo geral.....	10
2.2.    Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1.    DOX pura.....	11
3.1.1. Cultivo e plaqueamento.....	11
3.1.2. Aplicação da droga.....	12
3.1.3. Ensaio de MTT.....	13
3.1.4. Análises estatísticas.....	13
3.2.    DOX CARREADA POR NANOPARTÍCULA.....	14
3.2.1. Obtenção das proteínas virais .....	14
3.2.2. Avaliação da interação da proteína capsial de SiYSV com moléculas de DNA.....	14
3.2.3. Avaliação do efeito citotóxico das nanopartículas .....	15
3.2.4. Montagem das nanopartículas.....	15
3.2.5. Aplicação da droga e nanopartículas .....	15
3.2.6. Ensaio de MTT.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1.    Citotoxicidade da DOX pura.....	17
4.2.    Interação da proteína capsial AV1 com DNA e DOX.....	18
5. CONCLUSÃO .....	21
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

## 1. INTRODUÇÃO

O “câncer” é um termo usado, de forma geral, para nomear o crescimento desordenado de células anormais. Apesar de existirem mais de 100 formas da doença e cada uma possuir suas características únicas, os processos básicos que levam ao surgimento de diversos tumores são, normalmente, semelhantes (WEINBERG, 1996).

As células cancerígenas, diferentemente das células saudáveis, ignoram os controles do ciclo celular e se multiplicam descontroladamente, além de possuírem a capacidade de migrar do local onde se originaram e invadir outros tecidos do corpo, formando as chamadas metástases (WEINBERG, 1996).

O câncer colorretal (CCR) é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado em mulheres e o terceiro em homens, sendo considerado a quarta causa mais comum de morte no Brasil. Essa neoplasia é caracterizada por tumores no cólon e no reto, possuindo caráter multifatorial e de diagnóstico tardio (PEREIRA et al., 2024).

Apesar da idade acima de 50 anos ser considerada o maior fator de risco, nos últimos anos houve um aumento da incidência de câncer colorretal em jovens. Esse aumento está relacionado ao estilo de vida e nutrição da população, uma vez que dieta rica em alimentos gordurosos e com baixo teor de cálcio, obesidade e sedentarismo, consumo excessivo de bebidas alcoólicas e tabagismo também são classificados como fatores importantes (PEREIRA et al., 2024).

A conscientização quanto aos comportamentos que aumentam os fatores de risco é de extrema relevância para a prevenção dessa doença. Um estudo realizado por Piñerúa-Gonsálvez et al. (2023), analisou 101 pacientes que foram diagnosticados com CCR antes dos 50 anos. Desses pacientes, 14,9% faziam consumo de álcool, 29,7% eram fumantes e 22,8% tinham histórico de CCR na família. Os resultados desse estudo enfatizam a importância da implementação de hábitos saudáveis visando prevenir não só o CCR, como também outras enfermidades (ANDRADE et al., 2024).

O tratamento do câncer colorretal depende do tamanho, localização e extensão do tumor, além da saúde geral do paciente. Pode ser tratado com cirurgia (curativa ou paliativa), quimioterapia e/ou radioterapia. O tratamento cirúrgico é de caráter curativo

quando o tumor primário e metástases (quando existentes) são removidos completamente e, é paliativo quando tem o objetivo de aliviar os sintomas (PEREIRA et al., 2024).

O tratamento com quimioterapia desempenha papel importante na redução da recidiva. No caso da radioterapia, são usados raios-X de alta energia para destruir as células cancerosas. Tanto a quimioterapia quanto a radioterapia podem ser usadas antes ou depois da cirurgia . Por ser um câncer de diagnóstico tardio e de baixa taxa de sobrevida, é evidente a necessidade de desenvolvimento de terapias novas e mais eficazes no tratamento dessa neoplasia (PEREIRA et al., 2024).

A quimioterapia para tratamento do câncer colorretal se dá, principalmente, à base de 5-fluorouracil e ácido folínico. O protocolo típico prevê a administração dos fármacos durante cinco dias consecutivos, com intervalos de 21 dias, durante seis meses (PEREIRA et al., 2024).

A doxorubicina (DOX) é um quimioterápico da classe das antraciclinas que tem um potencial terapêutico significativo, sendo reconhecida como um dos fármacos mais eficazes aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de vários tipos de câncer, como câncer de mama, carcinomas, sarcomas e neoplasias hematológicas. O modo de ação da DOX se dá pela intercalação ao DNA, formando ligações de hidrogênio com as guaninas entre pares de base GC (KCIUK, et al., 2023).

Apesar da alta atividade antineoplásica, os efeitos tóxicos da doxorubicina são multifacetados, causando efeitos adversos e indesejados, como danos ao cérebro, fígado, rins, mas principalmente ao coração (KCIUK, et al., 2023).

Desta forma, alternativas que contornem tais efeitos colaterais se fazem necessárias para o emprego desta droga na quimioterapia e alguns estudos apontam o uso da nanotecnologia como uma possível solução. Na literatura já foi demonstrado, por exemplo, que a DOX carregada em nanopartículas que utilizam o capsídeo do Vírus Mosaico do Tabaco como componente carreador, ofereceu maior citotoxicidade e seletividade que a DOX pura, em experimentos tanto *in vitro* e quanto *in vivo* (TIAN et al., 2016).

Em trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisas obtivemos uma

nanopartícula revestida por proteína viral virus-like (Virus-Like DNA Protein), constituída de moléculas DNA carreando a droga intercalante doxorubicina (DOX-VLDP). Os estudos demonstram que esta construção causou morte celular por apoptose em linhagens tumorais de melanoma (B16F10) e glioma (C6) murinos após ser interiorizada pelas células e liberar seu conteúdo no citosol, causando aumento da autofagia celular e indução do processo de apoptose em taxas mais elevadas que a DOX pura (Gonçalves, 2023).

Novas pesquisas possuem como foco central a avaliação de proteínas naturais com capacidade auto-montável sobre moléculas biológicas, que possam ser utilizadas como carreadoras de fármacos. Neste sentido, as proteínas capsidiais de vírus de plantas tem sido demonstradas como possível fonte nanobiotecnológica. Uma vez que diversos quimioterápicos conhecidos são capazes de intercalar na molécula de DNA dupla fita, vírus de plantas com material genômico constituído de moléculas de DNA nos pareceu a escolha correta para o desenvolvimento de nanopartículas naturais.

A família Geminiviridae é composta por vírus com um ou dois componentes genômicos de DNA circular de fita simples (ssDNA) de 2.600 a 2.800 nucleotídeos (nt) de comprimento, encapsulados em partículas geminadas quase icosaédricas e transmitidos por diferentes vetores insetos (Fiallo-Olive et al., 2021). De acordo com sua organização genômica, gama de hospedeiros, vetor inseto e relações filogenéticas, os membros da família Geminiviridae são divididos em 14 gêneros: Becurtovirus, Begomovirus, Capulavirus, Citlodavirus, Curtovirus, Eragrovirus, Grablovirus, Maldovirus, Mastrevirus, Mulcrilevirus, Opunvirus, Topilevirus, Topocuvirus e Turncurtovirus (Fiallo-Olive et al., 2021).

O gênero Begomovirus constitui o grupo com o maior número de espécies e é o mais importante economicamente. De acordo com sua arquitetura genômica e relações filogenéticas, os begomovírus são divididos em dois grandes grupos: Novo Mundo (NM - as Américas) e Velho Mundo (VM - África, Ásia e Europa) (Bridson et al., 2010). Os begomovírus do NM são predominantemente bipartidos e seus

componentes genômicos são denominados DNA-A e DNA-B, enquanto os begomovírus do VM podem ser monopartidos ou bipartidos e geralmente estão associados a moléculas de DNA satélite (Zhou, 2013). Dentre as proteínas codificadas no genoma dos begomovírus, a proteína capsidial (CP – codificada pela ORF [open reading frame] AV1) é essencial para a transmissão pelo vetor, além de ser a proteína mais conservada dos begomovírus (Harrison et al., 2002). No entanto, Xavier (2015) descreveu um begomovírus bipartido com uma CP altamente divergente, quando comparados com outros begomovírus, denominado Sida yellow spot virus (SiYSV) (Xavier, 2015).

Por outro lado, Lima (2022) não observou partículas virais ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) e mostrou que este vírus não é transmitido pela mosca branca . *Bemisia tabaci* MEAM1.

Assim, tais conhecimentos e resultados obtidos nos motivou ao desenvolvimento destes experimentos, a fim de investigar o potencial de formação da nanopartícula de proteínas capsidiais do SiYSV e sua aplicação como carreadora do fármaco doxorrubicina.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

Este estudo teve como objetivo analisar e comparar a citotoxicidade da doxorrubicina pura e de nanopartículas virais em linhagens celulares normais e tumorais.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Analisar o desempenho citotóxico da doxorrubicina pura em linhagens normais e tumorais.
- Avaliar a capacidade de automontagem da proteína capsidial do vírus *Sida yellow spot virus* (SiYSV).
- Comparar o efeito citotóxico das nanopartículas virais em linhagens celulares humanas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. DOX pura

##### 3.1.1. Cultivo e plaqueamento

As células foram cultivadas em frascos de polietileno contendo 5 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco). As linhagens celulares de epitélio normal de rim de macaco BGM (CVCL-4125), e a linhagem de adenocarcinoma de cólon humano – SW480 (ATCC CCL-228™) foram incubadas e mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade atmosférica, que são as condições adequadas para a replicação celular. Após passagem do tempo necessário para que as células se replicassem e chegassem à subconfluência sobre o fundo da garrafa, o meio de cultura foi retirado e foram realizadas três lavagens com 2 mL de solução salina PBS-EDTA (2 g $\times$ L<sup>-1</sup>), para retirar todo o meio de cultura e não ficar resquícios de SFB, já que ele inibe a ação enzimática da tripsina na próxima etapa. Em seguida, foi adicionado 1000  $\mu$ L da solução de tripsina-EDTA (2,5 g $\times$ L<sup>-1</sup>), que é uma enzima que age nas junções celulares, fazendo com que as células se soltem umas das outras, bem como do fundo da garrafa.

Ainda nessa etapa, após adicionada a solução, as garrafas contendo as células foram incubadas mais uma vez em estufa por cerca de 5 minutos (tempo necessário para que a enzima atue sobre as junções e as células se desprendam). Assim que as células de cada linhagem se encontraram soltas na garrafa (fato que foi observado ao microscópio), as garrafas foram levadas para a cabine de fluxo laminar, onde podiam ser manipuladas em ambiente estéril, sem risco de contaminação. Já dentro do fluxo, foi adicionado entre 3000 e 4000  $\mu$ L de meio de cultura, para cessar a ação da tripsina.

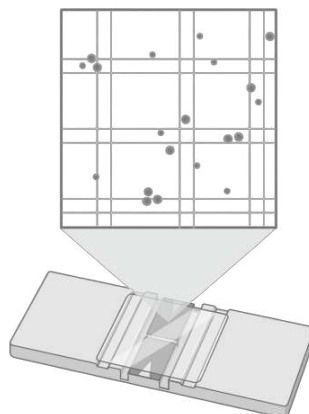
Após o estágio de tripsinização, as soluções de células foram utilizadas para montagem de placas de experimentos. Sendo necessário 100 mL de solução contendo  $1 \times 10^4$  células em cada poço, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer, que é dividida em quatro quadrantes (Figura 1). O cálculo do volume de suspensão de células necessário foi realizado de acordo com a seguinte

fórmula:

$$\frac{\sum \text{ número de células em cada quadrante}}{\text{número de quadrantes}}$$

O resultado obtido foi o número de células por mL, sendo necessário calcular também quantas células existiam na garrafa, com base na quantidade total de solução obtida e, após isso, calcular a quantidade necessária para preencher a placa, o que podia ser feito a partir de regra de três.

**Figura 1** - Câmara de Neubauer



Após a montagem do experimento, as placas foram incubadas em estufa por 24 horas.

### **3.1.2. Aplicação da droga**

Após o período de incubação, foi aplicada a doxorubicina, com concentrações diferentes em cada coluna da placa. As diferentes concentrações foram obtidas através de diluição seriada. Na primeira coluna foi aplicada uma solução com concentração de 20  $\mu\text{M}$  e, na penúltima, de 0,08  $\mu\text{M}$ . Na última coluna foi aplicado apenas meio de cultura, a fim de ser utilizada como controle negativo.

As diluições foram feitas da seguinte maneira: primeiramente foram pipetados 2000  $\mu\text{L}$  de meio de cultura na primeira canaleta e 1000  $\mu\text{L}$  nas demais. Posterior a isso, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  da DOX na concentração 1 mM, na primeira canaleta

e devidamente homogeneizado, em seguida, foi iniciada a diluição seriada, retirando 1000 µL da primeira canaleta e passando para a segunda e, assim, respectivamente, até a penúltima canaleta. Após isso, o meio de cultura antigo foi retirado da placa e foram pipetados 100 µL da solução de DOX recém preparada em cada poço da respectiva coluna, conforme descrito acima.

Após a aplicação, as placas foram incubadas em estufa por 48 horas.

### **3.1.3. Ensaio de MTT**

Decorridas as 48 horas, as placas foram retiradas da estufa e as soluções da DOX foram substituídas por solução de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazolio] (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). A solução foi preparada utilizando 10% de MTT a 0,5 mg x L<sup>-3</sup> e 90% de meio de cultura completo.

Após o preparo, foram pipetados 50 µL da solução em cada poço da placa (como o MTT é um composto fotoreativo, essa etapa foi realizada com a luz do fluxo apagada). Assim que finalizadas as aplicações, as placas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas novamente na estufa por aproximadamente 3 horas.

Passadas as 3 horas, a solução de MTT foi retirada e substituída por DMSO puro, também 50 µL em cada poço, sendo pipetado, também, na última coluna da placa, que estava vazia. Em seguida, as placas foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nM.

### **3.1.4. Análises estatísticas**

A partir dos valores dos três experimentos independentes, realizados com diferentes concentrações da DOX pura, foi possível calcular a concentração inibitória de 50% das células (IC50) e, com esse valor de concentração, calcular o índice de seletividade (IS) das células em relação ao composto. Tal índice é calculado com a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{IC50 \text{ células normais}}{IC50 \text{ células tumorais}}$$

As análises estatísticas feitas por meio de regressão não linear e análise de variância ANOVA one-way (post test Tukey) foram realizadas no software GraphPad Prism versão 5.0.

### **3.2. DOX carregada por nanopartícula**

Após a realização dos experimentos citados acima, novos experimentos foram realizados para as mesmas linhagens celulares, utilizando proteínas virais naturais como carreadoras. A obtenção, transformação e confirmação do clone contendo a região codificadora da proteína capsidial (ORF AV1) do Sida yellow spot virus (SiYSV), bem como o desenvolvimento dos protocolos de indução e purificação foram realizados nos laboratórios de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO) e no laboratório de Imunoglicobiologia (DBG) por pesquisador em estágio de pós-doutorado.

#### **3.2.1. Obtenção das proteínas virais**

O vetor pET24a+ contendo a sequência codificadora da proteína capsidial (CP) do vírus SiYSV (Sida yellow spot vírus) foi adquirido da Symbio Technologies (FastBio Ltda EPP). Tal construção foi utilizada na transformação de *E. coli* estirpe Artic (DE3), a qual foi selecionada, armazenada a -20°C e induzida com IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) para expressão da proteína viral. Após a expressão a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade e quantificada.

#### **3.2.2. Avaliação da interação da proteína capsidial de SiYSV com moléculas de DNA**

A avaliação da autoformação de complexos DNA-proteína *in vitro* foi realizada por meio da incubação, em baixas temperaturas da proteína capsidial do vírus SiYSV e fragmentos de DNA seguida de Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética em gel (EMSA) proposto por Hellman e Fried (2007). A partir de resultados obtidos em Gonçalves (2025) e em experimentos obtidos por nosso grupo de pesquisadores com a proteína viral do capsídeo de Cabbage leaf curl vírus, foi proposta a utilização do DNA de 600 pares de bases, na concentração de 50 ng e de 10 µg da purificação obtida da proteína capsidial de SiYSV (Sida yellow spot vírus). A eletroforese foi realizada em gel de agarose (SIGMA Aldrich) 1% em tampão TAE 1X (Tris- Acetato – EDTA) a 60 V, 400

mA por 60 minutos.

### **3.2.3. Avaliação do efeito citotóxico das nanopartículas**

As linhagens celulares BGM e SW480 foram cultivadas como descrito anteriormente no ítem 3.1.1. A fim de obtermos  $5 \times 10^3$  células por poço foram necessárias  $35 \times 10^4$  células totais. O resultado obtido na contagem foi o número de células por mL, e o volume total necessário para a montagem da placa pôde ser calculado.

Após a montagem do experimento, as placas da linhagem BGM foram incubadas em estufa por 24 horas e as da SW480 por 48 horas, uma vez que já havia sido observada, em experimentos anteriores, certa resistência da segunda linhagem à aderência ao fundo da placa.

### **3.2.4. Montagem das nanopartículas**

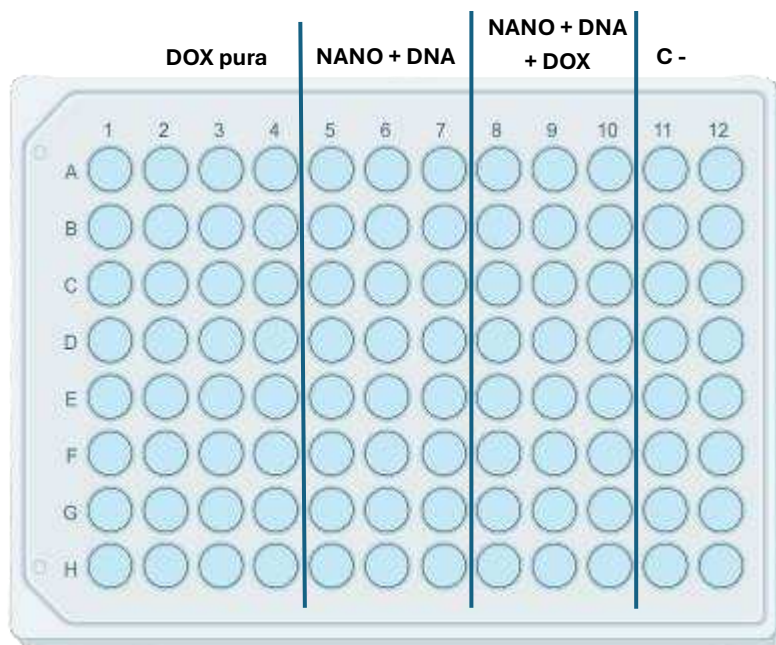
Para a montagem das nanopartículas carregadas (DOX – VP) foram utilizados  $4\mu\text{L}$  de DNA 600 pb a  $100 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$  acrescidos de  $16 \mu\text{L}$  de Doxorubicina 1mM. A mistura foi incubada por 1 hora no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado  $62,5\mu\text{L}$  da proteína capsial de SiYSV a  $1,28 \text{ mg}\mu\text{mL}^{-1}$  e incubado por 48 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Para o preparo de nanopartículas vazias a solução contendo  $4\mu\text{L}$  de DNA 600 pb a  $100 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$  acrescidos de  $16 \mu\text{L}$  de Tris-HCl 10mM foi incubada por 1 hora no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado  $62,5 \mu\text{L}$  da proteína capsial de SiYSV e incubado por 48 horas a  $4^\circ\text{C}$ .

### **3.2.5. Aplicação da droga e nanopartículas**

Passado o tempo de incubação das células na placa de 96 poços, esta foi dividida em quatro partes, sendo as três primeiras com três colunas em cada e a última com uma única coluna. Nas colunas de 2 a 4 foi aplicada a doxorubicina pura, na concentração inicial de  $10 \mu\text{M}$  na coluna 2, sendo feita diluição seriada nas duas colunas seguintes. Nas colunas de 5 a 7, foi aplicada a nanopartícula + DNA e nas de

8 a 10 a nanopartícula + DNA + DOX 10  $\mu$ M. Na coluna 11 foi aplicado apenas meio de cultura, a fim de ser utilizada como controle negativo (Figura 2).

**Figura 2** – Divisão da placa para a aplicação



Para a preparação de uma placa, as diluições foram feitas da seguinte maneira: na primeira canaleta de cada uma das três partes foram pipetados 1500  $\mu$ L de meio de cultura e 750  $\mu$ L nas demais. Posterior a isso, foram adicionados 15  $\mu$ L da DOX a 1mM na primeira canaleta e devidamente homogeneizado, em seguida, foi iniciada a diluição seriada, retirando 750  $\mu$ L da primeira canaleta e passando para a segunda e, depois 750  $\mu$ L da segunda para a terceira. Na quarta canaleta (já contendo 1500  $\mu$ L de meio de cultura), foram pipetados 82,4  $\mu$ L da solução contendo as nanopartículas + DNA e a diluição seriada foi feita da mesma maneira. Nas canaletas contendo nanopartículas + DNA + DOX foi usado o mesmo volume de solução da anterior e feita a diluição seriada, também da mesma forma. Na última canaleta adicionou-se apenas 750  $\mu$ L de meio de cultura.

Após isso, o meio de cultura antigo foi retirado da placa e foram pipetados 100  $\mu$ L das soluções em cada poço da respectiva coluna.

Após a aplicação, as placas foram incubadas em estufa por 48 horas.

### **3.2.6. Ensaio de MTT**

Decorridas as 48 horas, as placas foram retiradas da estufa e as soluções da DOX pura e das nanopartículas foram substituídas por solução de MTT. Procedeu-se ao ensaio de MTT, leitura no espectrofotômetro e análise estatística, conforme os itens 3.1.3 e 3.1.4 já descritos anteriormente.

Os valores de absorvância lidos para cada poço possibilitaram o cálculo da viabilidade celular, que são os valores de absorvância do tratamento divididos pelos valores do controle (meio RPMI completo) multiplicando tudo por 100. A viabilidade celular representa a porcentagem de células viáveis (células vivas) (KAMILOGLU et al., 2020). A partir desses valores, foi possível estimar a porcentagem de morte celular (citotoxicidade), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Citotoxicidade} = 100 - \left( \frac{\text{absorvância do tratamento}}{\text{absorvância do controle}} \times 100 \right)$$

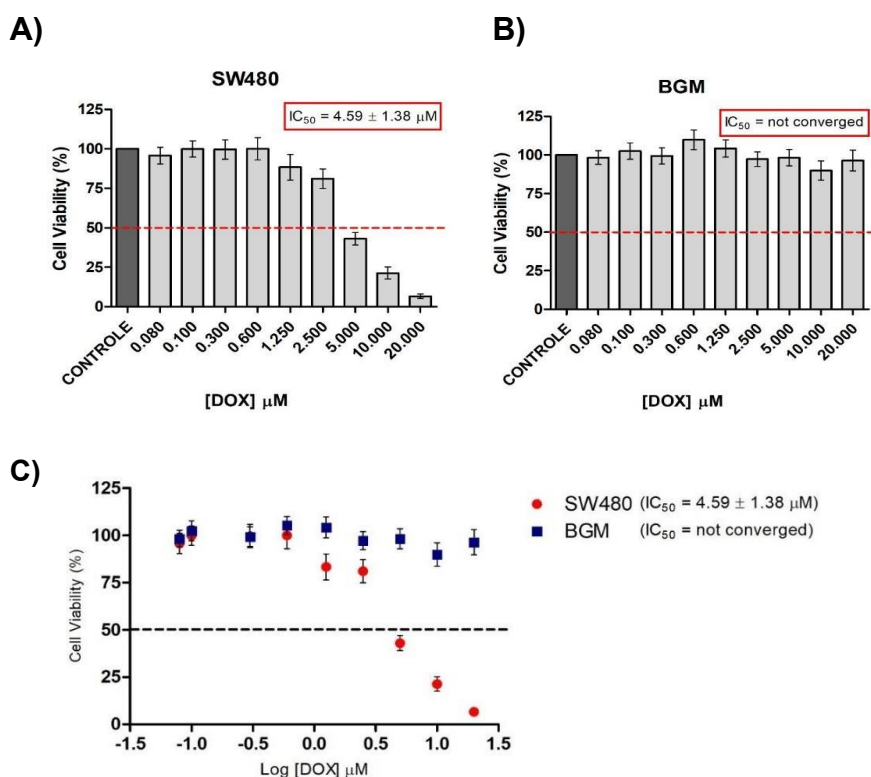
## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Citotoxicidade da DOX pura**

A linhagem de células normais (BGM) não foi sensível à DOX em nenhuma das concentrações testadas, não sendo possível dessa forma calcular o valor do IC50 e o índice de seletividade. Isso indica que essa linhagem dispõe de algum mecanismo de resistência à droga. Este resultado é interessante, uma vez que se trata de uma resistência observada em um tipo celular não tumoral, o que sugere uma possível seletividade da DOX em relação ao tecido renal.

Já a linhagem de células tumorais (SW480), foi sensível à DOX apenas nas concentrações de 5 µM, 10 µM e 20 µM. Ao calcular a regressão não linear do log das concentrações de DOX versus a viabilidade celular, foi possível calcular um valor de IC50= 4,59 ± 1,38 µM (Figura 3).

**Figura 3** - Viabilidade das linhagens SW480 e BGM em função da concentração de doxorubicina, após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes (Figuras 2A e 2B). Figura 2C é apresentada como regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas). Fonte: a autora

#### 4.2. Interação da proteína capsial AV1 com DNA e DOX

Nos experimentos de EMSA, observamos que as moléculas do dsDNA incubado com tampão (controle negativo) foram capazes de se deslocar com facilidade na malha de gel de agarose, ao passo que amostras incubadas com a proteína capsial ficaram retidas no topo do gel de agarose. Esse comportamento indica a formação de complexos DNA-proteína. Assim, foi possível comprovar que a proteína capsial do vírus SiYSV, obtida por expressão heteróloga, possui a capacidade de interagir com moléculas de dsDNA (Figura 4).

**Figura 4** - Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética.

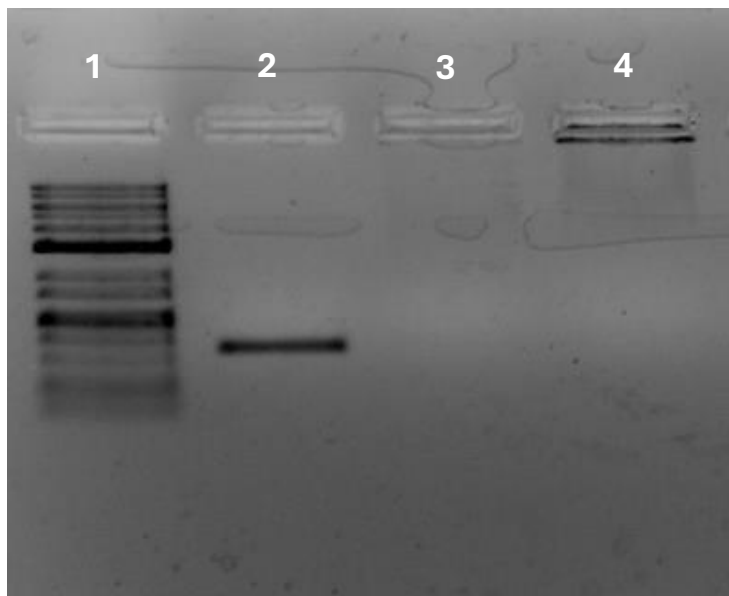


Imagem representativa do Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética em gel de agarose 1%. Canaleta 1 - marcador de pares de bases 1Kb; Canaleta 2 - DNA incubados com PBS (controle negativo); Canaleta 3 – eluição [1280] de purificação da proteína SiYSV + DNA; Canaleta 4 - eluição [225] de purificação da proteína SiYSV + DNA. Fonte: a autora

Este resultado mostra que a proteína CP de SiYSV, apesar de ser altamente divergente (Xavier, 2015), não tendo sido observada a formação de partículas virais ao MET e nem a sua transmissão pelo inseto vetor (Lima, 2022), é capaz de interagir com moléculas de dupla fita de DNA, sugerindo a possibilidade de formação de nanopartículas.

Uma vez sugerida a capacidade de auto-montagem das nanopartículas procedeu-se a avaliação da citotoxicidade destas. Os experimentos com as linhagens BGM e SW480 mostraram que a nanopartícula vazia (DNA 600pb + proteína CP) não induziu morte celular quando comparado ao controle, na realidade, foi observada proliferação celular em todas as concentrações avaliadas (Figura 5). Isto mostra que os constituintes da nanopartícula não são tóxicos e permite inferir que podem ser utilizados como ferramentas nanobiotecnológicas na clínica médica.

**Figura 5** - Viabilidade das linhagens SW480 e BGM em função da concentração de nanopartículas vazias e carregadas com doxorubicina, após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média de 2 experimentos independentes (Figuras 1 A e 1B). Fonte: a autora

Ao mesmo tempo, pôde-se observar que a nanopartícula carregada diminuiu a viabilidade da linhagem BGM, ao contrário da linhagem SW480, que não apresentou diferença nas taxas de morte celular quando comparadas aos tratamentos com as concentrações correspondentes de doxorubicina pura. Esse resultado pode estar relacionado à uma superestimação da concentração de DOX na nanopartícula carregada. Segundo Gonçalves (2023), aproximadamente 70% da doxorubicina usada para preparar a amostra pode não ser incorporada no processo de automontagem da nanopartícula proteica. Outro fator que pode estar diretamente relacionado a esses resultados é o tamanho da nanopartícula, que depende diretamente do comprimento de

controno do DNA utilizado. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi observado que nanopartículas proteicas montadas com DNA de 3000bp, provocam taxas de morte celular mais elevadas do que o tratamento com partículas montadas com DNA de 600bp. (GONÇALVES, 2023)

As diferenças observadas entre o primeiro e o segundo grupo de experimentos, com relação à resposta à doxorubicina pura obtidas pela linhagem BGM, podem estar relacionados à diferenças na idade da cultura celular e seu estado fisiológico. Já para a linhagem SW480, não houve variações tão grandes na sensibilidade à DOX.

## **5. CONCLUSÃO**

Neste trabalho demonstramos que a proteína CP de SiYSV, um begomovírus divergente, é capaz de formar estruturas automontáveis quando na presença de dsDNA. Além disso, mostramos que nanopartículas carregadas com DOX promovem a morte celular das linhagens estudadas, enquanto a nanopartícula pura (sem fármaco) induz a proliferação das mesmas. Vale a pena ressaltar que as diferenças nas taxas de citotoxicidade da DOX pura e da nanopartícula contendo DOX se mostraram muito similares, apesar de possíveis perdas do fármaco na montagem das nanopartículas. Assim, faz-se necessário avaliações complementares a fim de descrever a concentração final correta presente nas nanopartículas montadas e, dessa forma, obter resultados mais robustos.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ANDRADE, K. et al. Câncer Colorretal: Prevenção, Diagnóstico e Tratamento. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 8, p. 4143–4152, 24 ago. 2024.
2. BRIDDON, R. W. et al. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology*, v. 10, n. 1, 8 abr. 2010.
3. FIALLO-OLIVÉ, E. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021. *Journal of General Virology*, v. 102, n. 12, 17 dez. 2021.
4. GONÇALVES A. P. et al. Virus-Like Particle-Encapsulated Doxorubicin Enters and

- Kills Murine Tumor Cells Differently from Free Doxorubicin. *Macromol Biosci.* 2023 Jun;23(6): e2200530. doi: 10.1002/mabi.202200530. Epub 2023 Apr 14. PMID: 37017140.
5. GONÇALVES, A. P. Production, characterization and evaluation of the chemotherapeutic and immunogenic potential of protein based virus-like particles in tumoral and immune cell lines, Dep. de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 67, 2023.
  6. HARRISON, B.D. et al. Begomovirus coat protein: serology, variation and functions. *Physiol Mol Plant Pathol* 60, 257-271, 2002.
  7. HELLMAN L.M. et al. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc.* 2(8):1849-61. doi: 10.1038/nprot.2007.249. PMID: 17703195; PMCID: PMC2757439, 2007.
  8. KCIUK, M. et al. Doxorubicin—An agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells*, v. 12, n. 4, p. 659–659, 19 fev. 2023.
  9. Lima, R. R. P. N. Study of Sida yellow spot virus, a begomovirus with a divergent coat protein, Dep. de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 90, 2022.
  10. PEREIRA, C. M. et al. Câncer colorretal e o aumento da incidência em pacientes jovens. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 6, n. 9, p. 1457–1466, 12 set. 2024.
  11. PIÑERÚA-GONSÁLVEZ, J. F. et al. Early-onset colorectal cancer: an eleven-year analysis of clinicopathological characteristics at a tertiary healthcare center. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 60, n. 3, p. 315–321, set. 2023.
  12. TIAN, Y. et al. Tobacco Mosaic Virus-Based 1D Nanorod-Drug Carrier via the Integrin-Mediated Endocytosis Pathway. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 8, n. 17, p. 10800–10807, 2016.
  13. WEINBERG, R. A. How Cancer Arises. *Scientific American*, v. 275, n. 3, p. 62–70, set. 1996.
  14. XAVIER, C.A.D. Species diversity and genetic variability of bipartite

begomoviruses in the New World, Dep. de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 106, 2015.

15. ZHOU, X. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annu Rev Phytopathol* 51, 357-381, 2013.