

**Universidade Federal do Ceará**  
**Unidade Multiusuário NPDM**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS CONTENDO CROTOXINA DE *Crotalus durissus*  
terrificus: AVALIAÇÃO ANTITUMORAL IN SILICO E IN VITRO**

**1. Informações do Projeto**

**Proponente:** ROBERTO NICOLETE

**CPF:** 28364306804

**Comitê de Ética:** Não foi submetido a nenhum comitê

**2. Descrição**

O câncer é um problema de saúde pública em nível global e uma, a cada seis mortes no mundo, o tem como causa. Dentre os diversos tipos dessa patologia destaca-se o câncer de pele do tipo melanoma. É de todos o mais letal em seu estado metastático com características de adquirir resistência a diversas terapias. A busca por alternativas de tratamentos eficazes e alvo-direcionados é a promessa de solução para o mecanismo de resistência a esse tipo. Estudos realizados com a crotóxina extraída do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, já confirmaram atividade citotóxica in vitro contra melanoma. Acredita-se que uma melhor alternativa será utilizá-la de forma alvo-direcionada somente para células tumorais através da nanotecnologia. Visando isso, o objetivo desse projeto é desenvolver, caracterizar e funcionalizar nanopartículas poliméricas como sistemas carreadores da fosfolipase A2 PLA2-CB, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, para avaliar a atividade antitumoral in vitro em linhagens de melanoma. Para tanto iniciaremos efetuando um monitoramento prospectivo técnico-científico-comercial nos bancos de dados Web of Science, para prospecção científica; Derwent Innovation Index, para prospecção tecnológica (busca de patentes) e DrugBank ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)) para busca comercial. A fabricação das nanopartículas será executada utilizando da tecnologia microfluidica através da plataforma NanoAssemblr de bancada e a caracterização físico-química de tamanho, potencial zeta e concentração de partículas por mL, serão realizadas por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (ARN) no Nanosight ns-500. A morfologia será avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão. A PLA2-CB em solução e as nanopartículas serão avaliadas in silico para simulações de interações e dinâmica molecular. Efetuaremos adaptação/padronização do método de funcionalização das nanopartículas poliméricas. A atividade antitumoral in vitro será determinada por ensaios de citotoxicidade (MTT), citometria de fluxo, e microscopia confocal, para avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral. Para levar a efeito todo esse processo foi orquestrada a colaboração da Fiocruz (CE, RO e do RJ) onde a Fiocruz-RO possui autorização para extração das toxinas sob o código CNPq/CGEN protocol NO.010627/2011-1, da Universidade Federal do Ceará, através do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamento (NPDM), do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) e da Central Analítica da UFC.

**3. Justificativa de Uso**

**CITOMETRIA DE FLUXO**

Será utilizado o corante iodeto de propídeo (PI) para avaliar a integridade da membrana, a

densidade e a morfologia celular. Esse corante penetra nas células cuja membrana esteja rompida e se liga ao DNA, emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência. Serão obtidas informações sobre densidade, morfologia (espalhamento frontal e lateral da luz, o que corresponde ao tamanho e granulosidade relativa entre as células, respectivamente) e integridade de membrana celular, utilizando-se o filtro para o espectro vermelho.

O detergente Triton-X será utilizado juntamente com o PI para permeabilizar a membrana das células, permitindo a análise do conteúdo e fragmentação do DNA. Como já dito, células com o DNA íntegro emitem alta fluorescência. Núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos IP e, por isso, emitem menor fluorescência, sugestivo de apoptose. Além disso, o IP consegue intercalar proporcionalmente a quantidade de DNA da célula, podendo então mensurar as fases do ciclo celular através da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular.

#### **DETERMINAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA ? ANEXINA V**

A indução da externalização da fosfatidilserina (FS) caracteriza um dos primeiros estágios do processo de apoptose. Esse ensaio permite diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. Anexina-V é uma proteína com alta afinidade por PS e que, conjugada à ficoetrina (PE), emite fluorescência verde quando ligada, distinguindo, assim, as células em apoptose. O corante 7-AAD penetra as membranas celulares desintegradas e se liga ao núcleo, emitindo fluorescência vermelha. Isso será feito para a avaliação da externalização da FS em células tratadas para tanto será necessário a utilização do citometro da unidade multiusuário do npdm.

## **4. Participantes do Projeto**

### **Participante 1**

Nome: VANESSA PINHEIRO GONCALVES FERREIRA

Email: pinheiro.vanessaf@gmail.com

### **Participante 2**

Nome: José de Brito Viera Neto

Email: neto.vieira38@gmail.com

### **Participante 3**

Nome: Heverton Mendes

Email: hevertonn.mendes@gmail.com