

**Juliana Karasawa Vieira de Souza e Carmen Veríssima Ferreira**  
**Departamento de Bioquímica – IB**  
**Financiamento: PIBIC-CNPq e FAPESP**

## Introdução

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma forma de neoplasia hematológica que está francamente em ascensão no mundo, sendo tratável apenas com quimioterapia, portanto, a multirresistência constitui um obstáculo importante na terapêutica. Uma outra alternativa seria utilizar formas alternativas de tratamento, entre elas, a terapia gênica com siRNA, que tem como objetivo reduzir a expressão de um determinado gene. Para maior especificidade e redução de possíveis efeitos colaterais, ao invés de diretamente induzir a morte celular, pode-se quebrar a resistência aos agentes quimioterápicos com o silenciamento de responsáveis por esse fenótipo e, entre eles, está a LMWPTP. Entretanto, o siRNA por si só não adentra a célula, necessitando de um carreador, como o nanotubo de carbono, que, por ser inerte, tem grande potencial como carreador, o que se explora neste trabalho.

## Objetivos

Avaliar os efeitos dos nanotubos sobre a viabilidade de células leucêmicas e sua aplicabilidade como carreador de siRNA em comparação com kit de transfecção comercial.

## Materiais e Métodos

### Cultura de células

Células leucêmicas (K562/Lucena) será realizado em meio RPMI contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células serão semeadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL e cultivadas em atmosfera umidificada, 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

### Determinação de efeito agudo dos nanotubos

As células ( $2 \cdot 10^5$  células/mL) foram incubadas com 100 µL de solução-estoque dos diferentes nanotubos, que variam quanto à fonte de carbono, superfície e atmosfera de crescimento, e funcionalização, a 10 µg/mL e foi realizada contagem de células viáveis em câmara de Neubauer com presença de Azul de Tripán.

### Comparação de transfecção de iRNA ERK1 entre nanotubos e kit comercial.

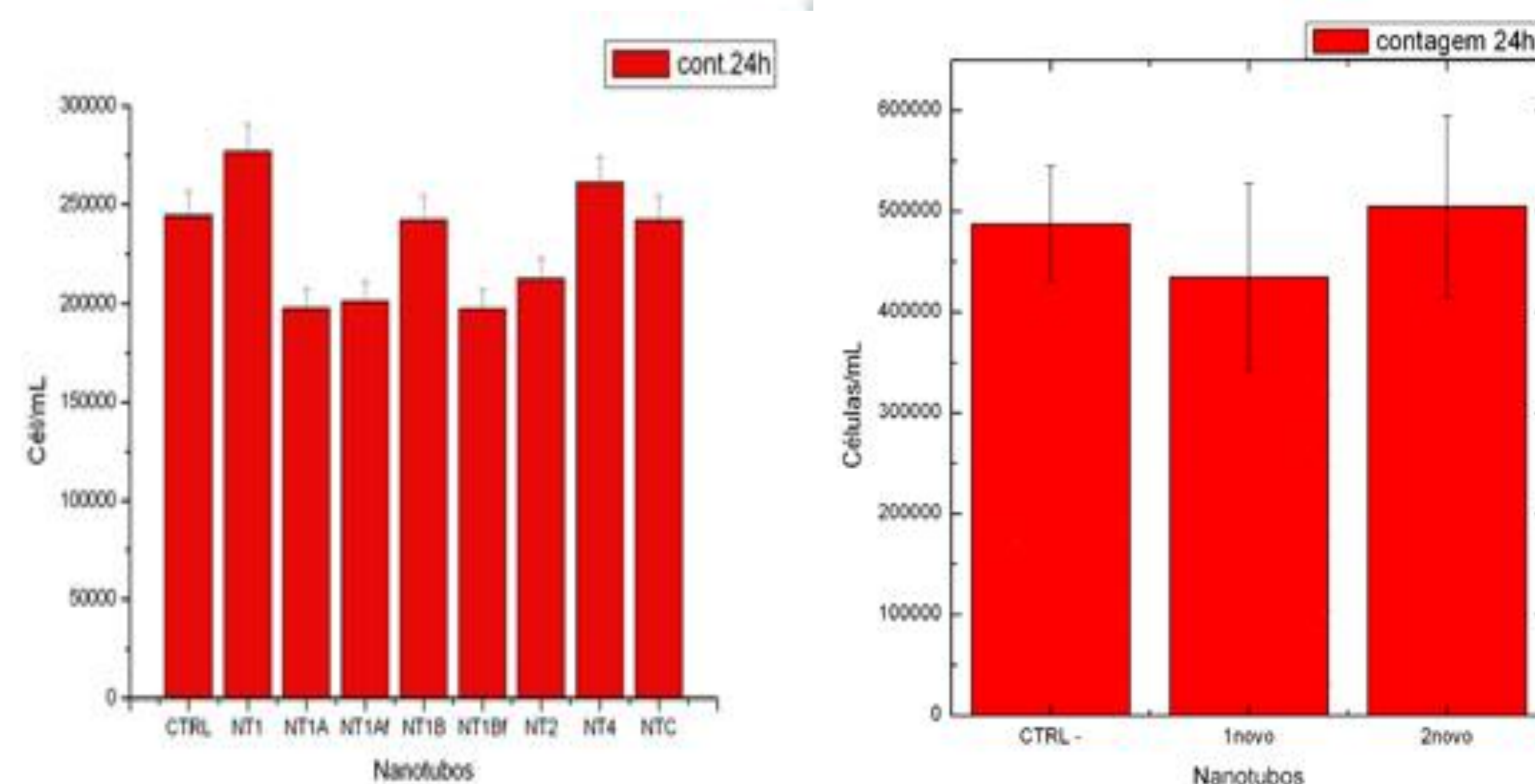
750 ng do siRNA para a ERK foram misturados com 0,010 mg/mL do nanotubo e incubados por 10 minutos. No dia da transfecção as células foram plaqueadas na densidade de  $2 \times 10^5$  células/100 µL em placas de 24 poços. A seguir foi adicionado o complexo de transfecção: nanotubos e o iRNAERK (preparado como mencionado anteriormente) e o complexo de transfecção comercial/kit da Qiagen (750ng de iRNA ERK1, 94 µL de meio de cultura sem soro e 6 µL de HiPerFect Transfection Reagent) foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas e após 6 horas foram adicionados 400 µL de meio de cultura a cada poço. Após 24, 48 e 72 horas a eficiência do silenciamento foi checada através da contagem das células viáveis.

### Avaliação da interação entre iRNA e nanotubos

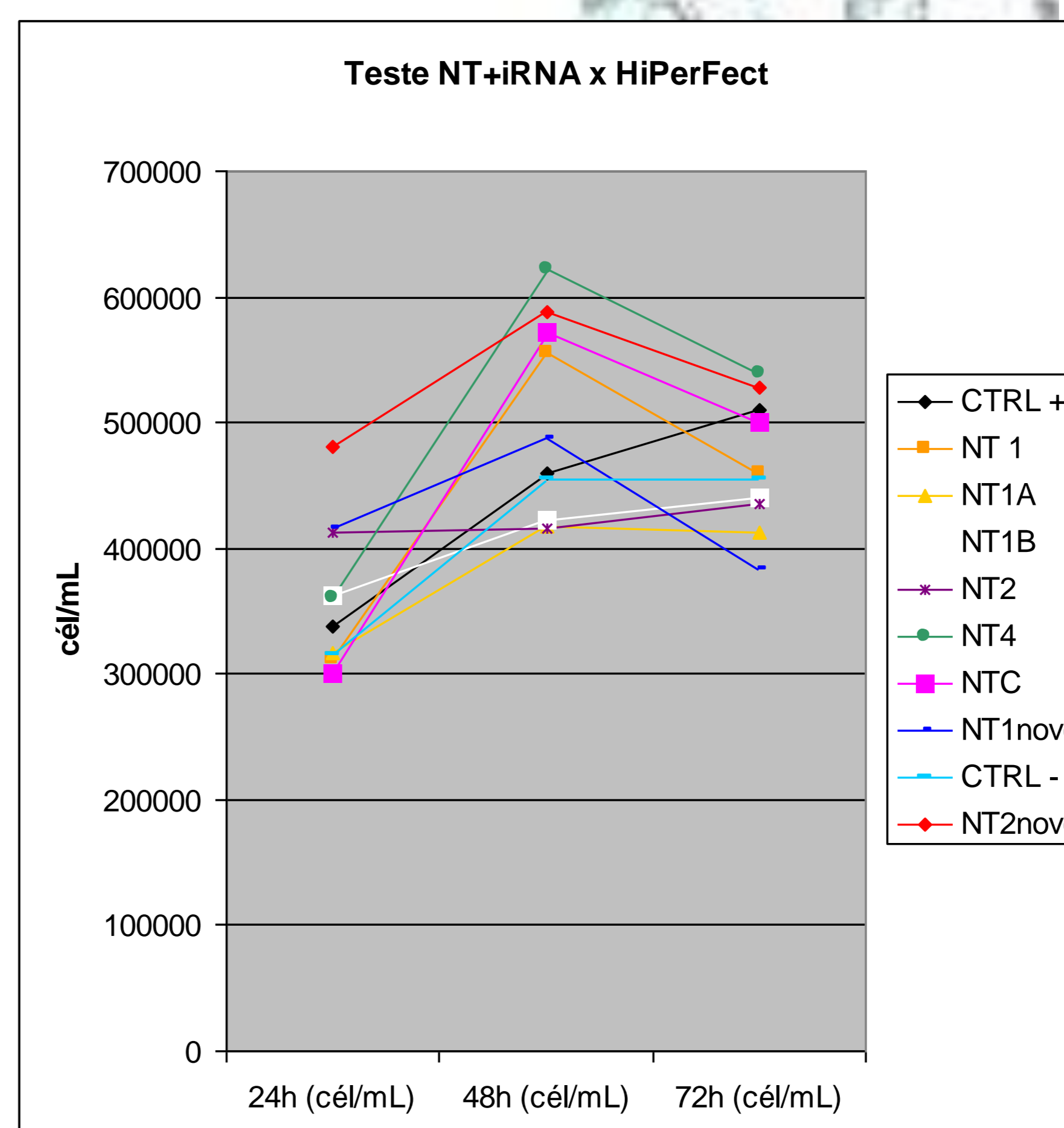
750 ng do siRNA para a ERK foram misturados com 0,010 mg/mL do nanotubo e incubados por 10 minutos. Esse complexo foi submetido a eletroforese em gel de agarose (2%) com presença de marcador de peso molecular de 1kb e brometo de etídio.

## Leucemia Mieloide Crônica – siRNA – Nanotubos de Carbono

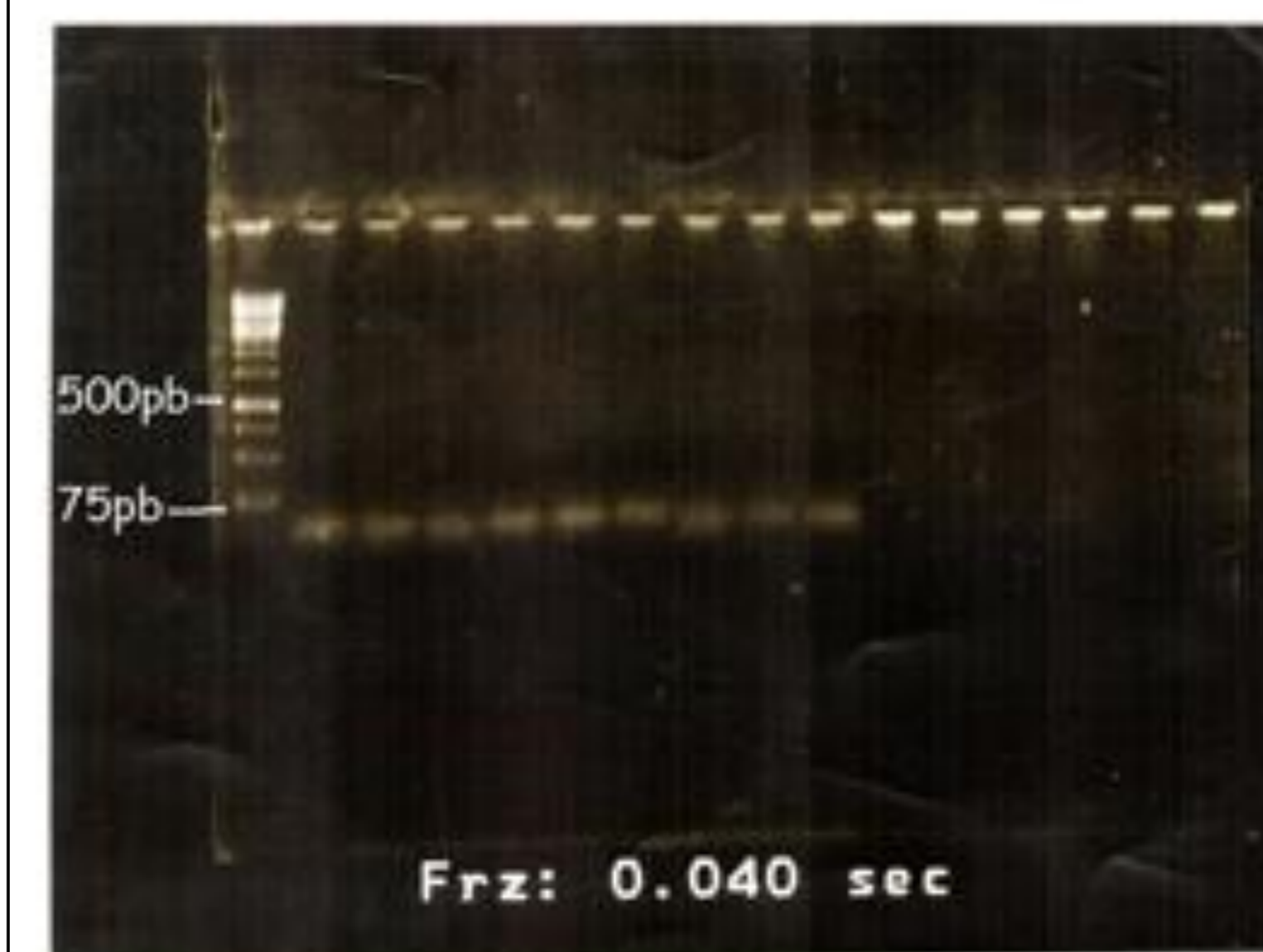
## Resultados e discussão



**Figura 1-a e 1-b.** Efeito dos nanotubos na viabilidade celular de células K562-Lucena. As células foram tratadas com nanotubos a 10 µg/mL durante 24h. Após este período, foi feita contagem com azul de Tripán.



**Figura 2.** Avaliação da eficiência de transfecção das células K562-Lucena com o iRNA da ERK. As células incubadas com as diferentes formulações por até 72h. Após os períodos indicados no gráfico as células viáveis foram contadas na presença do azul de Tripán.



**Figura 3.** Avaliação da interação do iRNA com os nanotubos. As amostras (nanotubos sozinhos e em combinação com o iRNA) foram aplicadas em gel de agarose 2%. No primeiro poço foi aplicado marcador de peso molecular 1kb (Fermentas).

## Conclusão

Os nanotubos não apresentaram efeito citotóxico sobre as células Lucena; a interação dos nanotubos utilizados com o iRNA ERK foi fraca; aparentemente, as formulações designadas como NT1A, NT1novo e NT2 apresentaram maior eficiência de carreamento do iRNA, quando o número de células foi analisado em função do tempo. Os dados apresentados indicam o potencial dos nanotubos como carreadores de iRNA. No entanto, será importante otimizar as formulações para uma melhor eficiência de transfecção.

## Colaboração

Helder José Ceragioli – Laboratório de Nanoengenharia e Diamante – Depto. De Semicondutores – FEEC  
 Prof. Dr. Vitor Baranauskas – Laboratório de Nanoengenharia e Diamante – Depto. De Semicondutores - FEEC