



PIBIC-EM

## Efeitos duais do ozônio na viabilidade, produção de espécies reativas e integridade da membrana celular em micróglias

### OZÔNIO

Autores: Yasmin Oliveira Guedes, Pedro Henrique Zatti, Nicole Peyrot, Cátia dos Santos Branco



### INTRODUÇÃO / OBJETIVO

O gás ozônio ( $O_3$ ), descoberto em 1840, é utilizado desde a Primeira Guerra Mundial como adjuvante em tratamento de diversas condições. Sua molécula, composta por três átomos de oxigênio, é bastante instável, resultando na sua característica marcante: um forte oxidante. O mecanismo pelo qual o  $O_3$  exerce seus efeitos é baseado em sua capacidade oxidadora e produção de metabólitos secundários.

Uma busca prévia, realizada na base de dados MEDLINE/PUBMED, mostrou não haver uma padronização na forma de exposição líquida ao ozônio em cultura celular.

Sendo assim, o presente trabalho visou testar os efeitos do  $O_3$  quando borbulhado diretamente no meio de cultura em tubos de ensaio (sistema aberto) sobre a reposta celular de micróglias.

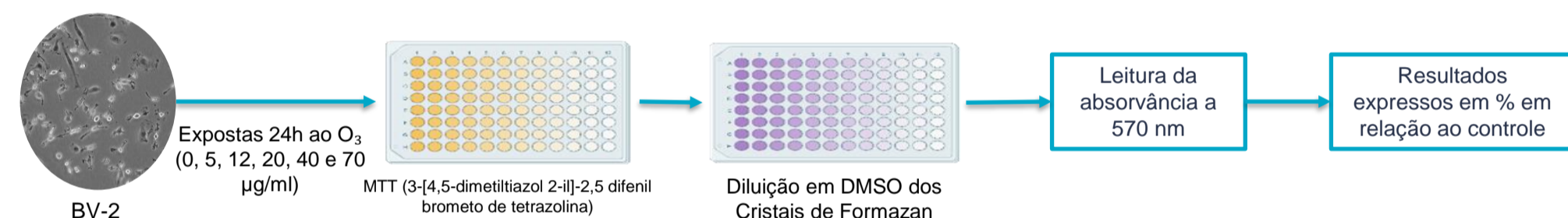
### MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada a linhagem celular (BV-2). As células foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio específico de crescimento (RPMI), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomomicina e mantidas a 37  $^{\circ}\text{C}$  em atmosfera umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

Concentrações crescentes de 0, 5, 12, 20, 40 e 70  $\mu\text{g/mL}$  de  $O_3$  foram utilizadas. Para a ozonização em sistema aberto, 2 mL de meio de cultura foram adicionados a um tubo de ensaio previamente autoclavado. Em seguida, o ozônio foi borbulhado por 60 segundos em cada tubo, por meio de uma mangueira acoplada na saída do gerador de  $O_3$ . Por fim, o tubo foi agitado por 5 minutos, até solubilização total do ozônio no meio de cultura.

Para o controle, utilizou-se apenas oxigênio, de grau medicinal, em ambas as formas de ozonização.

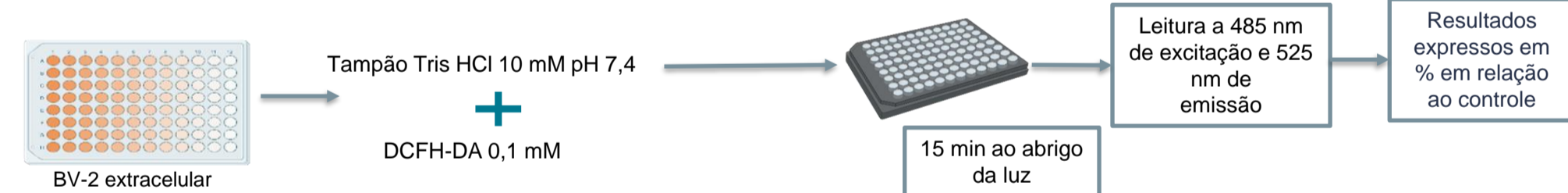
#### Determinação da Viabilidade Celular - ensaio de MTT (Denizot; Lang, 1986)



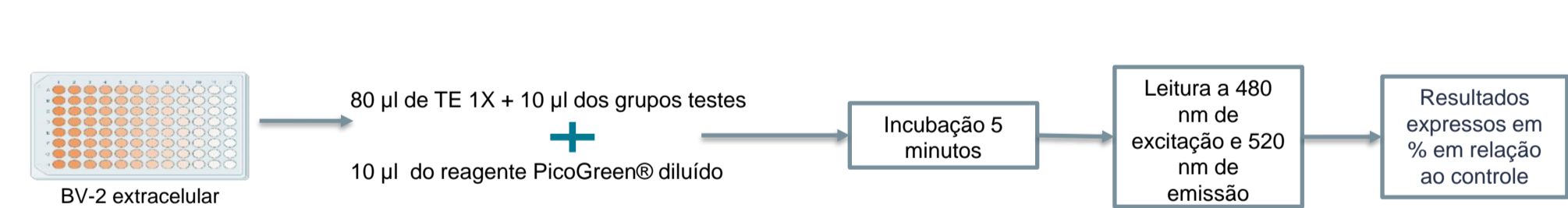
#### Avaliação do estresse nitrosativo – níveis de Óxido nítrico (ON) (Green et al., 1981)



#### Quantificação de espécies reativas de oxigênio – DCFH-DA (Degli Esposti, 2002)



#### Quantificação de ds-DNA livre extracelular - PicoGreen® (Ahan, Costa e Emanuel, 1996)



#### Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software SPSS 22.0 Windows (SPSS ins., Chicago, IL). Comparações foram verificadas pela análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey. Resultados significativos se  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS

A Figura 1 apresenta os resultados dos ensaios de MTT, produção de ERO e ON e o ensaio de PicoGreen®.

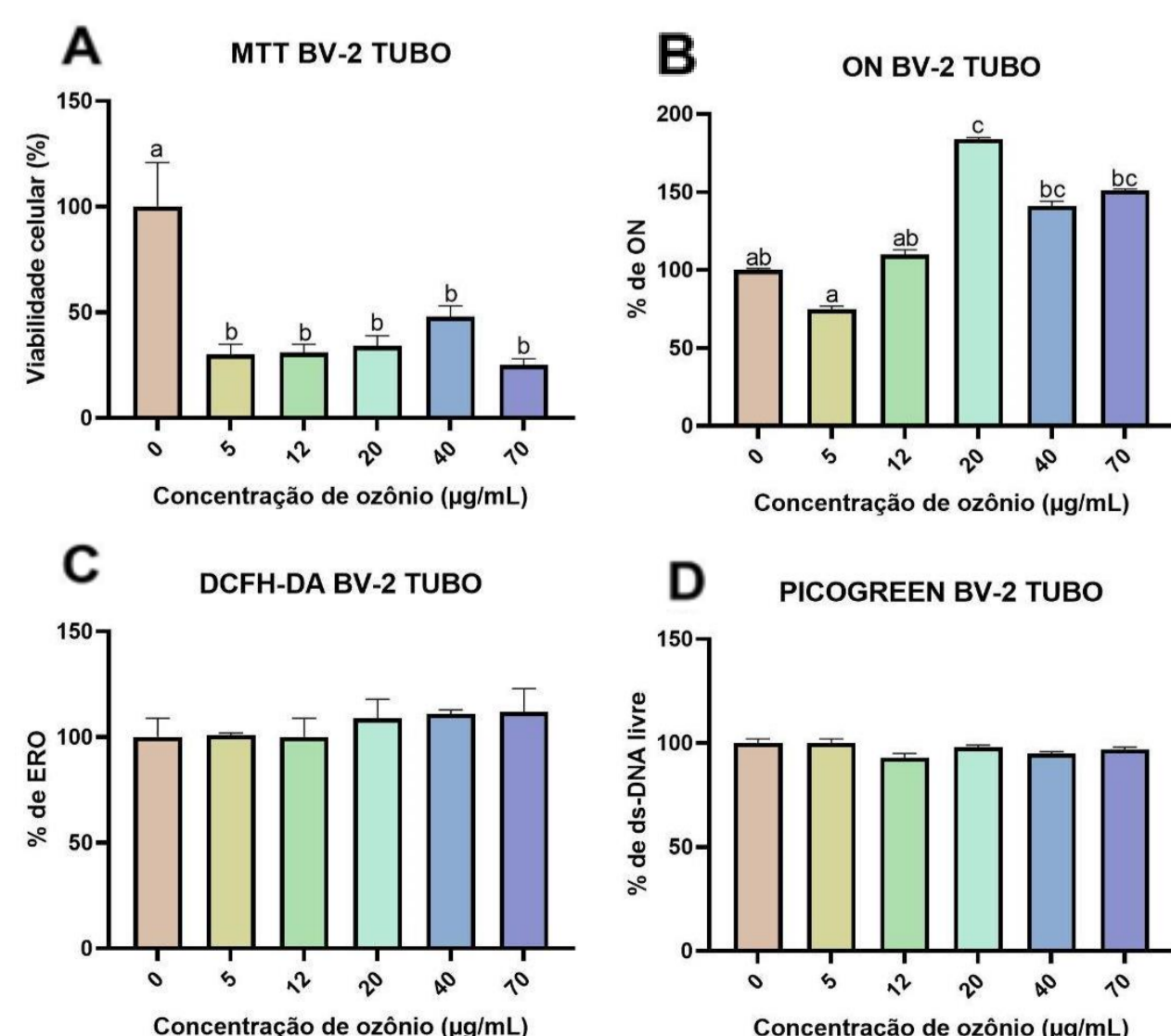


Figura 1: Efeito do ozônio sobre a viabilidade celular (A), produção de óxido nítrico (B), níveis de espécies reativas de oxigênio (C) e quantificação de ds-DNA livre (D) na linhagem BV-2 tratada com diferentes concentrações de ozônio (0, 5, 12, 20, 40 e 70  $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle. Diferentes letras indicam diferença estatística entre os grupos de acordo com análise de variância (ANOVA) e post hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Observa-se uma queda drástica da viabilidade celular em relação ao controle em todas as concentrações testadas (Figura 1A). A maior viabilidade foi vista em 40  $\mu\text{g/mL}$  ( $48 \pm 5\%$ ) e a menor em 70  $\mu\text{g/mL}$  ( $25 \pm 3\%$ ).

Em relação a quantificação da produção de ERO, não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle (Figura 1B).

No parâmetro de estresse nitrosativo, um aumento expressivo foi visto na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao controle ( $184 \pm 1\%$ ) (Figura 1C), além de uma redução na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $75 \pm 2\%$ ). A concentração de 12  $\mu\text{g/mL}$  gerou efeitos similares a de 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $110 \pm 3\%$ ) e as concentrações de 40 e 70  $\mu\text{g/mL}$  ficaram próximas aos valores encontrados à concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  ( $141 \pm 3\%$ ;  $151 \pm 1\%$ ).

Por fim, não foram encontradas diferenças significativas na quantificação de ds-DNA livre no meio extracelular em todas as concentrações e em ambas as técnicas (Figura 1D).

### DISCUSSÃO

O ozônio vem sendo utilizado, empiricamente, no auxílio de tratamentos de doenças há mais de um século. Nos últimos anos, publicações acerca do assunto vem crescendo, da mesma forma que contribuições sobre o seu mecanismo de ação (ZENG; LU, 2018). Evidências sugerem que seu efeito está associado a um estresse oxidativo transitório, acarretando estímulo do sistema antioxidante intracelular (TIRELLI et al., 2019).

Estudos anteriores que utilizaram o ozônio como tratamento, relataram um efeito antitumoral, inibindo a proliferação celular dependentemente da concentração, além de induzir alterações no potencial de membrana celular (LI et al., 2021; TANG et al., 2021) após exposição direta das células ao gás.

Os autores que dissolveram o ozônio em algum líquido utilizaram o meio de cultura, água ozonizada ou PBS ozonizado. BORGES et al. (2017) expôs fibroblastos e queratinócitos a PBS ozonizado, encontrando aumento da viabilidade celular à 8  $\mu\text{g/mL}$  de  $O_3$ .

KUCUKGUL et al. (2021), utilizou o ozônio dissolvido no meio celular como um pré-tratamento e encontraram redução de danos causado por agentes oxidantes, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Em contrapartida, SANTOS et al. (2021) expôs fibroblastos diretamente à água ozonizada por 1 minuto, não encontrando diferenças na viabilidade celular.

Levando essas informações em consideração, nota-se uma deficiência de informações e padronizações sobre a forma de ozonização em cultivo celular.

No presente estudo, em que foi empregada a técnica de ozonização em sistema aberto (tubos), os efeitos citotóxicos podem ser explicados, ao menos em parte, pela alteração no pH do meio de cultivo, uma vez que, ao final dos 60 segundos, notou-se uma mudança extrema da coloração do meio basal (dados não mostrados).

O meio RPMI contém vermelho de fenol, como indicativo de mudança do pH, além de um sistema tampão com bicarbonato de sódio, para a manutenção desse parâmetro. Sendo assim, esse método mostrou-se bastante agressivo às células. Outra limitação observada foi a dificuldade de padronização da quantidade de ozônio introduzida, resultando em uma perda de conteúdo líquido quando introduzido o gás.

Vale ressaltar que esses dados são preliminares e novas formas de ozonização estão sendo testadas para complementação dos dados do projeto.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que foi possível colocar em prática técnicas que avaliam a viabilidade celular, estado redox celular e danos à membrana nuclear em células expostas ao ozônio cultivadas em modelo 2D.

Comparando os dados encontrados, notou-se o efeito dual do ozônio, sendo esse capaz de reduzir a viabilidade e aumentar a biodisponibilidade de ON ao mesmo tempo.

Sendo assim, conclui-se a forma de exposição e a concentração de ozônio se mostram fatores determinantes para a resposta celular.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. *Science*, [s. l.], v. 212, n. 4490, p. 56–58, 1981.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175986903686>.
- DEGLI ESPOSTI, M. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods*, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 335–340, 2002.
- BORGES, G. Á. et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 364–370, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010518217300057>.
- TIRELLI, U. et al. Ozone therapy in 65 patients with fibromyalgia: an effective therapy. *European review for medical and pharmacological sciences*, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 1786–1788, 2019.
- TANG, S. et al. Ozone induces BEL7402 cell apoptosis by increasing reactive oxygen species production and activating JNK. *Annals of Translational Medicine*, [s. l.], v. 9, n. 15, p. 1257–1257, 2021. Disponível em: <https://atm.amegroups.com/article/view/75728/html>.
- SANTOS, L. M. C. dos et al. Ozonized Water in Microbial Control: Analysis of the Stability, In Vitro Biocidal Potential, and Cytotoxicity. *Biology*, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 525, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/6/525>.
- ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *International Immunopharmacology*, [s. l.], v. 56, p. 235–241, 2018.

APOIO

