

AValiação DA APOPTOSE EM CULTURA DE CÉLULA APÓS TFD UTILIZANDO CLOROALUMÍNIO FTALOCIANINA LIPOSSOMAL.

Maftoum Costa, M. ¹, Sousa, G. ¹, Machado, A.H.A. ¹, Simioni, A.R. ², Tedesco, A. C. ²,
Lopes, A. P.M.M ¹, Silva, N.S. ¹, Pacheco Soares, C ¹.

¹ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual: Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP. Av. Shishima Hifumi, 2911. cep: 12.211-300. São José dos Campos – SP – Brasil.

² Departamento de Química, FFCLRP – USP, Ribeirão Preto – SP - Brasil
E-mail: cpsoares@univap.br

Palavras-chave: Apoptose, TFD, Caspases, ATP

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Resumo - A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento de tumores malignos que tem como base a combinação de um composto fotossensibilizante e luz com um comprimento de onda apropriado (Dougherty, *et al.* 1998; Oleinick & Evans, 1998). A descoberta de que a TFD pode levar a uma resposta apoptótica em células malignas forneceu justificativa para a extensa eficácia observada. Esse trabalho tem por finalidade avaliar o processo de morte celular por apoptose após TFD em células de carcinoma humano. Cultura de células Hep-2 foram incubadas por 1 hora com o fotossensibilizante Cloroalúminio Ftalocianina lipossomal 5µM, retirado o fotossensibilizante as células foram submetidas a irradiação com laser diodo Thera Lase $\lambda=670\text{nm}$, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$, $45\text{ mW}/\text{cm}^2$. Posterior a irradiação, as células foram incubadas por 30 minutos, 1, 4, 12, 24 horas para a marcação de fluorescência e 24 e 48 horas para a avaliação da viabilidade celular. Após a incubação foi realizado o ensaio de MTT, e marcações de caspase-6 e caspase-3 com as sondas fluorescentes DEVD-amc e VEID-amc. Os níveis de ATP foram medidos com ensaio da Luciferin-Luciferase. Os resultados do ensaio de MTT demonstraram uma diminuição da viabilidade celular após a TFD utilizando ClAlPc lipossomal apresentando uma DL de 70% mesmo em baixa concentração. A marcação das caspases revelou a presença destas apenas em células que sofreram TFD, foram observadas logo após 4 horas de tratamento, ocorrendo um declínio com o passar do tempo. Foi detectada a presença de ATP 24 horas pós TFD ao redor do núcleo além da presença de células sem marcação indicando uma apoptose tardia.

Introdução

A terapia fotodinâmica é uma modalidade de tratamento de tumores malignos que tem como base a combinação de um composto fotossensibilizante e luz com um comprimento de onda apropriado (1,2). A descoberta de que a TFD pode levar a uma resposta apoptótica em células malignas forneceu justificativa para a extensa eficácia observada.

A apoptose é um suicídio celular em resposta a estímulos físicos, drogas, toxinas e agressões físicas (3,4), além de ser coordenada por proteínas codificadas pelo genoma do hospedeiro (5,6). O mecanismo de ativação da apoptose é específico e envolve a família de proteases denominadas caspases (7), que estão presentes no citosol sob a forma de pró-caspases inativas (8). A ativação das caspases depende da liberação do citocromo-c pela mitocôndria, essa substância liga-se a duas

proteínas do citosol que na presença de ATP ativa a caspase-9 que por sua vez ativa as caspases executoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7) responsáveis pela apoptose (9). Sendo assim a apoptose é um processo ativo dependente de energia, pelo menos nas fases iniciais, já que o ATP tem se mostrado crítico para alguns eventos apoptóticos incluindo a ativação da pró-caspase-3 e 6 (10,11).

Materiais e métodos

Cultura de células Hep-2 (carcinoma de laringe humana) foram incubadas por 1 hora com o fotossensibilizante Cloroalúminio Ftalocianina lipossomal (5µM).

Após a incubação as células foram lavadas 2x com PBS e submetidas a irradiação com laser diodo Thera Lase $\lambda =670\text{nm}$, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$, $45\text{ mW}/\text{cm}^2$.

Ensaio de viabilidade celular após PDT – Após a irradiação as culturas foram reincubadas por um período de 24 e 48 horas. Posterior a incubação foi adicionado à cada poço 1mg/mL de MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma], suavemente agitado e incubado por 1h a 37° no escuro. Após o período de incubação retirou-se a solução de MTT não transformado e adicionou-se DMSO, tendo sido a placa agitada vigorosamente de 10-20 minutos. Foi então feita a medida da densidade óptica em leitor de ELISA (D.O =570 nm).

Caspases - Após incubação das células pós irradiação, lavar as mesmas com PBS para a remoção do meio de cultura com soro. Preparar solução de PBS/Albumina com 0,5% de Tween 20 (não agitar muito, pois pode formar espuma, misturar suavemente), e incubar com as células por 15 minutos, a temperatura ambiente. Remover a solução, lavar com PBS 1x e incubar com a solução de DEVD-amc e VEID-amc (previamente preparada da seguinte forma - 8µL das caspases, 40 µL de HEPES, 10 µL de NaCl, 10 µL de DTT e 132 µL de PBS) incubar por 120 minutos a 37° C. ao término deste tempo lavar com PBS fixar as células em PA 4% em PBS por 20 minutos, lavar com PBS para remoção do fixador. As laminae foram montadas utilizando-se n-propil-galato e vedadas com esmalte incolor. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

Os níveis de ATP foram medidos com ensaio da Luciferin-Luciferase (10µL/mL). Os efeitos da LD₉₀ das doses de TFD nos níveis de ATP foram determinados 60 minutos após a irradiação.

Resultados e discussão

Observa-se uma sensível redução da viabilidade celular após TFD.

Os índices de viabilidade variaram entre 30 e 26% após 24 e 48 horas respectivamente (Gráfico1), entretanto mantendo uma dose letal (DL) de 70%, resultado esperado por esse tipo de tratamento como descrito por Kessel e Luo 1999.

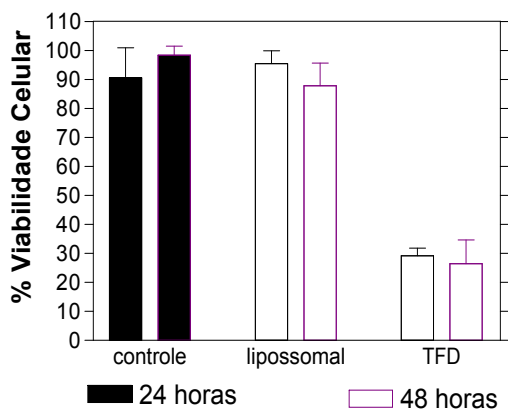


Gráfico 1: Viabilidade celular após TFD utilizando CIAIPc lipossomal nos tempos de 24 e 48hs.

Experimentos anteriores utilizando a Zinco Ftalocianina (ZnPc) e a Ftalocianina Cloroalumíneo Tetrasulfonada (AIPcS₄) demonstraram que a CIAIPc lipossomal apresenta um baixo poder de fotossensibilização, porém quando encapsulada em lipossomos a uma baixa concentração tem esse potencial otimizado, frente a outras ftalocianinas.

Na avaliação da presença de ATP durante o processo de apoptose pós TFD as células apresentaram marcações ao redor do núcleo após 24h, com ausência de marcação em algumas células, um indicativo de apoptose tardia.

A análise das células tratadas com marcadores para caspases 3 e 6, revelou a presença destas proteínas somente em células que sofreram TFD. Estas proteínas indicadoras de apoptose foram detectadas logo após 4 horas de tratamento, ocorrendo um declínio com o passar do tempo.

A CIAIPc lipossomal se mostrou agressiva ocasionando danos estruturais consideráveis nas células após 4 horas mesmo com a administração de uma baixa concentração (5µM).

Referencias bibliográficas

- [1] Dougherty, T. J.; Gomer, C. I.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; And Peng, Q. 1998. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 889-905.
- [2] OLEINICK, N.L. & EVANS, H.H. 1998. Apoptosis in response to photodynamic therapy. *Photod. News* , **1**: 6-9.
- [3] Dyson, J.E.; Simmons, D.M.; Daniel, J; McLaughlin, J.M.; Quirke, P. and Bird, C.C.. 1986. *Cell tissue kinetics* **19**, 311-324.
- [4] Allen, J./ Winterford, C.; Axelsen, R.A. and Gobe, G.C. 1992. *Renal Failure* **14**, 453-460.
- [5] Vaux, D.L., Strasser, A. 1996. The molecular biology of apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **93**, 2239-2244.
- [6] Samali, A., Gorman, A.M., Cotter, T.G. 1996. Apoptosis -- the story so far.. *Experientia* , **52** (10-11):933-41.
- [7] Duelli, D.M., Lazebnik, Y.A. 2000. Primary cells suppress oncogene-dependent apoptosis. *Nature Cell Biology* , **2**, 859-862.
- [8] Thompson C.B. Apoptosis. In: Parolin, M.B., Reason, I.J.M. 2001. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol* , **38**, 138-144.
- [9] Parolin, M.B., Reason, I.J.M. 2001. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol* , **38**, 138-144.
- [10] Eguchi, Y., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. In: Joshi, B, Taffe, B.G. *et al.* 1999. Apoptosis induction by a novel anti-prostate cancer compound, BMD188, requires the mitochondrial respiratory chain. *Cancer Research* , **59**, 4343-4355.
- [11] Kromer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rington, M. 1998 The mitochondrial death/life regulation of apoptosis and necrosis. *Annu. Ver. Physiol.*, **60**, 619-642.
- [12] Kessel, D.; Luo, Y. (1999). Photodynamic therapy : A mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**: 28-35.