

ANÁLISE DA MORFOLOGIA NUCLEAR DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) COM AIPcS₄

Bianca Ferreira Perrin Tamietti¹, Cristina Pacheco Soares²

^{1,2}Laboratório de Cultura de Células, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D, Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, 12444-000 - São José dos Campos – SP, bianca.perrin@gmail.com, cpssoares@univap.br

Resumo- Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento para o câncer que conta com a participação de um corante, laser e espécies reativas de oxigênio. Esta terapia envolve uma série de processos fotoquímicos e fotobiológicos os quais resultam em um dano irreversível no tecido tumoral. Objetivando avaliar a ação da TFD no núcleo de células tumorais após incubação com Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS₄), utilizou-se células Hep-2 as quais foram cultivadas em poços contendo lamínulas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Estas foram incubadas por uma hora com a ftalocianina AIPcS₄ (10µM) e em seguida irradiadas com Diodo Laser 685nm. As lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 4% e então marcadas com DAPI 300nM por 10 minutos. Em seguida montou-se as lamínulas sobre lâminas contendo n-propil galato. Os resultados foram obtidos através do microscópio de fluorescência Leica DMLB e demonstraram que a TFD com a AIPcS₄ acarreta em uma alteração da morfologia nuclear a qual indica morte celular por apoptose.

Palavras-chave: Apoptose, Cultura de células, Hep-2, Terapia Fotodinâmica

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica, minimamente invasiva, aprovada para o tratamento de doenças vasculares e neoplásicas. Esta consiste de três elementos: um fotossensibilizante que pode ser aplicado topicamente ou administrado sistematicamente; luz usualmente na faixa do visível (vermelha ou infravermelha), comumente gerada por laser, e oxigênio molecular, o qual na reação fotodinâmica gera oxigênio singleto (¹O₂) e espécies reativas de oxigênio. Após o período necessário para o acúmulo eficiente do fotossensibilizante no tumor, a luz de comprimento de onda apropriado é precisamente aplicada no tecido alvo. Uma vez que a luz utilizada na TFD é de baixa potência não ocorre aquecimento do tecido, assim o tecido conjuntivo não é danificado [1,2].

Há duas formas conhecidas de morte celular; necrose e apoptose. A necrose é caracterizada por processos não dependentes de ATP [3], já a apoptose é um processo altamente controlado de morte celular que envolve a ativação de enzimas hidrolíticas como as proteases e nucleases acarretando fragmentação do DNA e degradação de estruturas intracelulares, utilizando assim energia provinda do ATP. Esta tem sido mostrada como a forma predominante de morte após a terapia fotodinâmica utilizando diferentes fotossensibilizantes e linhagens celulares [1].

A descoberta de que a TFD pode levar a uma resposta apoptótica em células malignas forneceu

justificativa para a extensa eficácia observada, visto que geralmente estas células inibem o processo apoptótico, um efeito associado à capacidade de sobreviver à quimioterapia [4].

Geralmente as respostas apoptóticas necessitam de muitas horas e até mesmo dias para se completar [3], desta forma, Godar (1999) reconheceu três diferentes termos referentes à apoptose: imediata, intermediária e tardia [5]. Estas poderão variar de acordo com diversos fatores como o corante utilizado, o laser entre outros.

Neste trabalho objetivamos avaliar o tipo de morte celular através da observação da morfologia nuclear, visto que através de marcações fluorescentes podemos identificar a característica do núcleo, se aparenta ser apoptótico ou necrótico.

Material e Métodos

Cultura de células: Células Hep-2 (carcinoma de laringe humana), gentilmente cedidas pelo Dr. Celso Granato (Laboratórios Fleury- São Paulo) foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² (TPP) em meio RPMI (GIBCO-BRL-USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) em estufa de controle automático de temperatura (37°C) e CO₂ (5%).

Reagentes: Uma solução 1mM da Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS₄) foi preparada em PBS e filtrada em filtro Milipore 0,22µm de

diâmetro (MILLEX™) e estocada no escuro à 4°C. Uma segunda diluição foi realizada para incubação direta nas células à 10 µM. Preparou-se uma solução estoque 3mM do marcador fluorescente, para núcleo, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes) em DMSO (dimetilsulfoxido). Para incubação fez-se a diluição em PBS para uma solução 300nM.

Terapia fotodinâmica e Microscopia de Fluorescência: As células Hep-2 foram cultivadas à uma densidade de 5×10^5 céls/mL em placas de 24 poços (TPP) contendo lamínulas redondas estéreis e incubadas em meio de cultura *overnight* para aderirem adequadamente. As células foram então incubadas com o fotossensibilizante AIPcS₄ por uma hora a 37°C. Ao término deste tempo lavou-se as células com PBS. Em seguida estas foram irradiadas no escuro com o Diodo Laser (Thera Laser-DMC) 685 nM com uma densidade de potência de 35 mW e a uma dose de energia de 4,5 J/cm². Após a irradiação as células foram incubadas com meio de cultura e após 1, 24, 48 e 72 horas realizou-se a marcação para núcleo. As células submetidas à TFD, assim como os grupos controle, foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 10 minutos e em seguida lavadas com tampão PHEM. Adicionou-se a solução 300nM de DAPI por 10 minutos. As lamínulas foram então lavadas em tampão PHEM e montadas sobre lâminas contendo n-propil galato e vedadas com esmalte na periferia da lâmina. Estas foram analisadas em microscópio de fluorescência Leica DMLB utilizando o filtro de excitação em aproximadamente 358 nm e emissão 461 nm.

Resultados

Os resultados foram obtidos através de fotos das lâminas observadas em microscópio de fluorescência.

As células do grupo controle (Fig. 1) mostram o núcleo claramente marcado pelo corante fluorescente DAPI, nesta observa-se um núcleo onde a cromatina está iniciando o processo de condensação para divisão celular (asterisco). Os núcleos se apresentam em formas arredondadas uniformes.



Fig.1. Controle

O grupo irradiado com o laser (Fig.2) apresenta os núcleos normais semelhantes ao grupo controle. Observa-se na foto o processo final de

uma divisão celular (seta), reforçando assim o efeito bioestimulatório do laser. Já no grupo das células incubadas com a AIPcS₄ (Fig.3) percebe-se claramente uma diferença na coloração da marcação para um verde mais intenso visto que ocorre uma sobreposição da fluorescência do marcador com a fluorescência da ftalocianina. O citoplasma se mostra mais aparente devido à esta fluorescência do corante. Os núcleos têm o formato arredondado normal.



Fig.2. Laser

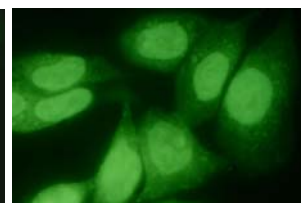


Fig.3. AIPcS₄

As células submetidas à terapia fotodinâmica foram analisadas após 1, 24, 48 e 72 horas para acompanhar o processo de morte celular. Após 1 hora (Fig.4) já se observa a perda do formato dos núcleos, deixando de ser arredondados e se apresentando mais alongados (estrela). 24 horas após a terapia (Fig.5) os núcleos das células parecem menores do que o normal com perda da uniformidade. Já nas células observadas 48 horas após a TFD (Fig.6) percebe-se claramente um afastamento anormal entre o núcleo e o citoplasma (seta) e alteração na morfologia dos núcleos (asterisco) assim como nas células analisadas após 72 horas de TFD.

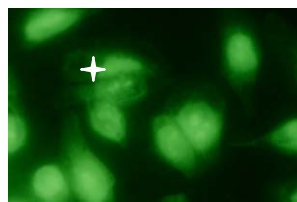


Fig.4. TFD 1hr

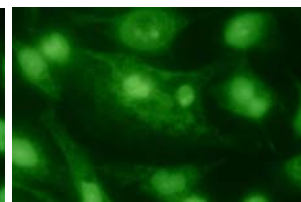


Fig.5. TFD 24 hrs

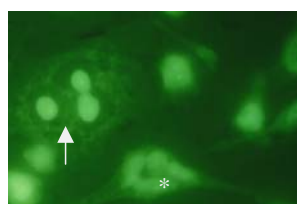


Fig.6. TFD 48 hrs



Fig.7. TFD 72 hrs

Discussão

O DAPI é um marcador amplamente utilizado para técnicas fluorescentes corando núcleos especificamente, com pouca ou nula marcação de citoplasma (Molecular Probes®). Desta forma as células dos grupos controle, laser, ftalocianina e terapia fotodinâmica mostraram intensa marcação do núcleo e pouca marcação citoplasmática.

Células que sofrem processo apoptótico apresentam mudanças morfológicas típicas incluindo deformação do núcleo, condensação da cromatina, fragmentação do DNA entre outras [6]. As mudanças na morfologia nuclear foram claramente observadas nos grupos tratados com a terapia fotodinâmica, apresentando um formato alongado anormal.

Células em apoptose perdem a aderência, tanto com outras células quanto com o substrato [6] tal fato se confirma nestes experimentos no qual se observa retração da membrana citoplasmática.

Três termos referentes à apoptose foram descritos; imediata, intermediária e tardia, junto, aos diferentes mecanismos cinéticos pré-morte celular programada. Neste trabalho constatou-se morte celular por apoptose intermediária, visto que a partir de 24 horas já se observa a presença de núcleos apoptóticos.

Conclusão

A análise dos resultados indica que a terapia fotodinâmica com a ftalocianina AlPcS₄ à uma concentração de 10µM acarreta em uma alteração da morfologia nuclear a qual indica morte celular por apoptose.

Agradecimentos

À Capes, Fapesp e Univap.

Referencias

- [1] Nowis, D; Makowski, M; Stoklosa, T; Legat, M; Issat, T and Golab, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**. V.52, p. 339-352, 2005.
- [2] Brancalion, L; Moseley, H. Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. **Lasers in Medical Science**. V.17, p.173-186, 2002.
- [3] Macdonald, I. J and Dougherty, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. V. 5, p. 105-129, 2001.
- [4] Dougherty, T. J; Gomer, C. J; Henderson, B. W; Jori, G; Kessel, D; Korbely, M; Moan, J; Peng, Q. Review Photodynamic Therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. V. 90, N. 12, p. 889-905, 1998
- [5] Godar, D. E. Light and death: Photons and apoptosis. **The Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. V. 4, p. 17-23, 1999.
- [6] Martines, N. S. Avaliação do Processo de Morte Celular Após Terapia Fotodinâmica. 2003. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.