

ATIVAÇÃO DE CASPASE-3 APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA EM CULTURA DE CÉLULAS HEP-2

Maíra Maftoum-Costa¹, Aline Helena Araujo Machado¹, Andreza R. Simioni², Antônio Cláudio Tedesco², Cristina Pacheco-Soares¹

¹ Universidade do Vale do Paraíba/IPD – Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares; Avenida Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP, CEP 12244-000; maftoum@gmail.com.

² Universidade de São Paulo/Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras; Av. dos Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto/SP, CEP 14040-901.

Resumo- A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica para o tratamento de doenças neoplásicas e não-neoplásicas caracterizadas pelo crescimento exagerado de células não desejadas ou anormais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ativação da protease indicadora de apoptose caspase-3 após o TFD com Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal. Células HEP-2 (carcinoma de laringe humana) foram incubadas por 1h com o fotossensibilizante Cloroalúminio Ftalocianina lipossomal (5µM) e então irradiadas com laser diodo (λ 685nm; 4,5J/cm²; 35mW/cm²). 1, 6 e 48 horas após a irradiação as células foram marcadas com solução de DEVD-amc (120 min) para a análise da ativação de caspase-3 através de microscopia de fluorescência. A análise dos resultados indicou um aumento crescente da ativação da caspase-3 após TFD, dependente do tempo. A ativação desta protease indica o desencadeamento de uma morte celular por apoptose após a TFD com o fotossensibilizante Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Apoptose, Caspase-3, Ftalocianina.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica para o tratamento de doenças neoplásicas e não-neoplásicas caracterizadas pelo crescimento exagerado de células não desejadas ou anormais (MOOR, 2000; OLEINICK et al., 2002).

A técnica requer a exposição das células, ou tecidos, a um composto sensível à luz (fotossensibilizante), oxigênio molecular e luz visível com o comprimento de onda compatível com o espectro de absorção da droga (DOUGHERTY et al., 1998; MOOR, 2000), esses elementos quando combinados criam uma reação fotodinâmica (ALLISON, et al., 2004). Embora TFD possa mediar a sinalização de inúmeros eventos, tem sido proposto que geralmente o tratamento resulte em morte celular.

Em mamíferos a apoptose pode ser desencadeada de duas formas, intrínseca e extrínseca, que está ligada a estímulos intracelulares e extracelulares, respectivamente (YAN; SHI, 2005). Na primeira opção um estímulo interno, como dano ao DNA, ativa, principalmente, a família de proteínas Bcl-2 permitindo a liberação de fatores pro-apoptóticos do espaço intermembrana da mitocôndria para o citoplasma como o citocromo c (CORY; ADAMS, 2002). O citocromo c liberado se liga na Apaf-1 (fator de ativação apoptótica-1), na presença de ATP, formando um complexo denominado apoptossomo

que irá mediar a clivagem da caspase-9 (LAUBER et al., 2001; ADAMS; CORY, 2002; YAN; SHI, 2005).

No segundo modo receptores de superfície da família de proteínas denominada Fator de Necrose Tumoral (TNF) são estimulados através da ligação na porção Fas, ativando o iniciador caspase-8 (WALLACH et al., 1999; YAN; SHI, 2005). Em ambas as situações a ativação de caspases iniciadoras (caspase-9 e caspase-8) leva a ativação das caspases efetoras (caspase-3, -6 e caspase-7) diretamente relacionadas com a efetuação da apoptose (ALMEIDA et al., 2004).

O objetivo do trabalho é observar a ativação da protease indicadora de apoptose caspase-3 em células HEP-2, permitindo avaliar o tipo de evento de morte celular desencadeado pela TFD com o fotossensibilizante Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal.

Metodologia

A linhagem celular utilizada foi a HEP-2 (carcinoma de laringe humana) cultivadas em meio de cultura MEM (Gibco®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino - SBF (Gibco®), 1% de antibiótico e antimicótico (Gibco®), incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (Forma Scientific).

Terapia Fotodinâmica: As células foram incubadas por 1 hora com o fotossensibilizante Cloroalúminio Ftalocianina lipossomal (5µM). Após

a incubação as células foram lavadas 2x com solução tampão fosfato (PBS) 0,1M, para a total retirada do agente fotossensibilizante, e submetidas a irradiação com laser diodo $\lambda=685\text{nm}$, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$, $35\text{mW}/\text{cm}^2$.

Microscopia de Fluorescência: 1, 6, e 48 horas após a TFD as células foram incubadas com solução de Albumina 0,1% (Sigma®) com 0,5% de Tween 20 (Synth®) em PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 7,2) por 15 minutos. Após o período a cultura foi lavada e incubada com solução de DEVD-amc (8 μL de DEVD-amc, Molecular Probes®; 40 μL de HEPES; 10 μL de NaCl; 10 μL de DTT e 132 μL de PHEM) por 120 minutos. Posterior a marcação as células foram lavadas com tampão PHEM e fixadas com paraformaldeído (Sigma®) a 4% em PHEM por 10 min. As lâminas foram montadas com n-propilgalato e posteriormente analisadas em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

Resultados

O acompanhamento na distribuição da protease caspase-3 na cultura HEp-2 denotou a ausência de marcação nas células do grupo controle (Figura 1).

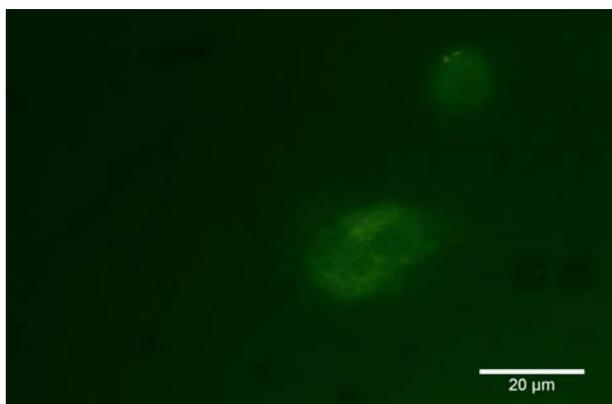


Figura 1 - Células HEp-2 sem qualquer tratamento, coradas com DEVD-amc; possível observar a ausência de marcação.

As células submetidas a TFD ostentaram a marcação ao decorrer dos períodos estudados. O grupo TFD 1 hora (Figura 2) exibiu a presença do corante na região perinuclear em algumas células.

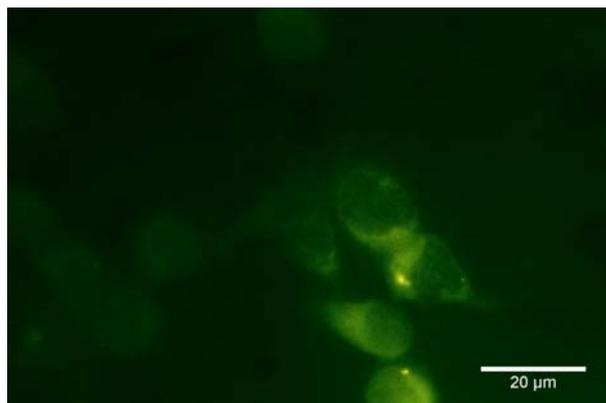


Figura 2 - Células Hep-2 1h após TFD, coradas com DEVD-amc; marcação ao redor do núcleo.

Posterior a 6 horas (Figura 3) foi observada a distribuição do corante em toda a extensão da célula com uma intensificação da fluorescência nas regiões próximas ao núcleo.

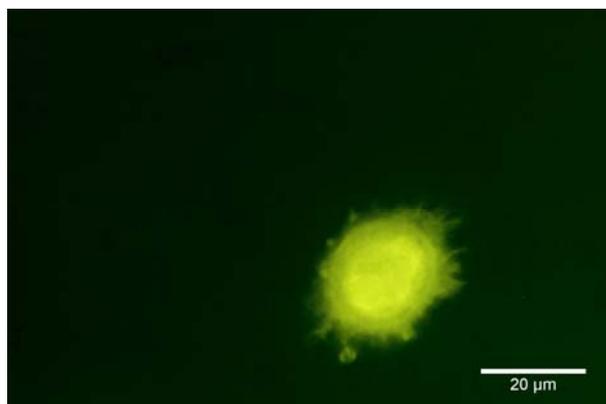


Figura 3 - Células HEp-2 6h após TFD, coradas com DEVD-amc; intensificação da marcação.

Em 48 horas (Figura 4) a marcação torna-se mais forte quando comparada com os tempos anteriores, o corante se mantém por todo o citoplasma principalmente ao redor do núcleo.

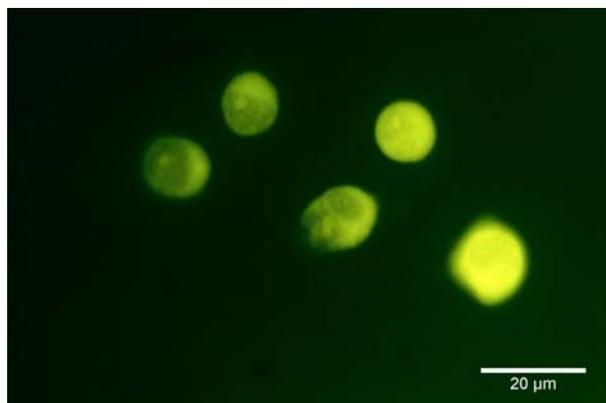


Figura 4 - Células HEp-2 48h após TFD, coradas com DEVD-amc; marcação forte por todo citoplasma.

Discussão

Para o desenvolvimento de uma terapia mais eficiente é de vital importância entender os mecanismos que determinam o processo de morte celular (PLAETZER, et al., 2002). O comportamento celular em resposta a TFD é uma complexa rede de reações químicas, bioquímicas e biológicas que tem sido extensivamente investigada com um grande número de sensibilizadores em diferentes modelos de sistema (MOOR, 2000). O modo de morte celular determinado pela TFD é normalmente apoptótico, e evidências apóiam um envolvimento da mitocôndria nesse processo (LAM; OLEINICK; NIEMINEN, 2001). A permeabilização da membrana externa da mitocôndria e conseqüente perda do potencial de membrana mitocondrial vêm sendo apontadas como um acontecimento relevante no processo de morte apoptótico (PANDURI, et al., 2002).

As caspases é uma família de proteases com significativa importância em processos relacionados com apoptose a chamada morte celular programada. Essas proteínas possuem vários substratos e inibidores. DEVD é um substrato para caspase-3 que, perante modificações que forneçam derivados fluorescentes, permitem sua utilização para análise da atividade dessa protease (SIGMA ALDRICH, 2005).

Gomes et al. (2002) utilizando a alumínio ftalocianina bissulfonada observaram a presença da caspase-3 após aplicação da TFD, demonstrando que esta pode fazer parte do processo apoptótico decorrente do tratamento fotodinâmico.

A análise das células submetidas a TFD utilizando como fotossensibilizante a Cloroalumínio Ftalocianina Lipossomal inidcou a ativação da caspase-3 já 1 hora (Figura 2) após a irradiação, porém foi observado um aumento crescente da presença desta a partir de 6 horas (Figura 3), período em que foi demonstrado em trabalhos anteriores uma presença aumentada de mitocôndrias despolarizadas (MAFTOUM-COSTA, et al. 2005). Esses resultados indicam a ativação da caspase-3 posterior a TFD e o processo apoptótico é confirmado pelo aumento dessa protease, que possui um papel crucial na fase de execução da apoptose.

Conclusão

Células da linhagem HEp-2 submetidas a TFD utilizando como agente fotossensibilizante Cloroalumínio Ftalocianina Lipossomal apresentaram processo de morte celular por apoptose com ativação da protease caspase-3.

Referências

- ADAMS, J.M.; CORY, S. Apoptosomes: engines for caspase activation. **Curr. Opin. Cell Biol.** V.14, p.715– 720, 2002.
- ALLISON, R.R.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R.; HU X-H; CHILDS, C.J.; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and photodynamic therapy.** V. 1, p. 27-42, 2004.
- ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta.** V. 1704, p. 59– 86, 2004.
- CORRY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat. Rev. Cancer.** V. 2, p.647-56, 2002.
- DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy: Review. **J. Natl. Cancer Inst.** V.90, p. 889-902, 1998.
- GOMES, E.R.; ALMEIDA, R.D.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Nitric oxide modulates tumor cell death induced by photodynamic therapy through a cGMP-dependent mechanism. **Photochem. Photobiol.** V. 76, p. 423–430, 2002.
- LAUBER, K.; APPEL, H.A.; SCHLOSSER, S.F.; GREGOR, M.; SCHULZE- OSTHOFF, K.; WESSELBORG, S. The adapter protein apoptotic proteaseactivating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. **J. Biol. Chem.** V.276, p. 29772– 29781, 2001.
- MAFTOUM-COSTA, M.; SIMIONI, A.R.; TEDESCO, A. C. ; da SILVA, N.S. ; PACHECO-SOARES, C., Alteration of the mitochondria and endoplasmatic reticulum after PDT with CIAIPc liposomal. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 1, 2005
- MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J. of Photochemistry and Photobiology.** V.57, p. 1-13, 2000.
- OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochem. Photobiol. Sci.** V.1, p. 1-21, 2002.
- PANDURI, V.; WEITZMAN, S.A.; CHANDEL, N. KAMP, D.W. The mitochondria-regulated death

pathway mediates asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** V. 28, p. 241-248, 2003.

- PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; HAMMERL, P. Characterization of the death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AIPcS₄. **Photochem. Photobiol. Sci.** V. 1, p. 172-177, 2002.

-SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <http://www.sigma-aldrich.com>. Acesso em: 06 Out. 2005.

- WALLACH, D.; VARFOLOMEEV, E.E.; MALININ, N.L.; GOLTSEV, Y.V. ; KOVALENKO, A.V.; BOLDIN, M.P. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. **Annu. Rev. Immunol.** V. 17, p. 331– 367, 1999.

- YAN; N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** V. 21, p. 35-56, 2005.