

TERAPIA FOTODINÂMICA COM O FOTOSENSIBILIZANTE AIPcS₄ INDUZINDO FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS L929.

Oliveira, A. L., Mittmann, J., Pacheco-Soares, C

Instituto de pesquisa e desenvolvimento/Laboratório de cultura de células: Universidade do Vale do Paraíba UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911. Cep 12211-300. São José dos Campos/SP, e-mail: alexandre_20062005@yahoo.com.br

Resumo- A terapia Fotodinâmica (TFD) é uma terapia no combate ao câncer que utiliza luz laser, uma droga fotossensível e oxigênio molecular, que combinados produzem oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio causando danos às estruturas celulares de acordo com o local de sua produção. O fotossensibilizante AIPcS₄ (Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada) tem localização principal na mitocôndria, que após a irradiação, causa danos a ela e desencadeia a apoptose (morte celular programada) com o envolvimento das caspases na fragmentação de todas as estruturas celulares incluindo a fragmentação do DNA nuclear. As células L929 (fibrosarcoma de rato) foram cultivadas e incubadas com a AIPcS₄ por 1h e subsequentemente irradiadas com laser diodo com comprimento de onda de 685 nm. Após intervalos de tempos variados, as células foram lisadas e tratadas com Proteinase K por 1h e o DNA extraído com fenol clorofórmio. O DNA seco foi ressuspenso com tampão TE-RNase e sujeito a eletroforese em gel de agarose. Os resultados demonstraram que o DNA foi extensivamente fragmentado após 96h de TFD, ficando claro que esta terapia é eficiente na indução da apoptose em células L929.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, apoptose, AIPcS₄, caspases, células L929.

Área do conhecimento: Ciências Biológicas.

Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica no combate ao câncer e a outras doenças não malignas como a degeneração macular relacionada à idade (GRANVILLE *et al.*, 2001). Na TFD a luz laser excita uma droga fotossensível absorvida pelas células, que irá reduzir o oxigênio molecular para formar oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) (CASTANHO, DEMINOVA, HANBLIN., 2004), como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) via dismutação (NAGAMI *et al.*, 2005) e radicais hidroxila (-OH) pela reação de Fenton (URBAŃSKI, BERÊSEWICZ., 2000). As espécies reativas de oxigênio causam peroxidação de lipídios, danos às membranas, danos ao citoesqueleto e outros sítios subcelulares dependendo do local de sua produção, levando à morte celular por apoptose ou necrose (HUANG, CHEN, WU., 2005). O fotossensibilizante AIPcS₄ (Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada), um dos componentes das Ftalocianinas, que compreende os fotossensibilizantes de segunda geração, tem muitas vantagens em relação aos outros fotossensibilizantes. Primeiro, o comprimento de onda usado para a sua excitação, 685 nm, é ideal na penetração de tecidos em uma aplicação clínica. Segundo, ele possui uma estrutura hidrofílica resultando em um aumento da seletividade na absorção do fotossensível por células neoplásicas (HUANG, CHEN, WU., 2005). Por ele se localizar principalmente na mitocôndria,

os danos causados nela por sua fotoativação fazem com que seja liberado para o citossol proteínas do espaço entre as membranas internas e externas da mitocôndria, como o citocromo c, Apaf-1 (fator indutor de protease apoptótica), AIF (fator indutor de apoptose) (SRIVASTAVA *et al.*, 2001). No citossol é formado um complexo proteico chamado de apoptossomo, que consiste na oligomerização do citocromo c, Apaf-1, ATP e pro-caspase-9. A pro-caspase-9 é uma caspase iniciadora que após o apoptossomo formado é ativada por auto-clivagem, que em seguida, cliva e ativa a caspase-3 (caspase efetora) (NOWIS *et al.*, 2005). A AIF liberada da mitocôndria atua no núcleo da célula onde vai estimular a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em tamanhos de ~ 50 Kb referente à fragmentação do DNA de estágio I (SUSIN *et al.*, 2000). A caspase-3 ativada cliva o inibidor da CAD (DNase ativada por caspase), a ICAD, (NAGATA *et al.*, 2003) e esta enzima torna-se livre para atuar no núcleo, fragmentando o DNA em tamanhos de 100 pares de base, tornando completa a fragmentação do DNA (estágio II), (SUSIN *et al.*, 2000). Os fragmentos então formados são empacotados dentro de vesículas, os corpos apoptóticos, assim como as várias estruturas celulares degradadas (KAUFMANN, HENGARTNER., 2001).

O propósito desse estudo é investigar a morte celular por apoptose induzida pela TFD com a AIPcS₄ em células L929 pela análise da fragmentação do DNA nuclear.

Materiais e Métodos

Cultura de células

As células L929, fibrosarcoma de rato, foram mantidas em meio MEM (fornecidas pela GIBCO), um meio rico em nutrientes necessários para o crescimento e multiplicação celular. Suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB, que contém fatores de crescimento como a insulina também necessária para a multiplicação. As células foram mantidas em uma longa fase de cultivo com 95% de viabilidade em uma estufa umidificada com 5 % de CO₂.

Terapia Fotodinâmica

As células foram suspensas no meio MEM em garrafas de cultura de 25 cm² a uma concentração final de 5 x 10⁶ células/ml. Foram retiradas o meio da cultura e posteriormente foram adicionados 1 ml de AIPcS₄ (10 µM) e incubadas no escuro por 1 hora. Depois da incubação o corante foi retirado, as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato-salina) e adicionado 1 ml do mesmo nas culturas. As células foram então irradiadas com um laser diodo (fabricante DMC) de 685 nm com uma densidade de 4, 5 J/cm², potência de 35 mW por 20 minutos. Após a TFD o PBS foi retirado, 3 ml de meio fresco foi adicionado e as células foram incubadas na estufa umidificada com 5 % de CO₂. Com as células do grupo controle nenhum tipo de tratamento foi feito.

Fragmentação do DNA

Após os períodos de 24, 48 e 96h, as células foram raspadas das garrafas com o auxílio de um "cell screaper", transferidas em um tubo corning de 15 ml e centrifugadas. As células precipitadas foram lisadas com 500 µl de tampão TTE (tris 10 mM, triton x-100 0,25%, EDTA 1 mM) e adicionadas 15 µl de proteinase K (20 µg/ml) para a degradação de proteínas, e incubadas por 1 hora a 57 °C. Após 1 hora o DNA foi extraído com a adição de 500 µl de Fenol Clorofórmio, agitado no vortex e centrifugado a 14.000 rpm (JOUAN, modelo CR3) por 10 minutos a 4°C. No tubo, após a centrifugação, foi formado duas bandas distintas no qual a parte aquosa, que contém o DNA, foi retirado cuidadosamente. O DNA foi precipitado com a adição de 25 µl de acetato de sódio, 3M, e 500 µl de álcool isopropílico. As amostras foram mantidas no freezer overnight. Após o período overnight as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi posto para secar na estufa (Fanem, modelo Orion 502). O DNA foi resuspendido em 50 µl de Tampão TE-RNase (70 µg/ml) e visualizado em

gel de agarose 2% em 0,5 µg/ml de brometo de etídio.

Resultados

Fragmentação do DNA

O efeito da terapia fotodinâmica com a AIPcS₄ nas células L929 foi examinado por um período de cultivo de 24, 48 e 96 horas após tratamento. A morte celular foi medida pelo padrão de fragmentação do DNA destas células. No grupo controle o DNA apresentou integro mostrando pouca mobilidade eletroforética, ou seja, o DNA genômico ficou confinado no poço do gel ou próximo a ele, devido a ele apresentar um tamanho muito grande para passar por entre a malha que é formada pela agarose polimerizada. O mesmo foi observado nos grupos TFD de 24 e 48 horas (Figura 1).

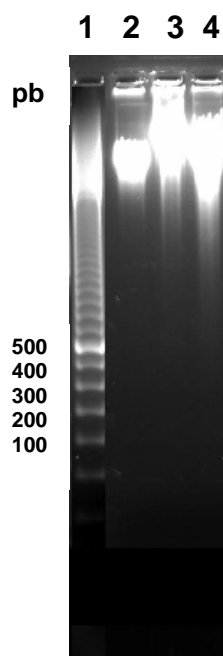


Figura 1. Efeito da TFD em células L929. As células foram tratadas com AIPcS₄ por 1h e depois irradiadas. O DNA foi extraído como descrito em materiais e métodos e visualizados em gel de agarose 2%. 1, marcador de 100 pares de base; 2, grupo controle; 3, 24h após o tratamento; 4, 48h após o tratamento.

No entanto, após 96 horas da Terapia Fotodinâmica foi possível observar um padrão de fragmentação de DNA típica de apoptose, que se estende por todo o gel (Figura 2).

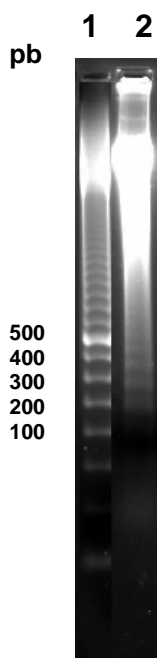


Figura 2. Efeito da TFD em células L929. As células foram tratadas com AIPcS₄ por 1h e depois irradiadas. O DNA foi extraído como descrito em materiais e métodos e visualizados em gel de agarose 2%. 1, marcador de 100 pares de base; 2, grupo TFD 96 horas após o tratamento.

Discussão

A apoptose pode ser dividida em três fases: a fase de iniciação, a efetora e a fase de degradação. A fase de iniciação é completamente dependente do tipo de célula e do estímulo apoptótico, por exemplo: estresse oxidativo, danos ao DNA e ação de citocinas. A fase efetora constitui a ativação de proteases e nucleases que participam na fase de degradação da apoptose, promovendo as características ultraestruturais vistas nela (condensação da cromatina, formação de bolhas citoplasmáticas e vacúolos citoplasmáticos), (HAIL *et al.*, 2006)

As caspases (proteases de cisteína) tem uma função crucial na fragmentação do DNA durante a fase de degradação na apoptose. Recentemente tem sido proposto que a caspase-3 é absolutamente essencial para a fragmentação do DNA e as mudanças associadas a apoptose (PANDEY *et al.*, 2000). A caspase-3 está envolvida no complexo ICAD/CAD (inibidor de DNase ativada por caspase e DNase ativada por caspase, respectivamente), no qual a caspase-3 cliva a ICAD e a CAD torna-se livre para agir na fragmentação oligonucleossomal do DNA (WIDLAK., 2000)

Em 2003 Arnoult e colaboradores descreveram um modo de fragmentação envolvendo nucleases que são ativadas independente de caspase como o fator indutor de apoptose (AIF) e a Endonuclease G. A AIF induz a condensação do

DNA e fragmentação de ~ 50 Kb. Enquanto que a EndoG produz fragmentos oligonucleossomais (ARNOULT., 2003).

Tem sido mostrado que a apoptose é uma forma dominante de morte celular após a TFD em múltiplos experimentos utilizando vários fotossensibilizantes diferentes e tipos diferentes de linhagens celulares (ALMEIDA *et al.*, 2004). Xue e seu grupo de pesquisadores, em 1999 mostraram que, após 60 minutos de TFD usando o fotossensibilizante Pc-4 (Ftalocianina 4), o DNA das células L5178Y-R, linfoma de rato, apresentou-se amplamente fragmentado, demonstrando uma total sensibilidade dessas células frente ao estresse oxidativo causado pela TFD (XUE, HE, OLEINICK., 1999). O que não ocorre com as células L929 depois da TFD com a AIPcS₄. Após 24 e 48 horas de TFD o DNA continuou íntegro comparado com o controle (Figura 1). Só após 96 horas que o DNA apresentou fragmentos que variam de 500 a 100 pares de base (Figura 2).

Conclusão

Analisando nossos resultados é possível afirmar que dependendo do fotossensibilizante usado na terapia fotodinâmica e do tipo de célula, a apoptose pode ser precoce ou tardia. No caso das células L929 podemos dizer que ocorreu uma apoptose tardia após a terapia fotodinâmica com a AIPcS₄.

Referências

- ALMEIDA, R. D. *et al.* Intracellular Signaling Mechanisms in Photodynamic Therapy. **Biochimica et Biophysica Acta.**, n. 1704, p. 59-86, 2004.
- ARNOULT, D. *et al.* Mitochondrial release of AIF and EndoG Requires Caspase Activation Downstream of Bax/Bak-mediated Permeabilization. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 4385-4399, 2003.
- CASTANHO, A. P., DEMINOVA, T. N., HAMBLIN, M. R. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part one – Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, p. 279-293, 2004.
- CONSTANTINI, P. *et al.* Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. **Journal of Experimental Medicine.**, v. 192, p. 571-579, 2000.
- GRANVILLE, D. J. *et al.* Mitochondrial Release of Apoptosis-Inducing Factor and Cytochrome C

- During Smooth Muscle Cell Apoptosis. **American Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 305-311, 2001.
- HAIL, N. J. et al. Apoptosis Effector Mechanisms: A Requiem Performed in Different Keys. **Apoptosis**, v. 11, p. 889-904, 2006.
 - HUANG, H. F.; CHEN, Y. Z.; WU, Y. Znps2p2-Based Photodynamic Therapy Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis in K562 Cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 7, p. 488-494, 2005
 - LUKSIENE, Z. Photodynamic Therapy: Mechanism of Action and Ways to Improve the Efficiency of Treatment. **Medicina**, v. 39, p. 1137-1150, 2003.
 - KAUFMANN, S. H.; HENGARTNER, M. O. Programmed Cell Death: Alive and Well in the New Millennium. **TRENDS in Cell Biology**, v.11, n.12, p. 526-534, 2001.
 - NAGAMI, H. et al. Liposome-assisted Activity of Superoxide Dismutase Under Oxidative Stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 423-428, 2005.
 - NAGATA, S. et al. Degradation of Chromosomal DNA During Apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 108-116, 2003.
 - NOWIS, D. et al. Direct Tumor Damage Mechanisms of Photodynamic Therapy. **Acta Biochimica polonica**, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.
 - PANDEY, S. Caspase-dependent and Independent Cell Death in Rat Hepatoma 5123tc Cells. **Apoptosis**, v. 5, p. 265-275, 2000.
 - SRIVASTAVA, M. et al. Involvement of Bcl-2 and Bax in Photodynamic Therapy-mediated Apoptosis. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 15481-15488, 2001.
 - SUSIN, S. A. et al. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 4, p. 571-579, 2000.
 - URBANSKI N. K., BERSEWICZ, A. Generation of -OH Initiated by Interaction of Fe^{2+} and Cu^+ With Dioxxygen; Comparison With the Fenton Chemistry. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, p. 951-962, 2000.
 - WIDLAK, P. The DFF40/CAD Endonuclease and its Role in Apoptosis. **Acta Bioquimica Polonica**, v. 47, p. 1037-1044, 2000.
 - XUE, L. Y.; HE, J.; OLEINICK, N. L. Promotion of Photodynamic Therapy-induced Apoptosis by Stress Kinases. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, p. 855-864, 1999.