

XIV INIC / X EPG - UNIVAP 2010

ESTUDO DA POTENCIALIDADE DE UMA FTALOCIANINA CONJUGADA COM
ALBUMINA BOVINA COMO AGENTE PARA TERAPIA FOTODINÂMICA**Santos ED*, Beltrame Jr M., Soares CP, Cardoso MAG**

Instituto de pesquisa e desenvolvimento (IP&D-UniVap)/ Laboratório de Imunologia, Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, (12) 3947-1169, Fax: (12) 3947-1149), evtdiniz@hotmail.com

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma terapia inovadora baseada na administração de uma droga fotossensível seguida da irradiação da área afetada com laser. Essa interação resulta na geração de radicais a partir do oxigênio molecular os quais são tóxicos para as células, ou ainda pela indução de danos a estruturas celulares devido à liberação de energia em seu interior. As ftalocianinas (Pc) são fotossensibilizadores de nova geração, as quais possuem boas características para a TFD. Em nosso trabalho utilizamos uma Pc de zinco ligada a albumina (Pc-BSA) pelos anéis pirrólicos, sintetizada pelo laboratório de síntese orgânica do IP&D-UniVap. Resultados anteriores mostraram que a Pc-BSA utilizada induziu o aparecimento de vacúolos, visualizados por microscopia de fluorescência, nas células HEP-2 (câncer laringe) após 12 horas de incubação. Esses resultados sugerem que o bioconjugado sintetizado e estudado (Pc-BSA), apresenta potencialidade para uso em TFD. Nosso objetivo é verificar se a Pc-BSA é eficaz na TFD através de ensaios para a determinação da viabilidade celular por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) após diferentes períodos de incubação com a Pc e a irradiação laser.

Palavras-chave: Ftalocianina, terapia fotodinâmica, BSA

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

A TFD envolve a administração de um fotossensibilizador seguida de ativação por luz em comprimento de onda específico. Esse procedimento resulta numa seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que causam dano irreversível ao tecido tumoral (FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995; NOWIS *et al.*, 2005).

Após a absorção de luz, essa interação resulta na geração de radicais a partir do oxigênio molecular, os quais são tóxicos para as células, ou na indução de danos a estruturas celulares devido à liberação de grande quantidade de energia em seu interior (FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995; NOWIS *et al.*, 2005). A Figura 1 ilustra de forma simples como é feita a terapia fotodinâmica.

Um fotossensibilizador eficaz para TFD deve possuir várias características como pureza química, retenção preferencial pelo tumor, rápida acumulação no tecido tumoral e rápida depuração, ativação pela luz com uma boa penetração tecidual, alto coeficiente de absorção e ausência de toxicidade no escuro. O primeiro fotossensibilizador usado clinicamente foi o Photofrin, que apresentou muitos efeitos colaterais no uso clínico (JORI, 1996).

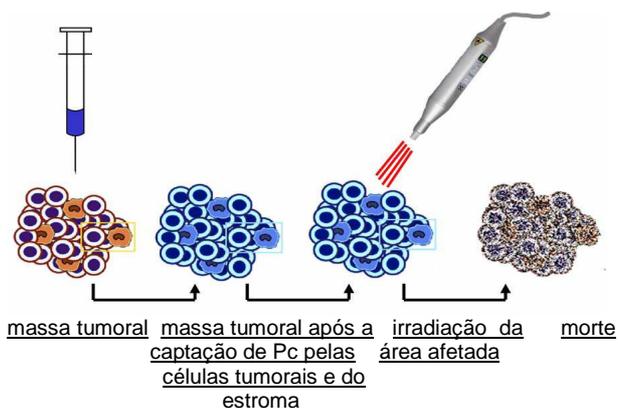


Figura 1: Ilustração do processo envolvido na TFD. Fonte: RIBEIRO, N. M., 2009.

Novos compostos têm sido estudados entre eles as ftalocianinas. Esses são compostos que demonstram alta sensibilidade térmica e química, como também alta absorção de luz nos comprimentos de onda entre 600 e 700 nm. As ftalocianinas são compostos cíclicos formados por quatro unidades indol ligadas por átomos de nitrogênio na posição azo. Assim como as porfirinas, as ftalocianinas têm a propriedade de formar complexos com íons metálicos ligados aos

átomos de nitrogênio dos anéis indol. A albumina é a mais abundante proteína sérica no plasma dos mamíferos e tem sido objeto de muitas investigações devido a seu fácil isolamento em grandes quantidades, além de alta estabilidade e solubilidade. A albumina é a principal proteína que contribui para a pressão colóide osmótica do sangue e também é carreadora de numerosos compostos endógenos e exógenos.

Os tumores são formados por células malignas e estroma, que apesar de interdependentes, influenciam-se mutuamente. O estroma tumoral é formado por vasos sanguíneos, matriz extracelular e leucócitos inflamatórios, entre eles os Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs). Os TAMs constituem os principais componentes do infiltrado leucocitário (BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005), acumulando-se nas áreas de hipóxia do tumor apresentando um efeito anti-tumoral quando em contato inicial, mas quando residem nas áreas de hipóxia, ativam um vasto leque de genes para a promoção da invasão das células tumorais e angiogênicas passando a contribuir para o desenvolvimento da neoplasia (DIRKX *et al.*, 2006). Como os TAMs são altamente capazes de captar albumina e, portanto, internalizar fotossensibilizadores conjugados a ela, ao se administrar uma ftalocianina conjugada a albumina, espera-se que os macrófagos assim como as células tumorais absorvam essa ftalocianina para em seguida iniciar a terapia fotodinâmica. A albumina é a proteína mais abundante no plasma de mamíferos e tem sido objeto de muitas investigações devido a seu fácil isolamento em grandes quantidades, a sua alta estabilidade e sua solubilidade e, por contribuir para a pressão colóide osmótica do sangue além de ser carreadora de numerosos compostos endógenos e exógenos. Essa molécula tem uma massa molecular de 66 kDa e é constituída por uma única cadeia polipeptídica contendo aproximadamente 580 aminoácidos (NAKAMURA *et al.*, 1997).

Metodologia

O fotossensibilizador utilizado tetra-nitro-ftalocianina de zinco (NzPc) (Figura 2), foi sintetizado no Laboratório de Síntese Orgânica, IP&D-UniVap. A ftalocianina precursora foi então conjugada com albumina sérica bovina (BSA) resultando na Pc-BSA que foi usada neste estudo e comparada com a sua precursora.

A fórmula estrutural da Pc-BSA inclui pelo menos uma molécula de albumina bovina ligada a 4 átomos de enxofre da estrutura da ftalocianina (Figura 2).

Ligação da albumina bovina (BSA) → S

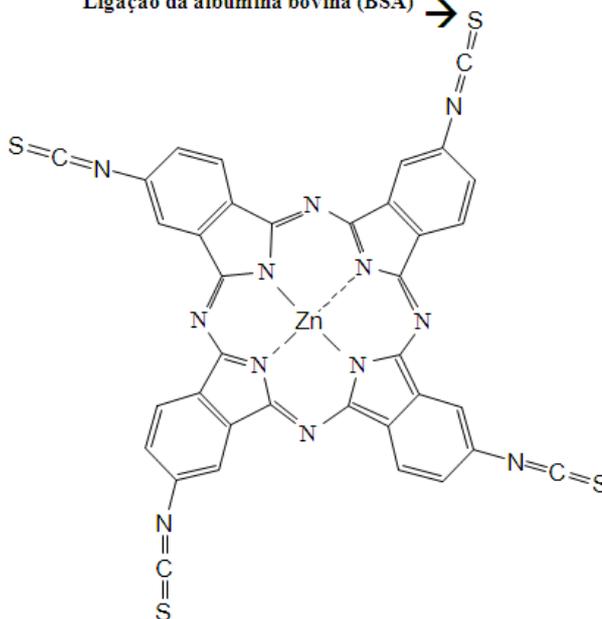


Figura 2: Fórmula estrutural da ftalocianina de zinco sintetizada. Fonte: GONÇALVES, C. S., 2008.

A fórmula estrutural da Pc-BSA inclui pelo menos uma molécula de albumina bovina ligada a 4 átomos de enxofre da estrutura da ftalocianina (Figura 2), o que facilita a fagocitose por tornar possível a ligação de até 4 albuminas bovina.

Foram utilizados macrófagos de retículo-sarcoma da linhagem celular murina J774 e células HEp-2 de câncer de laringe ambas padrão ATCC, *American Type Culture Collection*. Para a avaliação da resposta frente à TFD as células HEp-2 (câncer de laringe) e J774 (macrófagos) foram cultivadas em garrafas de cultura celular, mantidas em 5 ml de meio MEM acrescido de 10% de SBF (MEM completo) e antibiótico. As garrafas de culturas foram mantidas em estufa de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Olympus CK40. Após a formação de uma monocamada no fundo do frasco de cultura, as células foram tripsinizadas e sua concentração ajustada para 5 X 10⁴ células/mL. Em seguida, a suspensão celular foi plaqueada em placas estéreis de 96 poços em quadruplicata. As células foram incubadas por 24 h para adesão a 37 °C em atmosfera umidificada com 5 % de CO₂. As células foram então lavadas com PBS para prosseguir com os ensaios de TFD.

Para os ensaios de TFD as células HEp-2 e J774 foram divididas em quatro grupos experimentais:

1. Controle: grupo isento de qualquer tratamento.
2. Laser: grupo submetido somente a irradiação.
3. Pc: grupo incubado por 1 hora com a Pc.

4. TFD: grupo incubado por 1 hora com Pc e irradiado.

A irradiação foi feita na densidade de energia de 4,5 J/cm² em sala escura com aparelho clínico portátil de laser semiconductor (Thera Lase, DMC, Brasil) com meio ativo fosfeto de índio, gálio e alumínio (InGaAlP), operando com onda contínua. Os parâmetros utilizados estão na tabela a seguir:

Tabela 1- Parâmetros utilizados para irradiação.

Parâmetros	Valores
Comprimento de onda (λ)	685 nm
Densidade de energia	4,5 J/cm ²
Potência	35 mW
Área	0,5 cm ²
Tempo	09 s (4,5 J/cm ²)

Em seguida as células foram protegidas da luz e novamente incubadas por 12 e 24 horas em estufa úmida com 5% de CO₂. Terminado o tempo de incubação, ensaios de MTT foram realizados para se calcular a viabilidade celular após a TFD.

Os ensaios de MTT foram realizados para a determinação da viabilidade celular após o período de incubação de 12 e 24 h após o tratamento dos grupos experimentais. A técnica de MTT é utilizada para avaliar a atividade mitocondrial e, portanto nos informar se as células estão viáveis ou não nos grupos experimentais. A atividade mitocondrial foi avaliada pela análise baseada na formação do precipitado de cor roxa 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazana, produto das desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas, a partir da redução do sal MTT. Os poços foram lavados com PBS, em seguida foi adicionado o MTT diluído em PBS na concentração de 0,5 mg/mL. As células foram incubadas por 30 minutos a 37 °C em atmosfera umidificada com 5 % de CO₂. Em seguida foram adicionados 10 μ L de DMSO + 90 μ L de PBS por poço e as placas foram agitadas por 30 minutos para diluição dos cristais de 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazana. A leitura da absorbância das placas foi feita em leitor de ELISA (Elisa Spectracount, Packard, EUA) utilizando-se filtro de 570 nm. Os valores de absorbância obtidos foram transformados em porcentagem de atividade mitocondrial em relação ao controle através da fórmula:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{(\text{abs. células tratadas} - \text{abs. branco})}{(\text{abs. células controle} - \text{abs. branco})} \times 100$$

Os resultados foram plotados em porcentagem no programa Microsoft Excel 2007

Resultados

Resultados publicados em estudos anteriores, demonstram que a Pc-BSA induz formação de vacúolos em células HEp-2 (Figura 3) após 1 hora de incubação, dando indícios de que esta Pc possui excelentes características para a TFD.

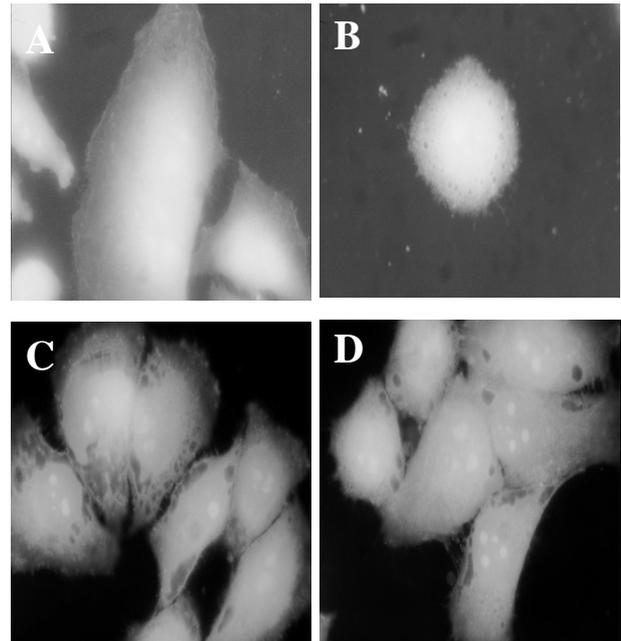


Figura 3. Formação de vacúolos após incubação de Pc-BSA em diferentes tempos em células cancerosas HEp-2. A) 1h, B) 6h, C) 12h, D) 24h. Fonte: GONÇALVES, C. S., 2008.

A partir desses resultados, essa ftalocianina foi testada como possível agente para uso em TFD. Nossos resultados mostram que dos macrófagos J774 submetidos a TFD com Nz-Pc, somente 18% permaneceram viáveis 12 horas após a TFD, e somente 12% permaneceram viáveis 24 horas após a TFD (Figura 4). As células HEp-2 submetidas a TFD com Nz-PC apresentaram 79% e 63% de viabilidade celular 12 e 24 horas após TFD, respectivamente (figura 5). Células HEp-2 ao serem testadas com Pc-BSA apresentaram 47% e 32% de células viáveis 12 e 24 horas após TFD, respectivamente (Figura 6).

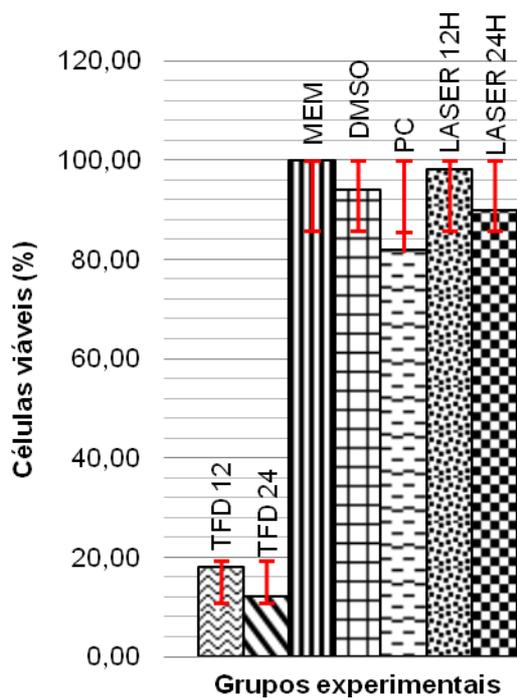


Figura 4: Porcentagem de macrófagos J774 viáveis após TFD com Nz-PC em diferentes tempos.

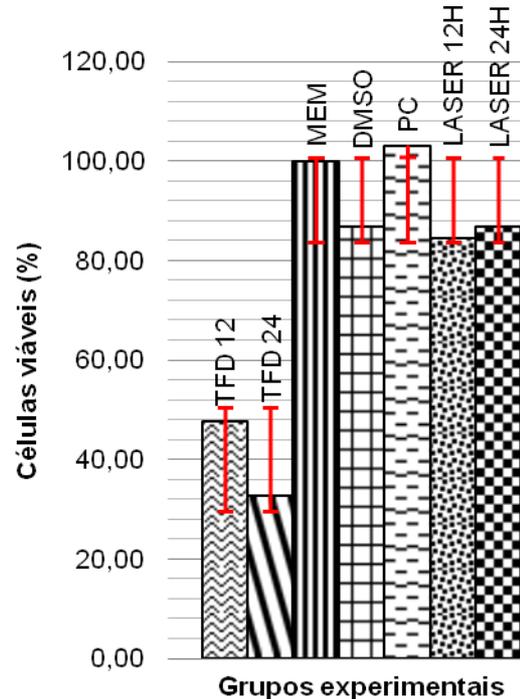


Figura 6: Porcentagem de células HEp-2 viáveis após TFD com PC-BSA em diferentes tempos.

Discussão

Comparadas as células HEp-2 testadas com Nz-Pc, os macrófagos J774 se mostraram células mais vulneráveis a ação desta ftalocianina. Embora a Nz-Pc não tenha apresentado uma taxa elevada de morte celular nas células HEp-2 (Figura 5), calculada como a diferença entre a porcentagem de células viáveis aos 100 % da amostra, ela provocou grandes danos aos macrófagos J774 os quais somente 12 horas após a TFD já apresentaram uma taxa de morte celular de 82 % e 88% 24 horas após a TFD (Figura 4). As células HEp-2, apesar de serem mais resistentes a ação da Nz-Pc, mostraram-se sensíveis a ação da Pc-BSA que, ao serem tratadas e submetidas a TFD, apresentaram significativa taxa de morte celular 12 horas após a TFD, equacionando uma taxa de morte celular de 53% de morte celular e 68% 24 horas após TFD (Figura 6).

Os efeitos colaterais das terapias para o câncer, tornam as mesmas um teste de resistência aos tecidos saudáveis do corpo, por induzirem a morte de células saudáveis juntamente as células malignas. Conseguir desenvolver uma terapia de alta eficácia e objetividade para o tratamento de neoplasias, destruindo tão somente as células cancerígenas é algo a que se propõem os estudos de fotossensibilizadores associados a TFD.

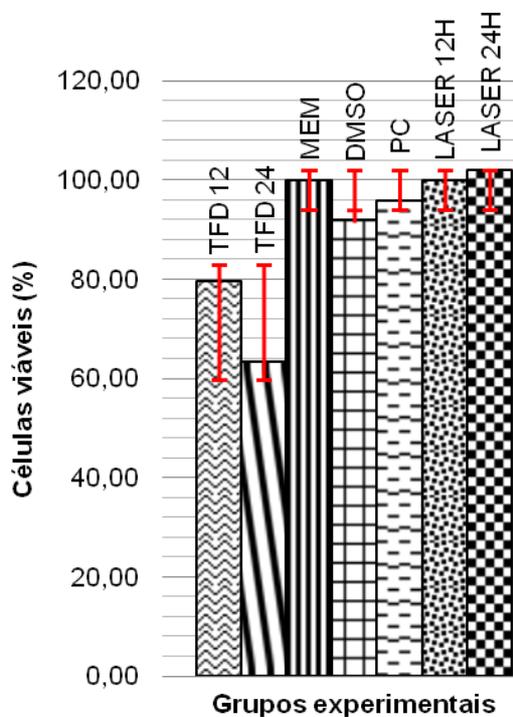


Figura 5: Porcentagem de células HEp-2 viáveis após TFD com Nz-PC em diferentes tempos.

Conclusão

De acordo com os dados obtidos através deste experimento, é possível concluir que tanto a Nz-Pc quanto a Pc-BSA, compostos desenvolvidos por GONÇALVES (2008), apresentam atividade citotóxica ao serem irradiadas por laser, levando as células que participaram da TFD a morte celular. Ainda que a Nz-Pc não tenha apresentado a mesma eficácia que a Pc-BSA nas células HEp-2, ambas se mostraram ótimos compostos para realização da TFD.

Referências

BALKWILL, F, CHARLES, K. A. MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, v. 7, n. 3, p. 211-217, 2010.

DIRKX, A. E. M. *et al.* monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 80, n. 6, p. 1183-1196, 2006.

FISHER, A. M. R.; MURPHREE, A. L.; GOMER, G. J. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 17, n. 1, p. 2-31, 1995.

GONÇALVES C.M. Síntese e propriedades de uma nova ftalocianina de zinco conjugada à albumina bovina. IP&D-UniVap 2008.

JORI, G. Tumour photosensitizers approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 36, n.2, p. 87-93, 1996.

RIBEIRO, N. M. *Estudos de uma ftalocianina conjugada a BSA como agente ativo na terapia fotodinâmica*. São José dos Campos, 2009.

NAKAMURA, K. *et al.* Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. *FEBS Letters*, v. 417, n. 3, p. 375- 378, 1997.