

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CLORO-ALUMÍNIO-FTALOCIANINA LIPOSSOMAL (AIPcCl) EM CÉLULAS HEP-2

Silva-Siqueira, A.C., Mangolin, J.F., Siqueira, E.E., Pacheco Soares, C.

Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares: Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP.
Av. Shishima Hifumi, 2911. CEP: 12.211-300. São José dos Campos – SP – Brasil.

E-mail: dreza.sca@bol.com.br

Resumo- A Terapia Fotodinâmica é uma modalidade terapêutica utilizada para doenças neoplásicas e não neoplásicas, a técnica envolve ativação pela luz, na presença de oxigênio molecular, de certos corantes (fotossensibilizantes) que são de algum modo seletivamente absorvidos pelo tecido alvo, este procedimento induz a inúmeras respostas celulares, incluindo a de morte celular. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade da TFD com cloro-alumínio-ftalocianina lipossomal (AIPcCl) em células HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana), visto que este fotossensibilizante têm sido utilizado em estudos para TFD. Células HEP-2 foram incubadas com o fotossensibilizante AIPcCl a 1mM, e submetidas a irradiação utilizando laser de diodo (λ de 660nm, 30mW, 4,5J/cm², 30mW/cm²). Posteriormente as células foram coradas 24 e 48 horas após a terapia, com laranja de acridina e brometo de etídio (1:1). Foi observada citotoxicidade nos grupos AIPcCl/TFD e AIPcCl isolado nos tempos de 24 e 48 horas após os tratamentos.

Palavras-chave: Citotoxicidade, Ftalocianinas, Cultura de células, Terapia Fotodinâmica.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Desde a sua introdução até cerca de duas décadas, a TFD tem se tornado progressivamente uma técnica estabelecida para o tratamento de cânceres e, mais recentemente, outras doenças (PLATZER *et al.*, 2002). a técnica requer um composto sensível à luz (fotossensibilizante), oxigênio molecular e luz visível em comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do fármaco. Atualmente estudos têm sido desenvolvidos no intuito de potencializar os efeitos da TFD através da combinação de terapias e utilização de fotossensibilizantes conjugados com moléculas carreadoras como lipossomos e partículas poliméricas, proteínas do soro, anticorpos e peptídeos sintéticos, favorecendo uma maior precisão as células tumorais (VERMA, *et al.*, 2007).

A TFD gera espécies reativas do oxigênio e oxigênio no estado excitado, juntos são agentes oxidantes que podem interagir com biomoléculas, induzindo a inúmeras respostas celulares, incluindo a morte celular. A variação do tipo celular, do fotossensibilizante e suas condições de incubação, bem como os parâmetros para a iluminação podem alterar a resposta celular frente à TFD (CASTANO *et al.*, 2005).

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente dependentes do metal central (NUNES *et al.*, 2004). Porém a presença de 4 grupos fenil causa problemas de solubilidade e agregação. Para contornar este problema,

ftalocianinas são freqüentemente preparadas com grupos de ácido sulfônico (AIPcS4), responsáveis pelo aumento da hidrossolubilidade (CASTANO *et al.*, 2004) ou associadas a sistemas baseados em fosfolípidios, ora por meio de emulsão, ora por envelopamento em lipossomos, para lhe garantir eficaz absorção celular (ALBUQUERQUE, 2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade da TFD com cloro-alumínio-ftalocianina lipossomal (AIPcCl) em células HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana), visto que este fotossensibilizante têm sido utilizado em estudos para TFD.

As ftalocianinas têm sido requeridas para a terapia do câncer, devido ao seu alto coeficiente de absorção (630-750nm), permitindo uma maior penetração da luz em tecidos biológicos. Entretanto o estudo da citotoxicidade de fotossensibilizantes é essencial para garantir que a TFD seja um processo eficaz e seguro.

Metodologia

Para avaliação da resposta celular frente à TFD as células forma divididas em 4 grupos:

1. Controle: grupo isento de qualquer tratamento.
2. AIPcCl: grupo incubado com AIPcCl e mantido na ausência de luz.
3. Laser: grupo submetido apenas à irradiação.
4. TFD: grupo incubado com AIPcCl e posteriormente irradiado.

Para o ensaio de fluorescência as células (1×10^5 células/poço) foram incubadas com fotossensibilizante Cloro-alumínio-ftalocianina lipossomal (AIPcCl) à 1mM por 1 hora a 37°C na ausência de luz. Após o período de incubação a cultura foi lavada com PBS (Solução Salina Tampão Fosfato), para a retirada do fotossensibilizante excedente, posteriormente as células foram irradiadas com laser de diodo modo contínuo, (λ) de 685nm, 35mW, 4,5 J/cm², 30mW/cm², e incubadas por períodos de 24 e 48 horas após os tratamentos.

Após o período de incubação as células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio utilizados na proporção 1:1, onde é acrescentando 1µL de solução laranja de acridina/brometo de etídio, em 25µL por poço. Após a coloração, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, as lamínulas foram montadas em lâminas contendo meio de montagem N-propil-galato e analisadas por meio de microscopia de fluorescência (Leica).

Resultados

Os resultados foram analisados através de microscopia de fluorescência, utilizando os corantes laranja de acridina e brometo de etídio que se intercalam no DNA.

Quando comparadas as fotos dos grupos controle 24 h (somente células) com o tratamento fotodinâmico (24 h), observa-se maior condensação do núcleo o que caracteriza células em apoptose, o grupo AIPcCl 24 h apresenta células fragmentadas, o que também é caracteriza apoptose (figura 1).

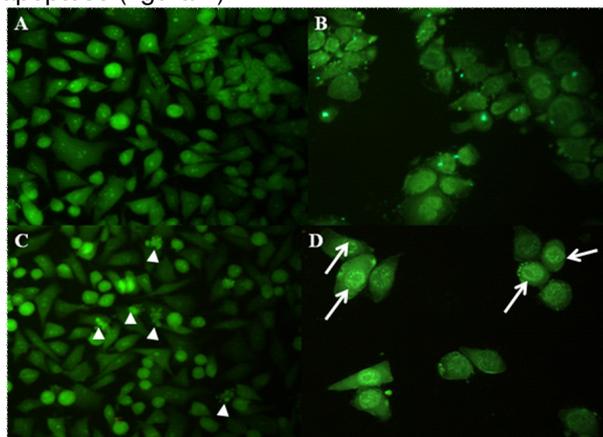


Figura 1: Células HEp-2 marcadas com laranja de acridina e brometo de etídio (1:1) 24 h após os tratamentos. Grupos: (A) Controle, (B) Laser apresentam distribuição homogênea, (C) AIPcCl apresenta células fragmentadas (cabeça de seta) e (D) PDT/AIPcCl apresenta células com núcleo condensado (seta).

Os grupos controle e laser 48 h apresentam distribuição homogênea, já os grupos AIPcCl e PDT/ AIPcCl 48 h apresentam células com núcleo condensado (figura 2) característica relacionada a morte celular por apoptose.

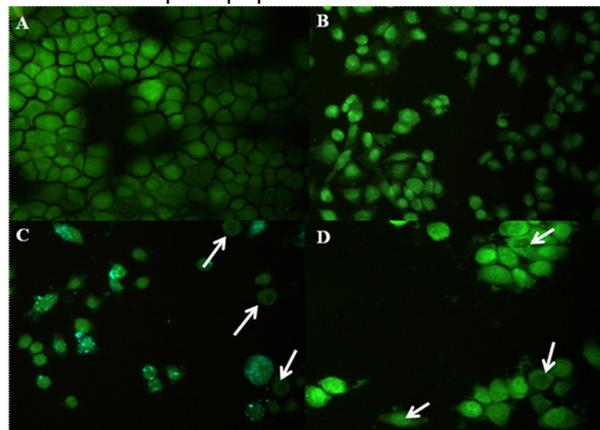


Figura 2: Células HEp-2 marcadas com laranja de acridina e brometo de etídio (1:1) 48 h após os tratamentos. Grupos: (A) Controle, (B) Laser apresentam distribuição homogênea, (C) AIPcCl e (D) PDT/AIPcCl apresentam células com núcleo condensado (seta).

Discussão

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma alternativa para o tratamento do câncer que cresceu de forma significativa nos últimos anos. O fato de ser uma metodologia pouco invasiva (NOWIS *et al.*, 2005), possuir uma grande seletividade e não apresentar toxicidade para os locais não almejados (HASSAN; MOOR; ORTEL, 2000) são vantagens que justificam o grande interesse na pesquisa dessa linha de tratamento. Entretanto, as vantagens dessa modalidade terapêutica são diretamente condicionadas ao fármaco utilizado como fotossensibilizador. Os FS são os principais compostos para a efetividade da TFD, pois ao serem excitados pela luz, produzem espécies altamente reativas, que causam danos às biomoléculas e são responsáveis pela citotoxicidade dessa terapia (BICALHO, 2010).

Os efeitos anti-tumorais da TFD são multifatoriais, em um mecanismo de ação, as espécies reativas de oxigênio atuam diretamente na morte, por apoptose ou necrose, das células tumorais, caso o FS tenha sido captado pelas células. A célula com morte por apoptose apresenta diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, que impedem o extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular e que são removidos pelos macrófagos. (GARG *et al.*, 2010, ROBERTSON *et al.*, 2009, BUYTAERT *et al.*, 2007, PLAETZER *et al.*, 2005) Por outro

lado quando o dano ocorre em lisossomos ou DNA, por exemplo, ocorre morte celular por necrose, onde a célula aumenta gradativamente de tamanho até romper a membrana e extravasar conteúdo citoplasmático para o meio, induzindo resposta inflamatória e causando danos as células adjacentes.

Tapajós e colaboradores (2008) realizaram o mesmo experimento com o fotossensibilizante AIPcCl em carcinoma de boca, apontam redução da viabilidade celular de 95 %. FS com localização lipossomal como AIPcCl, estão relacionados principalmente a mecanismo de morte celular por necrose, possivelmente em razão da liberação de enzimas lipossomais e outras substâncias tóxicas no citoplasma, levando a lise celular (ALBUQUERQUE, 2008). Por outro lado, existe a possibilidade de por brevíssimo tempo que FS lipossomais serem realocados para a mitocôndria nos primeiros segundos de iluminação, iniciando processo de apoptose via citocromo c (HASAN *et al.*, 2003) explicando assim os resultados encontrados no presente estudo, onde se observou predominância de morte por apoptose.

Albuquerque (2008) relaciona os efeitos de inviabilidade celular sem fotoativação para AIPcCl a 5µM, a concentração inadequado de solventes e de fotossensibilizador na solução lipossomal, o que explica os resultados encontrados para os grupos AIPcCl nos tempos de 24 e 48 horas, que foram apenas incubados com o FS e apresentaram células em apoptose.

Conclusão

Foi observada citotoxicidade nos grupos submetidas a TFD, demonstrando sua eficácia do tratamento.

O fotossensibilizante AIPcCl isolado demonstrou-se citotóxico para células HEp-2 na concentração utilizada.

Referências

- ALBUQUERQUE, I.O. Citotoxicidade In Vitro da Terapia Fotodinâmica com Alumínio-Cloro-Ftalocianina Lipossomal em Melanoma Murino (B16F10). 54 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Faculdade de Ciências da Saúde, Mestrado em Ciências da Saúde, Brasília, 2008.
- BICALHO, S. L. Remissão completa de tumores de língua induzidos com células do tumor de Ehrlich por meio da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal. 108p. Dissertação (Mestrado) Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

- BUYTAERT, E., DEWAELE, M., AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim Biophys Acta**. Sep; 1776 (1): 86-107. 2007

- CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N. AND HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic therapy**. v.2, p. 1-23, 2005.

- CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N. AND HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic therapy**. v.1, p.279-293, 2004.

- GARG, A.D., NOWIS D., GOLAB, J., AGOSTINIS P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. **Apoptosis**. Sep; 15 (9): 1050-71. 2010.

- HASAN T., ORTEL B., MOOR A.C.E., POGUE B.W., Photodynamic therapy of cancer. In Brown C, Rini B, Connel P, Posner M, editors. **Holland-Frei Manual of Cancer Medicine**. Hamilton (Ontário) B C Decker Inc.; 605-622., 2003.

- HASSAN, T.; MOOR, A.C.E.; ORTEL, B. Photodynamic Therapy of cancer. In: WEICHSELBAUM, R.R. **Cancer Medicine**. Ontario: BC Decker, p.489-502, 2000.

- NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T; LEGAT, M.; ISSAT, T. AND GOŁĄB, JAKUB. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**. v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

- NUNES, S.M.T.; SGUILLA, F.S.; TEDESCO, A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Bras. J. of Med. and Biol. Res.** v.37, p.273-284, 2004.

- PLAETZER, K., KIESSLICH, T., OBERDANNER, C.B., KRAMMER, B. Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. **Curr Pharm Des.**;11(9)1151-65, 2005.

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

XVINIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XI EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

VINIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

- ROBERTSON, C.A., EVANS, D.H., ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J Photochem Photobiol B**. Jul 17;96 (1): 1-8, 2009.

- TAPAJÓS, E.C.C., LONGO, J.P., SIMONI, A.R., LACAVAL, Z.G.M., SANTOS, M.F.M.A., MORAIS, P.C., TEDESCO, A.C., AZEVEDO, R.B., In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. **Oral Oncology**., 44, 1073-1079, 2008

- VERMA, S, WATT, G.M, MAI, Z. and HANSAN, T. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. **Photochemistry and Photobiology**. 83: 996-1005; 2007.