

ESTUDO DA MORFOLOGIA NUCLEAR DE CÉLULAS SUBMETIDAS A TERAPIA FOTODINÂMICA

Maftoum Costa, M.¹, Tedesco, A. C.², Simioni, A.R.² Pacheco Soares, C.¹.

¹ Laboratório de Cultura Celular e Biologia Tecidual: Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP.
Av. Shishima Hifumi, 2911. cep: 12.211-300. São José dos Campos – SP – Brasil.

² Departamento de Química, FFCLRP: Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto – SP - Brasil

E-mail: maftoum@univap.br

Resumo - Terapia Fotodinâmica (TFD) de tumores malignos é uma modalidade que envolve a irradiação de tumores com um comprimento de onda apropriado de luz após a captação de um fotossensibilizador pelo tecido tumoral (1,2). O presente trabalho objetiva a determinação do processo de morte celular a partir da avaliação da morfologia nuclear. Cultura de células Hep-2 foram incubadas por 1 hora com o fotossensibilizante Cloroalúminio Ftalocianina lipossomal 5µM, retirado o fotossensibilizante as células foram submetidas a irradiação com laser Diodo Thera Lase $\lambda=670\text{nm}$, $4.5\text{J}/\text{cm}^2$, $45\text{mW}/\text{cm}^2$. Posterior a irradiação, as células foram incubadas por 1 e 6 horas para a marcação de fluorescência com DAPI (300nm/10min). A avaliação das microfotografias demonstrou uma alteração no núcleo após 1 hora com a perda de aderência celular e aparecimento de bolhas na membrana plasmática. Após 6 horas foi observada a presença de corpos apoptóticos. Esta estrutura resultante da fragmentação nuclear é indicativo de morte celular por apoptose decorrente da TFD.

Palavras-chave: Apoptose, TFD, Microscopia de Fluorescência

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Terapia Fotodinâmica (TFD) de tumores malignos é uma modalidade que envolve a irradiação de tumores com um comprimento de onda apropriado de luz após a captação de um fotossensibilizador pelo tecido tumoral (1,2). Um dos critérios básicos na escolha de um agente a ser utilizado em TFD, é que o mesmo apresente uma absorção espectral acima de 600nm, a chamada janela óptica onde os componentes endógenos do tecido biológico são transparentes à irradiação incidente (3,4,5).

Oleinick (2) discutiu o possível mecanismo de morte celular decorrente de TFD, concluindo que há evidências de apoptose e necrose. A indução da apoptose está correlacionada com a localização subcelular dos sensibilizantes.

A apoptose ou morte celular programada ocorre quando uma célula dentro de um organismo morre por um mecanismo coordenado por proteínas codificadas pelo genoma do hospedeiro (6,7). Esse evento pode ser dividido em fases para facilitar o estudo. A primeira fase é o estímulo que provoca a resposta apoptótica, o qual pode ser um sinal externo liberado por receptores de superfície ou pode originar-se dentro da célula pela ação de uma droga, toxina ou radiação. A segunda fase inclui

detecção deste sinal ou estado metabólico e transdução do sinal. A fase efetora é a terceira parte do mecanismo de morte celular e inclui as proteases como as caspases, que são ativadas durante a apoptose. A quarta fase da morte celular é a fase pós-morte, na qual a cromatina condensa e o DNA é degradado (6,8).

Durante a apoptose ocorrem alterações características no núcleo celular graças ativação de endonucleases que degradam o DNA. Como resultado, o núcleo torna-se picnótico e a cromatina se condensa nas porções adjacentes à membrana nuclear. Finalmente, o núcleo entra em colapso e se fragmenta. Simultaneamente, as bolhas que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas (corpos apoptóticos) (9).

O objetivo deste trabalho é avaliar as modificações do núcleo possibilitando a determinação do processo de morte celular ocorrida após TFD utilizando como fotossensibilizador Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal (CIAIPc lipossomal).

Material e Métodos

Cultura de células Hep-2 (carcinoma de laringe humana) foram plaqueadas em lamínulas e divididas em dois grupos, grupo controle, onde não foi aplicada nenhum tratamento e grupo TFD. Após a completa adesão das células estas foram incubadas por 1 hora com o fotossensibilizante Cloroalúminio Ftalocianina lipossomal (5mM) .

Posterior a incubação as células foram lavadas 2x com PBS e submetidas a irradiação com laser Diodo Thera Lase com um comprimento de onda de 670nm, densidade de energia de 4.5J/cm², densidade de potência de 45 mW/cm² e potência de 35 mW. Após a irradiação o PBS foi substituído por meio de cultura MEM (Meio Essencial Mínimo Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino Gibco® (SFB) e as células foram incubadas pelo período de 1 e 6h a 37°C e 5% de CO₂.

Microscopia de fluorescência- Após o período de incubação, lavou-se as células com PBS para remoção do meio de cultura com SFB. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 min, ao término desse tempo foram incubadas com DAPI na concentração de 300nM por 10 min. As lâminas foram montadas utilizando n-propil-galato e vedadas com esmalte incolor. Para a análise do material utilizou-se o microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

Resultados

Os grupos controle 1h (Fig.1a) e 6hs (Fig.1b) apresentaram o núcleo ovalado e a membrana citoplasmática bem espalhada pelo substrato.

Nas células submetidas a TFD após 1h (Fig.1c) foram observadas alterações na morfologia nuclear com o início de invaginações na membrana nuclear, diminuição da área ocupada pelo citoplasma e do volume nuclear. Estruturas com o aspecto globular na membrana plasmática causam a deformação da mesma.

Após 6hs (Fig.1d) do tratamento foi observada a fragmentação nuclear onde os corpúsculos apoptóticos começam a se dispersar pelo citoplasma.

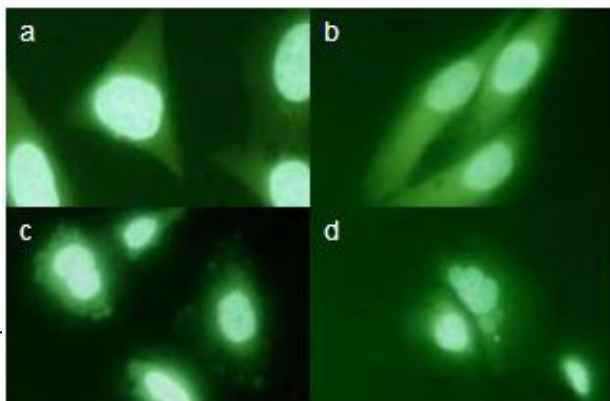


Figura 1. Células Hep-2 marcadas com DAPI; a. controle 1h, b. controle 6h, c. TFD com CIAIPc lipossomal 1h e d. TFD com CIAIPc lipossomal 6h. 1000x

Discussão

O DAPI é um marcador fluorescente para ácido nucleico que tem sido largamente utilizado para identificação da condensação da cromatina encolhimento nuclear e formação de corpos apoptóticos permitindo a determinação do processo de morte celular por apoptose (10). Nas fotos de 6 h analisadas foi possível identificar a formação desses corpúsculos reafirmando os resultados obtidos por outros autores após o tratamento de células neoplásicas com TFD, onde a apoptose é a morte celular observada (11,12).

O encolhimento citoplasmático e a formação de protusões na membrana plasmática, presentes após 1h, são devido a eventos proteolíticos envolvendo as caspases que resultam na clivagem do citoesqueleto e proteínas relacionadas (13), esses eventos foram descritos por Rello *et al.* (14) onde o autor disserta sobre as mudanças morfológicas da célula submetida a tratamento pró-apoptótico.

Conclusão

As células neoplásicas submetidas ao tratamento com a CIAIPc lipossomal apresentaram início da formação dos corpos apoptóticos após 1h e a fragmentação nuclear após 6h, indicativo de um processo de morte celular por apoptose.

Referências

- [1] DOUGHERTY, TJ; GOMER, CI; HENDERSON, BW; JORI, G; KESSEL, D; KORBELIK, M; MOAN, J E PENG, Q. Photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.** V.90, p.889-905, 1998.
- [2] OLEINICK, NL & EVANS. Apoptosis in response to photodynamic therapy. **Photod. News.** V.1, p. 6-9, 1998.
- [3] BIOLO, R.; JORI, G.; SONCIN, M.; PRATASI, R; VANNI, U; RICHTER, B; KENNEY, M. E RODARES, M. **Photochem. Photobiol.** V.59, p. 362-365, 1994.
- [4] DOLPHIN, D. The Porphyrins. **Cancer Journal Chemical.** V.72, p.1005-1013, 1994.

[5] RICCHELLI, F. JORI, G.;GOBBO, S E TROCHIN, M.. **Biophys. Acta**. V.1065, p.42-48, 1991.

[6] VAUX, DL ; STRASSER, A.. The molecular biology of apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci**. V.93, p. 2239-44, 1996.

[7] SAMALI, A; GORMAN, AM E COTTER, TG. Apoptosis: the story so far. **Experientia**, V.52 n.(10-11), 933-41, 1996.

[8] DUELLI, D.M., LAZEBNIK, Y.A. Primary cells suppress oncogene-dependent apoptosis. **Nature Cell Biology** , v.2, p.859-862, 2000.

[9] THOMPSON, CB. APOPTOSIS. *IN*: PAROLIN, M.B., REASON, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq Gastroenterol** , V.38, p.138-144, 2001.

[10] CANDAL, E; ANADÓN, R; DEGRIP, WJ E RODRIGUES-MOLDES, I. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. **Developmental Brain Research**. v.154, p.101-119, 2005.

[11]GAD, F; VIAU, G; BOUSHIRA, M; BERTRAND, R, E BISSONNETTE, R. Photodynamis therapy with 5-Aminolevulinic Acid induces apoptosis and caspase activation in malignant T cells. **Journal of Cutanos Med. and Surgery**. p.8-13, 2001.

[12] FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C. SOUSA, G.; ZÂNGARO, R.A.; SILVA, N.S.;PACHECO, M.T.T E PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmatic reticulum and actin filament after PDT with AIPcS4 .**Lasers in Medical Science**. V.18, p.207 –212, 2004.

[13] MILLS JC, STONE NC, ERHARDT J, PITTMAN RN . Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phos-phorylation. **J Cell Biol** V.140, p. 627–636, 1998.

[14] RELLO, S; STOCKERT, VM; GÁMEZ, A.; PACHECO, M; JUARRANZ, A.; CAÑETE E VILLANUEVA, A. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis**. V.10, p.201-208, 2005.