

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE CARDIOLIPINA

Fujita, E. P.¹, Pacheco Soares, C.²

¹Universidade do Vale do Paraíba – Graduação em Engenharia Biomédica –

Laboratório de Cultura de Células

Avenida Shishima Hifumi, 2911 - Bairro Urbanova - CEP 12244-000, edufujita@uol.com.br

²Universidade do Vale do Paraíba / IPD – Laboratório de Cultura de Células

Avenida Shishima Hifumi, 2911 - Bairro Urbanova - CEP 12244-000, cpsoares@univap.br

Resumo - A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que vem sendo estudada devido à sua grande aplicação na área médica, como no tratamento de câncer. Esta terapia apresenta alto potencial destrutivo de células neoplásicas, porém com baixo efeito às células saudáveis. As drogas fotossensibilizantes, que possuem afinidade às células cancerígenas, podem ser divididas em 3 grupos: de primeira, de segunda e de terceira geração. A zinco ftalocianina (ZnPc) é um agente fotossensibilizante de segunda geração, sendo excitado por luz na região do vermelho (600 – 850nm). Os cromóforos biológicos normalmente não absorvem a luz, por conseguinte, não causam fotossensibilização cutânea como os de primeira geração. O presente projeto teve como objetivo avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre cardiolipina no processo de morte celular por apoptose. O estudo foi realizado com a linhagem celular CHO-K1, ZnPc como agente fotossensibilizante, e laser de diodo de 685nm para a irradiação de 4,5J/cm² de densidade de energia e 35mW de potência. Após a TFD, foi analisada a liberação da cardiolipina, presente na membrana interna de mitocôndrias, e atuando como indicador de morte por apoptose.

Palavras-chave: CHO-K1, Terapia Fotodinâmica, zinco ftalocianina, cardiolipina, mitocôndria

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento disponível paliativamente ou para erradicação de diversos tipos de câncer baseada na aplicação local ou sistêmica de um fotossensibilizante que será ativado por irradiação de luz visível [1,2]. Vários trabalhos têm descrito os possíveis mecanismos de indução da morte celular ativados pela TFD, principalmente aqueles associados a apoptose [1,2].

A TFD pode ser aplicada antes ou depois da quimioterapia, radiação ionizante, ou cirurgia, sem comprometer esses tratamentos ou comprometendo a ele mesmo. Diferentemente da radioterapia e cirurgia, ela pode ser repetida inúmeras vezes no mesmo local [3].

Fotossensibilizantes sintéticos de segunda geração possuem períodos de fotossensibilidade mais curtos, ativação com comprimentos de onda maiores e, portanto, aumento da profundidade de efeito, maior produção de oxigênio singlete, e maior seletividade tumoral [3].

É sabido que ftalocianinas são melhores fotossensibilizantes para TFD que outros, como por exemplo, porfirinas, naftalocianinas, etc. Elas exibem penetração efetiva no tecido devido sua estabilidade química, atividade fotodinâmica e região de absorção de luz própria [4].

Membranas celulares têm sido identificadas como importantes alvos intracelulares, e muitas macromoléculas de seus constituintes naturais são

susceptíveis a reações com o oxigênio singlete produzido durante o processo fotoquímico, tipicamente presente nos processos de TFD. Tais membranas incluem a membrana plasmática, as membranas de retículo endoplasmático distribuídos no citoplasma, e a membrana mitocondrial e do Complexo de Golgi [5].

Nonil-acridina orange (NAO) é um marcador específico de cardiolipina, um fosfolípido que localizado em sítios de contato da membrana mitocondrial interna. A cardiolipina está fortemente ligada a muitas proteínas cruciais para o funcionamento mitocondrial, como por exemplo, os complexos respiratórios, citocromo c, e componentes da permeabilidade do poro de transição [6].

O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o papel da TFD sobre a cardiolipina e, conseqüentemente, a inicialização do processo apoptótico.

Materiais e Métodos

Cultura de Células: A linhagem celular CHO-K1, células de ovário de hamster foram cultivadas em meio de cultura HAM-F12, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino - SBF, 1% de antibiótico e antimicótico (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (Forma Scientific).

Reagentes: Soluções de estoque (10mM) do fotossensibilizante ZnPc (Sigma) e do marcador NAO (Molecular Probes) foram preparadas em Dimetil Sulfóxido (DMSO) e estocadas a -8°C.

Plaqueamento e incubação: Células CHO-K1, em monocamadas confluentes, foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura. A suspensão de células foi coletada em tubos de 15mL e centrifugada a 3000rpm. O sedimento obtido foi ressuspensão em 1mL de meio HAM-F12, 1×10^5 células/mL foram pipetadas em placas de 24 poços, compreendendo os seguintes grupos – controle, laser, ZnPc e TFD. As células foram incubadas com ZnPc (10 μ M) por 60 minutos a 37°C.

Irradiação: As células foram irradiadas utilizando um diodo laser - Thera Laser – DMC (685nm), meio ativo Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP), com uma potência de 35mW, densidade de energia de 4,5J/cm² e área de 2cm².

Microscopia de Fluorescência: Todos os grupos foram incubadas, após os períodos de 1, 4, 24 e 48 horas de incubação pós tratamento, com 0,3 μ M da solução estoque de NAO por 20 minutos. Ao término deste período as células foram lavadas cuidadosamente com tampão PHEM, e fixadas com 3% de paraformaldeído (PA) em 0,1M de tampão PHEM.

Resultados

Como descrito anteriormente, alteração na membrana interna mitocondrial inicializa morte celular por apoptose. Vários são os fatores indicativos da inicialização deste processo, mas neste trabalho enfatizamos alterações na cardiolipina, que esta diretamente relacionada a massa mitocondrial. A análise dos resultados demonstra a ação da Terapia Fotodinâmica após incubação das células com ZnPc, diretamente na membrana mitocondrial interna, como mostram as figuras abaixo.

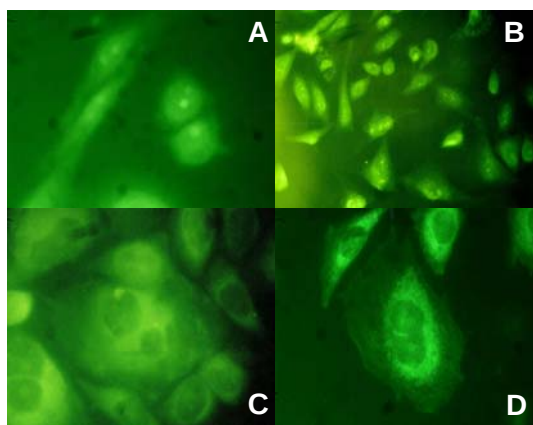


Figura 1: Avaliação de cardiolipina em células CHO-K1, tratadas com ZnPc e submetidas a Terapia Fotodinâmica. A – Células controle, não irradiadas, incubadas por 1 hora após TFD. B – Células submetidas a TFD e incubadas por 1 hora, observa-se a distribuição

da marcação por todo o citoplasma, sendo mais evidente que o grupo controle. C – Células controle incubadas por 48 horas após TFD. D – Células submetidas a TFD e incubadas por 48 horas, apresentam as mitocôndrias na região perinuclear, evidenciando aumento de massa mitocondrial.

Discussão

Muitos fotossensibilizantes para terapia fotodinâmica concentram-se em membranas internas, especialmente mitocôndrias. Fotodanos nas proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, favorecem a interação com o complexo do poro, que altera a permeabilidade mitocondrial, permitindo a formação de sítios de contato entre as membranas interna e externa da mitocôndria. Tais complexos e a membrana interna são os únicos que apresentam fosfolípidios de cardiolipina. Através da utilização de marcador específico de cardiolipina – Nonil-acridina orange (NAO) pode-se acompanhar alterações na disposição deste fosfolípido, decorrente de fotodanos. Como apresentado na figura 1 (B e D), as alterações na disposição de cardiolipina é tempo dependente, pois observamos marcações mais evidentes no período de 48 horas pós TFD, com concentração de mitocôndrias na região perinuclear. O aumento da captação de NAO pelas mitocôndrias fotodanificadas, sugere um aumento na área de membrana.

Conclusão

Esta é uma técnica que favorece estudos da localização de fotossensibilizantes e outras drogas que apresentam como alvo mitocôndrias.

Referências

- [1] BRANCALEON, L.; Moseley, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. Dundee, UK. **Lasers in Medical Science**. v.17, p. 173-186, 2002.
- [2] GREBEŇOVÁ, D., et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 69. p.71-83, 2003.
- [3] HOPPER, C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. **The Lancet Oncology**. v.1, p.212-219, 2000.
- [4] LIU, M.O. Photodynamic applications of phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** 165. p.131-136, 2004.

[5] FERREIRA, S.D.R.M. Analysis of mitochondria, endoplasmatic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS₄. **Lasers in Medical Science**. v.18, p.207-212, 2004.

[6] MORRIS, R. L., et al. Fluorescence resonance energy transfer reveals a binding site of a photosensitizer for photodynamic therapy. **Cancer Research**. v.63, p.5194-5197, 2003.