

ATIVIDADE ANTITUMORAL DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM NANOPARTÍCULAS DE HIPERICINA FRENTE AO CÂNCER CERVICAL

Kayane Harumi Mashiba (PIBIC/CNPq), Gabriel Batista César, Renato Sonchini Gonçalves, Wilker Caetano, Noboru Hioka, Maria Vitória Felipe de Souza, Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke (Coorientadora), Marcia Edilaine Lopes Consolaro (Orientador), e-mail: melconsolaro@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Maringá, PR.

Ciências Biológicas II – Morfologia – Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, câncer cervical, hipericina

Resumo:

O câncer cervical apresenta-se hoje como o quarto mais incidente e letal na população mundial feminina. Apesar disso, as opções de tratamento e combate a esse tipo de câncer ainda são falhas; diante desse cenário pesquisas utilizando a Terapia Fotodinâmica (TFD) surgiram e começaram a apresentar resultados satisfatórios quanto a citotoxicidade às células tumorais. A hipericina é uma quinona aromática policíclica biossintetizada por algumas plantas do gênero *Hypericum* e foi alvo de diversos estudos, possuindo citotoxicidade comprovada em diversos artigos; entretanto por ser altamente hidrofóbica, neste trabalho, foi utilizada em combinação com o plurônico F-127 para auxiliar sua entrada na célula. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antitumoral da FTD utilizando a hipericina nanoencapsulada em plurônico F-127 (HIP/F-127) frente à linhagem celular de câncer cervical HeLa (HPV 18-positivo) em comparação com linhagem celular epitelial humana não tumorigênica (HaCaT). As linhagens celulares foram expostas a soluções diluídas de HIP/F-127 (0,4-3,2 $\mu\text{mol/L}$ HIP – 1-7,5 $\mu\text{mol/L}$ F-127). A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT), as alterações morfológicas após o tratamento foram observadas por microscopia comum e a citotoxicidade a longo prazo foi avaliada com o ensaio clonogênico. Concluiu-se que a HIP/F-127 exerce efeitos citotóxicos dependentes da concentração em HeLa, apresentando alta seletividade para células cancerosas, tendo em vista que a linhagem HaCat não teve sua viabilidade reduzida devido ao tratamento.

Introdução

O câncer cervical (CC) é o quarto tipo mais comum de câncer em mulheres no mundo e o sétimo no geral, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma, com aproximadamente 500.000 novos casos estimados por ano. É o terceiro tumor mais frequente na população feminina brasileira, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. A infecção genital por *Papillomavirus* humano (HPV) é responsável por formas clínicas benignas e assintomáticas e/ou lesões malignas mucosas do trato genital.

Diversos estudos têm correlacionado à presença do HPV principalmente dos tipos de alto risco 16 e 18, como o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, assim como de lesões pré-cancerosas. As opções de medicamentos para o tratamento com efeitos citotóxicos para evitar o avanço do câncer cervical ainda são limitadas e apresentam elevadas taxas de insucesso, visto que as taxas de morte por essa doença são crescentes. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) aparece como uma opção cada vez mais interessante no combate ao câncer cervical. Utilizando-se de três pilares – droga sensibilizante, iluminação em comprimento de onda adequado e presença de oxigênio molecular – essa terapia consegue acumular o fotossensibilizante em tecido neoplásico e produzir quantidade significativa de produtos citotóxicos após a exposição à luz. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antitumoral da TFD utilizando hipericina nanoencapsulada em plurônio F-127 (HIP/F-127) frente à linhagem celular de câncer cervical HeLa (HPV 18-positivo) em comparação com linhagem celular epitelial humana não tumorigênica (HaCaT).

Materiais e métodos

Fotossensibilizador e fonte de luz: A HIP/F-127 (100 $\mu\text{mol/L}$ de HIP/250 $\mu\text{mol/L}$ de F-127) liofilizada e a fonte de luz foram fornecidos pelo Núcleo de Pesquisas em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. A fonte de luz utilizada foi um dispositivo com 66 unidades de diodos emissores de luz (LED) branca a 6,33 J/cm^2 .

Linhagens celulares e condições de cultura: As linhagens utilizadas foram linhagem celular de câncer cervical HeLa (HPV 18-positivo) originada de adenocarcinoma de cérvix uterino humano e linhagem celular epitelial humana não tumorigênica (HaCaT). As células em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de anfotericina B em estufa de cultura celular a 37 °C com tensão de CO₂ de 5%.

Tratamento: HeLa e HaCaT foram expostas a soluções diluídas de HIP/F-127 (0,4-3,2 $\mu\text{mol/L}$ HIP – 1-7,5 $\mu\text{mol/L}$ F-127) por 30 minutos na ausência de luz. Após esse período as linhagens celulares foram expostas a fonte de luz por 15 minutos e novamente incubadas por 30 minutos na ausência de luz. Uma solução contendo apenas o Plurônio F-127 (250 $\mu\text{mol/L}$) foi utilizada para verificar se ele exercia alguma atividade sobre as células. Como controle negativo foram usadas células não tratadas.

Teste de viabilidade celular – MTT: As células foram semeadas (2,5 $\times 10^5$ células/mL) em placa com 96 poços. Após a confluência celular, o tratamento foi realizado conforme o item anterior. Depois de tratadas, as células foram incubadas com 50 μL da solução de MTT (2 mg/mL) e incubadas por 4 horas. Após esse período, o formazan formado foi diluído em DMSO e a absorbância lida em leitor de microplacas (Loccus) a 570 nm. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas apenas com DMEM

ou apenas com F-127. A partir desse experimento foram calculados os valores de concentração inibitória (IC) para inibir em 30% do crescimento celular em comparação com as células não-tratadas (IC₃₀), 50% (IC₅₀) e 90% (IC₉₀). O mesmo procedimento foi realizado na ausência de luz. A morfologia celular após o tratamento foi observada em microscópio de fluorescência invertido EVOS FL Cell Imaging (Life Technologies).

Ensaio clonogênico: HeLa e HaCat foram semeadas em placas de 6 poços em concentração de 600 células/poço. Após 24 horas, o tratamento foi realizado utilizando os IC₃₀ (0,90 µmol/L) e IC₅₀ (1,50 µmol/L) e incubação por 7 e 14 dias. Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas. As colônias formadas foram fixadas com Metanol e coradas com Cristal Violeta para a contagem.

Análises estatísticas: Foram feitas com o programa GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram avaliados através do teste t-Student e apresentados através da média e do desvio padrão de ao menos três experimentos independentes em triplicata.

Resultados e Discussão

O tratamento com HIP/F127 na ausência de iluminação não causou citotoxicidade (Figura 1A). O tratamento só com F-127 também não apresentou efeito citotóxico na presença e na ausência de luz, similar ao controle negativo (células não tratadas) expostas à luz. Os efeitos citotóxicos após a iluminação foram dependentes da concentração da HIP/F127 em HeLa (Figura 1B), onde observa-se a diminuição das células viáveis a partir das primeiras concentrações testadas. Ainda, esta citotoxicidade foi altamente seletiva para as células cancerosas, uma vez que a linhagem HaCat não teve sua viabilidade reduzida devido ao tratamento (Figura 1B). A partir do experimento de citotoxicidade, foram calculados os IC₃₀ (0,90 µmol/L), IC₅₀ (1,50 µmol/L) e IC₉₀ (2,70 µmol/L) da HIP/F127 para HeLa.

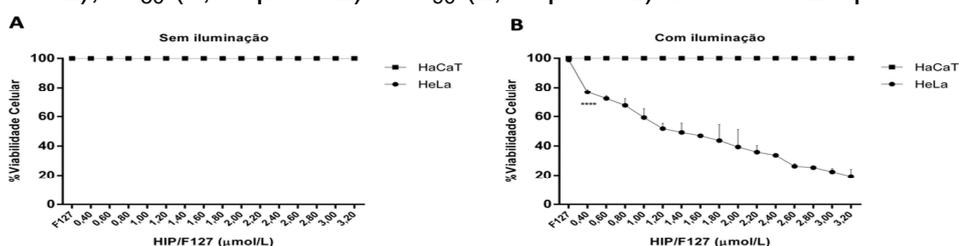


Figura 1 – Resultados dos efeitos citotóxicos da HIP/F-127 nas linhagens celulares HeLa e HaCat sem (A) e com (B) iluminação.

As alterações da morfologia na linhagem tumoral HeLa ocorreram a partir da primeira concentração testada (0,4 µmol/L). Houve retração do citoplasma e descolamento das células da placa, que possuem como característica o crescimento em adesão (Figura 2).

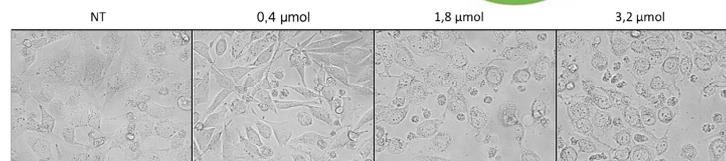


Figura 2 – Morfologia celular de HeLa após tratamento com HIP/F-127.

O potencial clonogênico diminuiu de forma dose-tempo-dependente nas células expostas ao tratamento (Figura 3). As células expostas por 7 e 14 dias à HIP/F-127 utilizando os IC₃₀ e IC₅₀ tiveram o número e a circunferência de suas colônias reduzidas em comparação com o controle não tratado.

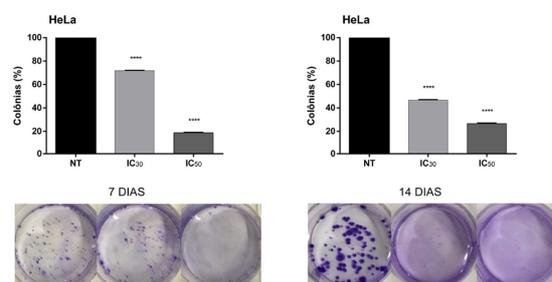


Figura 3 – Resultados do ensaio clonogênico em 7 e 14 dias.

Conclusões

A HIP/F-127 demonstrou efeito citotóxico seletivo dependente da concentração na linhagem celular HeLa, sem efeito na HaCat, evidenciando que essa pode ser uma alternativa a ser explorada para o tratamento do câncer cervical. Experimentos futuros devem determinar os mecanismos de ação da atividade antitumoral da TFD utilizando HIP/F-127.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica.

Referências:

AGOSTINIS, Patrizia et al. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 34, n. 3, p. 221-241, 2002.

CONSOLARO, M. E. L., MARIA-ENGLER S. S. **Citologia Clínica Cérvico - Vaginal: Texto e Atlas**. São Paulo, Brasil, 2012.

DAMKE, Gabrielle Marconi Zago Ferreira et al. Selective photodynamic effects on cervical cancer cells provided by P123 Pluronic®-based nanoparticles modulating hypericin delivery. **Life Sciences**, p. 117858, 2020.



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA. Brasil. [homepage da internet].
[Acesso em: 17/08/2020]. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp?ID=5>

SCHIFFMAN, Mark et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007.