

MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM NANOPARTÍCULAS DE HIPERICINA EM LINHAGEM DE CÂNCER CERVICAL POSITIVA PARA HPV-18 (HeLa)

Kayane Harumi Mashiba (PIBIC/CNPq), Lucimara Rodrigues Carobeli, Gabrielle Marconi Zago Ferreira Damke (Coorientadora), Marcia Edilaine Lopes Consolaro (Orientadora), e-mail: melconsolaro@gmail.com

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

Área: Ciências Biológicas; Subárea: Morfologia - Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, câncer cervical, hipericina

Resumo

O câncer cervical representa um importante problema de saúde mundial. As opções de tratamento ainda são limitadas e apresentam elevadas taxas de insucesso. Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade aplicada no tratamento de diversos tipos de câncer e têm sido evidenciada uma importante atividade da hipericina (HIP) como agente da TFD. O objetivo deste estudo foi avaliar os mecanismos de ação antitumorais da TFD usando HIP/F127 frente à linhagem celular de adenocarcinoma cervical HeLa (HPV 18-positivo) em comparação com linhagem celular epitelial humana não tumorigênica (HaCaT). Em conjunto, nossos resultados indicam um papel potencialmente útil das micelas F127/HIP como uma plataforma para a entrega de HIP para tratar de forma mais específica e eficaz o câncer cervical decorrente de HPV-18 por meio de PDT, sugerindo que são dignas de avaliações pré-clínicas *in vivo*.

Introdução

O câncer cervical é o quarto tipo mais comum de câncer em mulheres no mundo com aproximadamente 600.000 novos casos anuais. 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 o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical, principalmente os tipos de alto risco HPV-16 e HPV-18.

As opções de medicamentos para o tratamento do câncer cervical ainda são limitadas e apresentam elevadas taxas de insucesso. Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade aplicada no tratamento de diversos tipos de câncer e têm sido evidenciado uma importante atividade da hipericina (HIP) como agente fotossensibilizante (FS) para TFD. Porém, até onde conhecemos, pouco têm sido estudado em relação aos

mecanismos de ação da atividade antitumoral *in vitro* da HIP encapsulada com o copolímero plurônico F127 (HIP/F127), no intuito de aumentar a sua solubilidade, frente a linhagem de câncer cervical com HPV-18 (HeLa). Considerando ainda que um projeto anterior do mesmo grupo que já avaliou a atividade antitumoral da HIP/F127 em HeLa, objetivamos determinar os mecanismos dessa ação antitumoral nestas células em comparação com linhagem celular epitelial humana não tumorigênica (HaCaT).

Materiais e métodos

FS e fonte de luz: HIP/F127 (100 µmol/L de HIP/250 µmol/L de F127) e fonte de luz (66 unidades de diodos emissores de luz branca a 6,33 J/cm²) foram fornecidos pelo Núcleo de Pesquisas em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) do Departamento de Química da UEM.

Linhagens celulares e cultura: Foram utilizadas as linhagens celulares humanas HeLa (adenocarcinoma de cérvix uterina, HPV 18-positivo) e epitelial humana não tumorigênica (HaCaT). As células foram mantidas em DMEM com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de anfotericina B, a 37 °C com tensão de CO₂ de 5%.

Internalização e localização subcelular da HIP/F127: Células (1,5x10⁵ células/mL) foram incubadas por 15 minutos com sondas para mitocôndria (MitoTracker®, Invitrogen) e núcleo (NucBlue®, Live ReadyProbes®) e, por 30 minutos com HIP/F127, então observadas em microscópio de fluorescência invertido com filtros DAPI (azul), RFP (vermelho) e GFP (verde) em aumento de 20x.

Ensaio de migração celular – teste da ferida: Células (2x10⁵ células/mL) foram semeadas e após 24 horas foi realizado um corte com ponteira de 1000 µL em cada poço, a seguir tratamento com IC₃₀ e o IC₅₀ de HIP/F127 e iluminadas por 15 minutos. Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas. A migração de células para a região danificada foi registrada por microscópio de fluorescência invertido em 24, 48 e 72 horas de incubação.

Determinação da Via de Morte celular: Foi realizada marcação com Anexina V (apoptose) e Iodeto de Propídeo (PI, necrose), após o tratamento das células com IC₅₀ e IC₉₀ de HIP/F127. Controle negativo (grupo de células não tratadas) e controle positivo (Camptotecina 20 µM que promove apoptose e Digitonina 40 µM que promove morte por necrose) foram utilizados para a comparação. As células foram observadas em microscópio de fluorescência invertido.

Deteção de espécies reativas de oxigênio (EROs): 1,5 x 10⁵ células/mL foram semeadas tratadas com o IC₅₀ de HIP/F127 e fixadas em solução de formaldeído 4% por 15 minutos no escuro. Após, foram tratadas com 20 µM H₂DCFDA por 15 minutos, e observadas em microscópio de fluorescência.

Análises estatísticas: Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0. Os experimentos foram realizados em triplicata e seus resultados expressos em

média $\pm$ desvio padrão (DP). Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados e Discussão

Foi possível observar que as células HeLa apresentaram maior fluorescência, logo, maior internalização da HIP quando comparadas com as células HaCat (Figura 1).

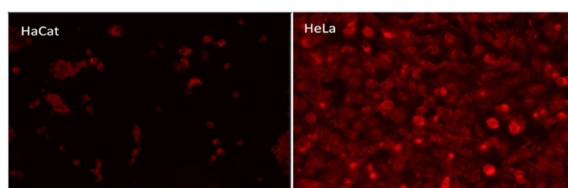


Fig. 1. Internalização da HIP-F127 nas linhagens celulares HaCat e HeLa, com filtro vermelho/RFP (objetiva de 40x).

A HIP/F127 foi localizada nas mitocôndrias e não no núcleo das células HeLa (Figura 2).

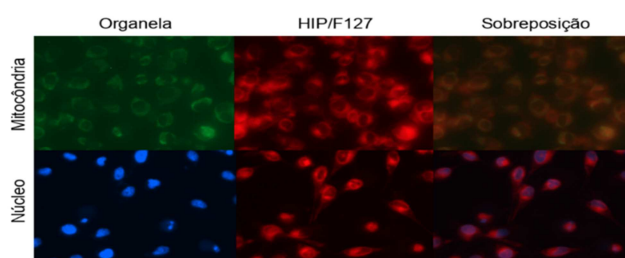


Fig. 2. Localização subcelular da HIP/F127 em HeLa incubada com MitoTracker e NucBlue (objetiva de 40x).

As células HeLa apresentaram morte por necrose (Figura 3).

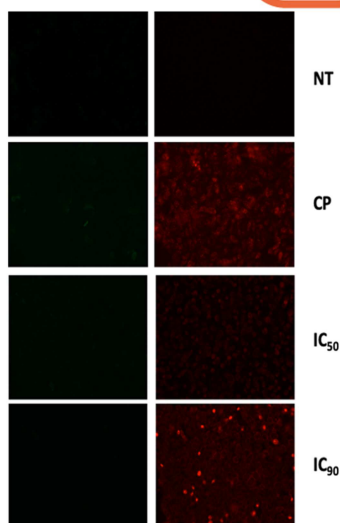


Fig. 3. Avaliação da via de morte de células HeLa expostas a HYP/F127 (IC₅₀ e IC₉₀) e marcadas com anexina V e iodeto de propídeo, indicadores de apoptose (verde) e necrose (vermelho), respectivamente (objetiva de 20x).

Foi observado que a HIP/F127 aumentou significativamente a produção de EROs (Figura 4). Foi ainda possível observar que a exposição com HYP/F127 (IC₃₀ e IC₅₀) inibiu significativamente a migração celular e o fechamento da ferida em todas as horas analisadas (Figura 5).

Fig. 4.

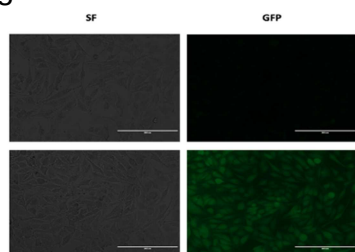


Fig. 5.

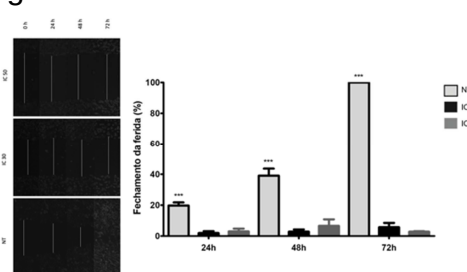


Fig. 4. Produção de EROs induzida pela HIP/127 em HeLa (objetiva de 20x).

Fig. 5. Análise de migração celular de células HeLa após exposição a HYP/F127 (IC₃₀ e IC₅₀) e iluminação (objetiva de 10x). O gráfico mostra a porcentagem de fechamento da ferida após 24, 48 e 72h de tratamento e na ausência dele, comparado ao momento inicial (0h). *** p < 0,001.

Conclusões

Em conjunto, nossos resultados indicam um papel potencialmente útil das micelas F127/HIP como uma plataforma para a entrega de HIP para tratar de forma mais específica e eficaz o câncer cervical decorrente de HPV-18 por meio de PDT, sugerindo que são dignas de avaliações pré-clínicas *in vivo*.

Agradecimentos

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

Referências

CONSOLARO, M.E.L.; MARIA-ENGLER, S.S. **Citologia Clínica Cérvico - Vaginal: Texto e Atlas**. 1ª ed. São Paulo: Roca Ltda, 2012.

DAMKE, G. M.Z.F. 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**). Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2019. 122 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 17/08/2021.