

EFEITOS TARDIOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COMBINANDO AZUL DE METILENO E ERITROSINA DECIL-ÉSTER EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL HUMANO DA LINHAGEM CACO-2.

Lucas de Oliveira Moraes (PIBIC/CNPq/FA/UEM)¹, Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali (Orientadora)². E-mail: mibrspeziali@uem.br.

¹Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina, Maringá, PR. ²Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: **Ciências Biológicas/ Fisiologia Geral**

Palavras-chave: fotossensibilizador; câncer; micelas poliméricas.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido proposta como adjuvante no tratamento de câncer. Neste estudo, avaliamos efeitos fotodinâmicos e antitumorais de formulação de eritrosina decil-éster (ERIDEC) e azul de metileno (AM), em células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2). A TFD com F-127/ERIDEC/AM reduziu a viabilidade celular e atividade formadora de colônias de células Caco-2. No escuro, o tratamento com F-127/ERIDEC/AM por 20 horas causou pequena redução na viabilidade, mas quando mantido por 7 dias, impediu a formação de colônias. O conjunto de dados apontam o sistema F-127/ERIDEC/AM como alvo promissor para futuros estudos *in vivo*, com vistas a aplicações futuras para o tratamento do CCR.

INTRODUÇÃO

Na última década, houve um aumento de 20% na incidência de câncer, com estimativa de 25 milhões de casos novos no mundo até 2030. No Brasil, estima-se 45.630 novos casos entre 2023 e 2025. Excluindo-se o câncer de pele não-melanoma, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro em incidência no Brasil (De Oliveira Santos et al., 2023). A terapia fotodinâmica (TFD) foi proposta como adjuvante aos tratamentos oncológicos tradicionais. O mecanismo TFD envolve a interação entre fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular. Os FSs absorvem a luz visível e convertem energia em oxigênio molecular circundante, gerando espécies de oxigênio altamente reativas e oxigênio singlete (De Freitas et al., 2019). O fenotiazínico AM é um bom candidato a FS na TFD para o tratamento do CCR, pois tem banda de absorção em 660nm e um grau de lipossolubilidade, que permite boa interação com membranas biológicas e, quando administrado *in vivo*, há maior concentração intestinal e hepática (Rojas, Bruchey e Gonzales-Lima, 2012). A ERIDEC é um derivado xantêmico da Eritrosina-B e com ótimo rendimento quântico para geração de oxigênio singlete e alta lipossolubilidade (De Freitas et al., 2019). Avaliamos efeitos fotodinâmicos e antitumorais da combinação ERIDEC e AM

formulados em micelas poliméricas de plurônicos F-127 em uma linhagem de adenocarcinoma colorretal humana Caco-2.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular: A linhagem Caco-2 (ATCC, USA) foi cultivada em estufa (CO₂-5%; 37°C) em frascos (25cm²) com High Glucose- DMEM, suplementado com penicilina-estreptomicina (1%) e soro fetal bovino (10%).

Sistema fotossensibilizador (F-127/ERIDEC/AM): ERIDEC e AM foram formulados em micelas poliméricas de plurônicos F-127. As concentrações de ERIDEC variaram entre 0,31 e 5µM e a de AM foi sempre 5µM. As micelas foram obtidas por dispersão sólida (1%, $7,94 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹).

Estimativa de viabilidade celular: Foi utilizado o método do MTT-Formazan (Sigma-Aldrich™-USA), após tratamento com F-127/ERIDEC/AM (20h) na presença e ausência de fotoestimulação. As leituras de absorbância foram realizadas em 540nm.

Ensaio Clonogênicos: Células foram semeadas em placas de 6 poços (400 células/poço). Avaliou-se a formação de colônias após TFD e após tratamento crônico, por 7 dias, no escuro com F-127/ERIDEC/AM (EC30, EC50 e EC90). As imagens foram coletadas após fixação e coloração das colônias (mínimo de 50 células) e a quantificação foi realizada usando o software Image J.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra que os tratamentos (20h) com F-127/ERIDEC/AM no escuro levaram a uma pequena redução na viabilidade celular (~15%), em relação ao controle não tratado, enquanto o tratamento com micelas brancas não alterou a viabilidade celular de modo significativo, em relação ao grupo não tratado.

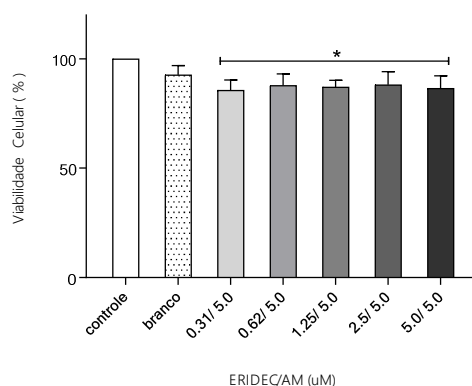


Figura 1. Viabilidade celular (ensaio MTT) de células Caco-2 tratadas com F-127/ERIDEC/AM no escuro, *p<0,05; ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni, em relação ao controle. (n=6)

Na Figura 2, as viabilidades obtidas com F-127/ERIDEC/AM imediatamente e 24 horas após TFD mostra reduções imediatas da viabilidade ($\sim 80\%$, ERIDEC $5\mu\text{M}$ /AM $5\mu\text{M}$), e efeitos mais expressivos após 24 horas da TFD ($\sim 95\%$), um indicativo que análises de viabilidade realizadas imediatamente após TFD em células em cultura, podem subestimar de modo relevante os resultados obtidos com esta técnica.

Na Figura 3, temos resultados obtidos de ensaios clonogênicos. A e C, mostram que a TFD reduziu a formação de colônias após tratamento com F-127/ERIDEC/AM por 20h. Em B e D, vemos que o tratamento por com F-127/ERIDEC/AM por 07 dias no escuro, também reduziu drasticamente o número de colônias de Caco-2.

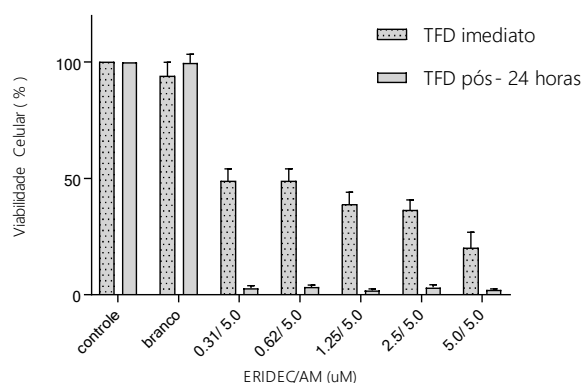


Figura 2. Viabilidade celular (ensaio MTT) de células Caco-2 tratadas com F-127/ERIDEC/AM imediatamente após TFD (20min, 24 J/cm^2) e após 24 horas, $*p < 0,05$; ANOVA, seguido de pós-teste Bonferroni. (n=7).

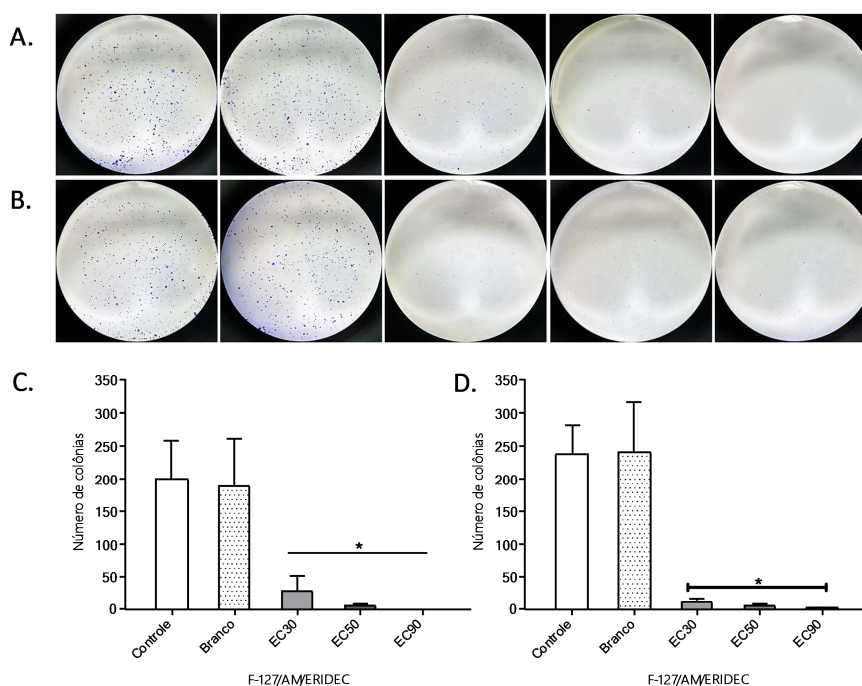


Figura 3. Tratamentos F-127/AM/ERIDEC na formação de colônias de Caco-2, pós TFD ou incubação crônica no escuro. * $p < 0,05$, ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni vs controle. (n=5-8).

CONCLUSÕES

Os dados indicam que o sistema F-127/ERIDEC/AM constitui um sistema fotossensibilizador promissor para a TFD e poderá ser alvo de futuros estudos sub-clínicos *in vitro* e *in vivo*, com vistas a aplicações futuras no tratamento do CCR.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). O aluno Lucas de Oliveira Moraes foi bolsista PIBIC/CNPq-FA-UEM.

REFERÊNCIAS

DE FREITAS, C. F.; CALORI, I. R.; DA SILVA, A. C. P.; CASTRO, L. V.; SATO, F.; PELLOSI, D. F.; TESSARO, A. L.; CAETANO, W.; HIOKA, N. PEG- coated vesicles from Pluronic/lipid mixtures for the carrying of photoactive erythrosine derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 530-544, Mar. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776518309123>. Acesso em: 11 de setembro de 2023.

DE OLIVEIRA SANTOS, M.; DE LIMA, F. C.; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P.; ALMEIDA, L. M.; CANCELA, M. C. Estimated cancer incidence in Brazil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e- 213700, Jan. 2023. Disponível em: <https://www.cancer.net/sites/cancer.net/files/art21-ingles.pdf>. Acesso em: 11 de setembro de 2023.

ROJAS, J.C.; BRUCHEY, A. K.; GONZALEZ-LIMA, F. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. **Progress in Neurobiology**, v. 96, n. 1, p. 32-45, Nov. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265679/>. Acesso em: 11 de setembro de 2023.