FOTOQUIMIOTERAPIA COMBINADA DE NANOPARTÍCLAS DE HIPERICINA COM CISPLATINA PARA O ADENOCARCINOMA CERVICAL

Laura Beatriz Marques Martins (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Carolina Vieira de Oliveira, Renato Sonchini Gonçalves, Wilker Caetano, Lucimara Rodrigues Carobeli (Coorientadora), Marcia Edilaine Lopes Consolaro (Orientadora). E-mail: ra122934@uem.br.

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

Farmácia - Análise Toxicológica
Palavras-chave: terapia fotodinâmica; câncer cervical; quimioterapia.

RESUMO

O adenocarcinoma cervical é o segundo tipo mais comum de neoplasia maligna do colo do útero e apesar de mais agressivo, não existe um protocolo de tratamento específico para este câncer. O uso da combinação entre quimioterapia a base de cisplatina e terapia fotodinâmica (TFD) com hipericina (HIP) representa uma alternativa para aumentar a taxa de sucesso do tratamento e reduzir efeitos adversos da quimioterapia. Neste trabalho, investigamos o efeito da fotoquimioterapia com HIP e cisplatina em células derivadas de adenocarcinoma cervical em comparação com uma linhagem celular não tumorigênica. Para isso, avaliamos a internalização, viabilidade e morfologia celular após os tratamentos. Os resultados obtidos demonstram que a HIP é internalizada seletivamente em células de adenocarcinoma endocervical e que o tratamento em combinação tem maior capacidade de reduzir a viabilidade celular e induzir alterações morfológicas nas células tumorais, quando comparado a TFD e a cisplatina separadamente. Portanto, essa estratégia de combinação pode ser uma alternativa promissora para o tratamento do adenocarcinoma cervical.

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma cervical acomete as células colunares do epitélio endocervical e está associado principalmente à infecção persistente pelo *Papillomavirus* humano (HPV) 18. Sua prevalência tem aumentado entre mulheres jovens e costuma ser mais agressivo do que outros tipos de câncer cervical. Apesar disso, não há um protocolo de tratamento específico para o adenocarcinoma cervical (STOLNICU; HOANG E SOSLOW, 2019). Um dos quimioterápicos mais usados para o tratamento do câncer cervical é a cisplatina, entretanto seus efeitos colaterais são diversos. Seu uso combinado com a terapia fotodinâmica (TFD) poderia maximizar os resultados terapêuticos e diminuir os efeitos colaterais. A hipericina (HIP) tem sido considerada um excelente fotossensibilizador para a TFD pois produz altas taxas de oxigênio singlete e se acumula preferencialmente em tecidos neoplásicos (DAMKE~~amke~~ et al., 2020). Entretanto, a HIP apresenta baixa solubilidade em água, o que limita suas

aplicações farmacológicas. Diante disso, os sistemas de administração de medicamentos permitem uma entrega aprimorada do agente fotossensibilizador com a vantagem de serem sistemas biocompatíveis e estáveis. Neste trabalho, avaliamos a fotoquimioterapia baseada na administração simultânea de hipericina nanoencapsulada em plurônico P123 (HIP/P123) e cisplatina frente a células derivadas do adenocarcinoma cervical.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens celulares e condições de cultura
As linhagens celulares HeLa (adenocarcinoma do colo uterino, positiva para HPV-18) e HaCaT (células epiteliais humanas espontaneamente imortalizadas) foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO_2, em frascos com meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina e anfotericina B.

Internalização celular
As células HeLa e HaCaT ($1,5\times10^5$ células/mL) foram expostas a 1 µmol/L de HIP/P123 por 30 min, 1h30 e 3h no escuro. A fluorescência emitida pela HIP nas células foi observada em microscópio de fluorescência invertido com filtro RFP.

Avaliação da morfologia celular
As células HeLa e HaCaT ($1,5\times10^5$ células/mL) foram tratadas com HIP/P123 (2,5 µmol/L) e/ou cisplatina (2,5 µmol/L) por 3h e iluminadas por 15 min. Células não tratadas foram utilizadas como controle. O crescimento, a aderência e a morfologia celular foram observadas em microscópio invertido.

Citotoxicidade e fototoxicidade
As linhagens celulares ($2,5x10^5$ células/mL) receberam diferentes tratamentos diluídos em DMEM: HIP/P123 (0,5, 2,5 e 12,5 µmol/L); cisplatina (2,5, 12,5 e 62,5 µmol/L); combinação de HIP/P123 (2.5 µM/L) e cisplatina (2,5, 12,5 e 62,5 µmol/L) por 3h no escuro, para avaliação da citotoxicidade. Para avaliar a fototoxicidade, após incubação nas mesmas condições, as células foram expostas à luz (450 a 750 nm, 6,3 J/cm^2) por 15 min. Células apenas com DMEM foram utilizadas como controle 100% viável. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada pelo teste t-Student, utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A HIP/P123 começou a ser internalizada nas células HeLa com 30 min de exposição, e a maior fluorescência ocorreu após 3h (Figura 1). O mesmo ocorreu nas células HaCaT, mas com menor intensidade (Figura 2). Assim, foi possível

constatar o caráter seletivo pela internalização mais eficaz da HIP/P123 nas células tumorais e o tempo de 3h foi escolhido para os próximos ensaios.

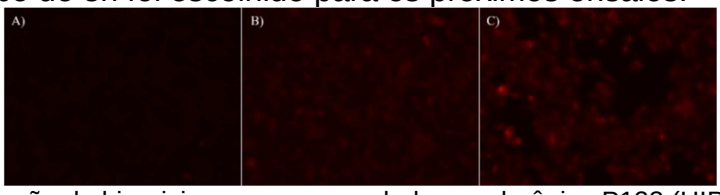

Figura 1 - Internalização da hipericina nanoencapsulada em plurônico P123 (HIP/P123) na linhagem celular HeLa nos tempos de (A) 30 min, (B) 1h30, (C) 3 h (Filtro RFP, objetiva de 20x).

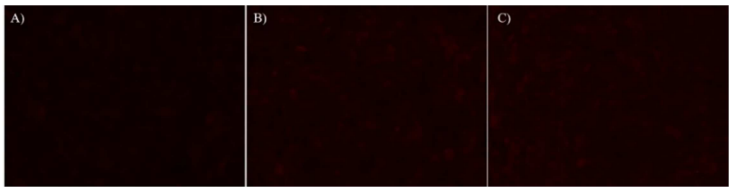

Figura 2 - Internalização da hipericina nanoencapsulada em plurônico P123 (HIP/P123) na linhagem celular HaCaT nos tempos de (A) 30 min, (B) 1h30, (C) 3 h (Filtro RFP, objetiva de 20x).

A avaliação da morfologia celular demonstrou que após o tratamento combinado com TFD e cisplatina ocorreu maior descolamento das células da placa de cultivo e a presença de células com aparência que remete à apoptose. Tais alterações foram mais frequentes no tratamento em combinação do que nos tratamentos isolados e ainda, danos mais expressivos foram vistos nas células HeLa (Figura 3) em comparação a HaCaT (Figura 4).

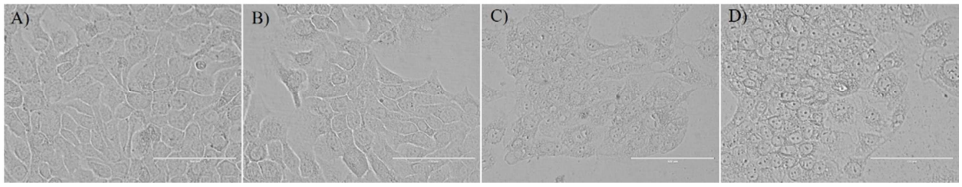

Figura 3 - Morfologia de células HeLa não tratadas (A), tratadas com cisplatina (B), terapia fotodinâmica com HIP/P123 (C) e a combinação de ambos (D). Objetiva de 40x.

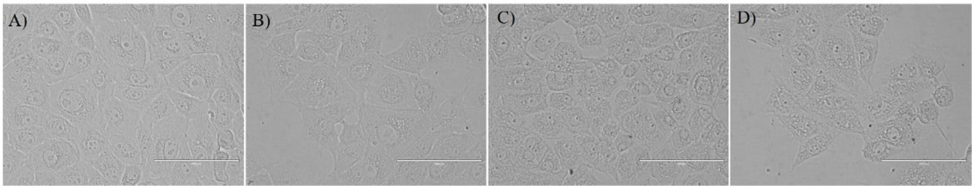

Figura 4 - Morfologia de células HaCaT não tratadas (A), tratadas com cisplatina (B), terapia fotodinâmica com HIP/P123 (C) e a combinação de ambos (D). Objetiva de 40x.

A cisplatina sozinha teve efeito limitado em todas as concentrações testadas, o que condiz com as altas taxas de insucesso no tratamento com este quimioterápico, que requer altas doses e longos tempos de exposição (Figuras 5 e 6). Já no tratamento em combinação houve efeito sinérgico, com redução da viabilidade da linhagem HeLa a 5% já com a menor concentração de cisplatina testada (Figura 5), o que indica que essa estratégia pode permitir o uso de doses menores do quimioterápico

e assim reduzir seus efeitos adversos. Nos testes com HaCaT, apesar da combinação também afetar a viabilidade, permaneceram mais de 20% de células viáveis (Figura 6).

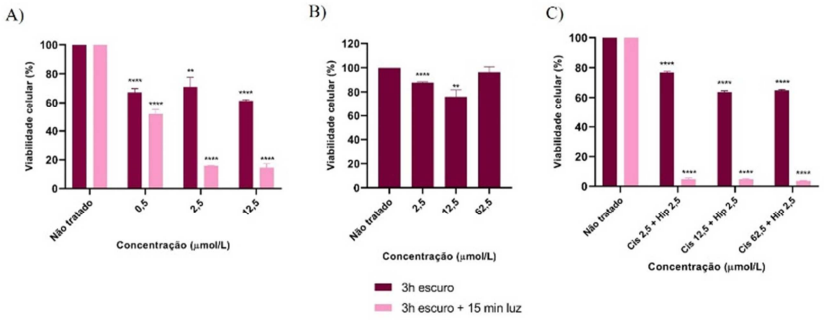

Figura 5 - Viabilidade de células HeLa tratadas com HIP/P123 com e sem iluminação (A), Cisplatina (B), e a combinação ambas (C) em diferentes concentrações. Resultados expressos em média ± desvio padrão, ****p<0.0001, **p<0.001.

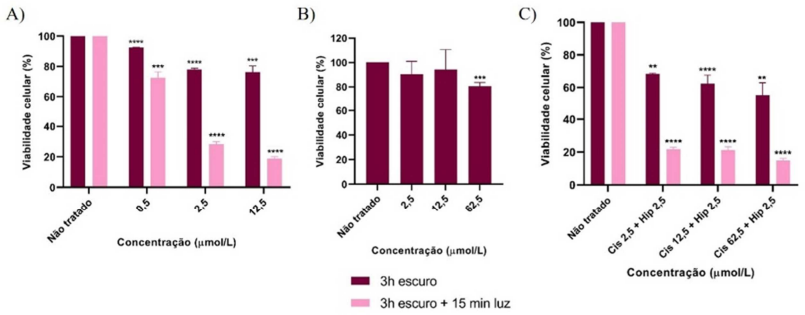

Figura 6 - Viabilidade de células HaCaT tratadas com HIP/P123 com e sem iluminação (A), Cisplatina (B), e a combinação ambas (C) em diferentes concentrações. Resultados expressos em média ± desvio padrão, ****p<0.0001, ***p=0.0003, **p<0.001.

CONCLUSÕES

A combinação entre cisplatina e TFD com HIP demonstrou maior eficácia, seletividade por células neoplásicas e redução da dose do quimioterápico, podendo se refletir em diminuição de efeitos colaterais. Estes resultados promissores apontam a necessidade de mais estudos *in vitro* e *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) em parceria com a Fundação Araucária (FA) pela bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

DAMKE, G. M. Z. F. et al. Selective photodynamic effects on cervical cancer cells provided by P123 Pluronic®-based nanoparticles modulating hypericin delivery. **Life Sci,** 255, 117858, 2020.

STOLNICU, S.; HOANG, L.; SOSLOW, R. Recent advances in invasive adenocarcinoma of the cervix. **Virchows Arch**, 475(5):537, 2019.