

EFEITOS FOTODINÂMICOS E ANTITUMORAIS DO CORANTE FENOTIAZÍNICO AZURE A EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA COLORRETAL HUMANO DA LINHAGEM CACO-2.

Adrielle Watanabe Sanchez (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Amanda Gratão Silvestrin, Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali (Orientadora). E-mail: mibrspeziali@uem.br;

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/ Fisiologia Geral

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; câncer colorretal; nanocarreadores.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica pouco invasiva, de ação localizada, obtida pela ativação de uma droga fotossensibilizante por luz de comprimento de onda adequado ao seu espectro de absorção. A TFD tem sido proposta como adjuvante no tratamento de câncer. Neste estudo, avaliamos efeitos fotodinâmicos *in vitro* do corante fenotiazínico Azure A (AA) formulado em dois tipos de sistema nanocarreador, um constituído por micelas de copolímero do tipo plurônicos F-127 e outro por lipossomos mistos, compostos por dipalmitoilfosfatidilcolina e plurônicos F-127. O modelo experimental utilizado foi o de cultura de células adenocarcinoma colorretal humano, Caco-2. Os resultados mostraram uma boa eficiência do AA como fotossensibilizador na TFD, sendo que o sistema composto por lipossomos mistos produziu melhores resultados que o micelar, em ensaios realizados agudamente, logo após a TFD. A comparação dos efeitos imediatos e tardios na viabilidade utilizando o sistema micelar mostrou, como esperado, resultados mais proeminentes após 24 horas da fotoativação. O tratamento com AA no escuro, utilizando o sistema micelar, causou uma pequena diminuição da viabilidade celular na maior concentração avaliada, enquanto o tratamento com AA em formulação lipossomal reduziu de modo importante a viabilidade de Caco-2 no escuro, mesmo em concentrações menores. Os dados apontam para uma maior eficiência do sistema nanocarreador constituído por lipossomos mistos na entrega do corante AA para aplicação na TFD. Porém, a redução de viabilidade independente de luz causada pelo tratamento com AA formulado em sistema lipossomal misto pode representar uma desvantagem.

INTRODUÇÃO

No Brasil, excluindo-se o câncer de pele não melanoma, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro em incidência para ambos os sexos (De Oliveira Santos *et al.*, 2023). A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma opção promissora de tratamento contra o câncer, necessitando de três componentes: um fotossensibilizador, uma fonte de luz e a presença de oxigênio molecular. A TFD envolve a ativação do fotossensibilizador por radiação visível, gerando espécies reativas de oxigênio e oxigênio singlete, que são citotóxicos às células. O corante fenotiazínico Azure A, pode ser considerado um bom candidato à fotossensibilizador da TFD, pois possui alto coeficiente de extinção molar (ϵ) e valores relativamente altos de rendimento quântico de oxigênio singlete em meio aquoso (Francisco *et al.*, 2017). Além disso, AA apresenta boa interação com os lipídios da membrana plasmática, sendo essa uma das principais estruturas celulares alvo lesionadas pela fotoestimulação na TFD (Misba e Khan, 2018).

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular

A linhagem Caco-2 (ATCC, USA) foi cultivada em monocamada em estufa (CO₂-5%; 37°C), em frascos (25cm²) com DMEM- alto teor de glicose, suplementado com penicilina- estreptomicina (1%) e soro fetal bovino (20%).

Sistemas fotossensibilizadores

Micelas poliméricas de F-127 foram obtidas a partir da metodologia de dispersão sólida, com a solubilização do plurônico F-127 (1%, $7,94 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) em etanol. Na preparação de lipossomas unilamelares mistos (DPPC/F-127/AA) utilizou-se dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e plurônicos F-127 (0.10% w/v de F127 em DPPC), pelo método do filme fino. AA foi incorporado por método passivo, após hidratação do filme fino, seguido de sonicação.

Estimativa de viabilidade celular e estatística

Utilizamos o método do MTT-Formazan, após tratamento com F-127/AA ou DPPC/F-127/AA (20h), na presença e ausência de fotoestimulação. Testes de viabilidade foram realizados em dois tempos: imediatamente após TFD (tratamentos F-127/AA e DPPC/F-127/AA) e 24 horas após TFD (F-127/AA). Controles não tratados e tratados com sistemas livres de AA (brancos) foram realizados em todos os

experimentos. As comparações entre os grupos tratados com F-127/AA e controles não tratados foi realizada utilizando teste de normalidade, seguido de teste para amostras paramétricas ANOVA (3 grupos ou mais independentes) e pós-teste de Bonferroni. A comparação entre os tratamentos DPPC/F-127/AA e F-127/AA foi realizada por teste t de Student não pareado. O nível de significância adotado foi de 95% (IBM SPSS Statistics 2.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1A apresenta as viabilidades de células Caco-2 tratadas com diferentes concentrações de F-127/AA obtidas imediatamente após TFD, em comparação com células mantidas no escuro. Apenas o tratamento com a maior concentração (5.0 μM) reduziu a viabilidade celular após TFD, em relação ao controle não tratado. No escuro, não houve reduções significativas da viabilidade. Por outro lado, na figura 1B, observamos que após 24 horas da realização de TFD, houve redução com tratamentos nas concentrações de 1,25; 2,5 e 5,0 μM . No escuro, a concentração mais alta causou discreta redução na viabilidade em ambos os tempos analisados. A maior redução da viabilidade apresentada após 24 horas da fotoativação pode ser explicada pela diferença de tempo entre os mecanismos que levam a morte celular: necrose, apoptose e autofagia. A necrose ocorre logo após a TFD devido à lesão imediata gerada na membrana celular, enquanto apoptose e autofagia ocorrem por processos mais lentos de ativações enzimáticas por fatores intrínsecos e extrínsecos. (AGOSTINIS *et al.*, 2011)

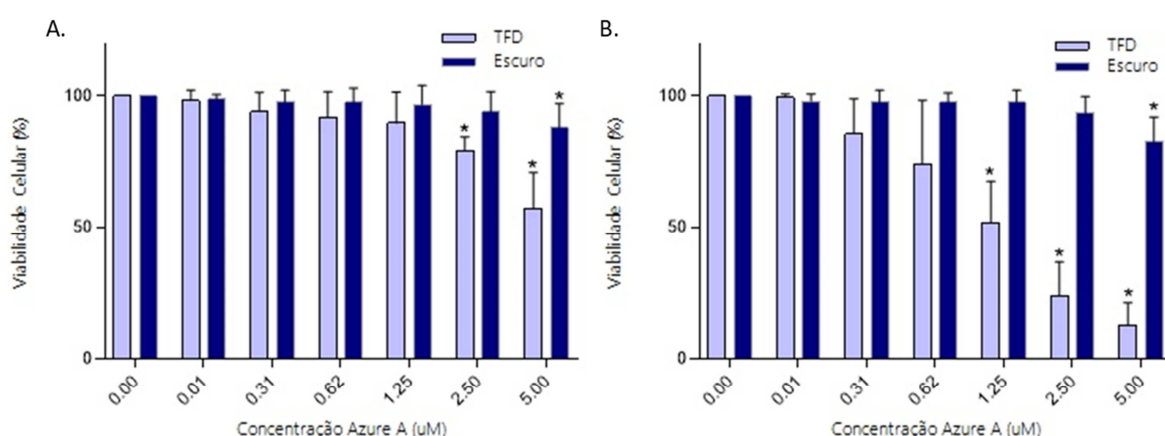


Figura 1 - Em A, efeitos dos tratamentos com F-127/AA (0,31; 0,62; 1,25; 2,5; e 5,0 μM , por 20h, na viabilidade (MTT) de células Caco-2, imediatamente após fotoativação (24 J/cm², 20min) e em células

mantidas no escuro. Em B, viabilidade após 24 horas da TFD. Dados expressos como a média $\pm$ EPM da porcentagem relativa, adotando-se o controle não tratado como 100% de viabilidade. * significativo em relação ao controle não tratado ($p < 0,05$), $n = 5$

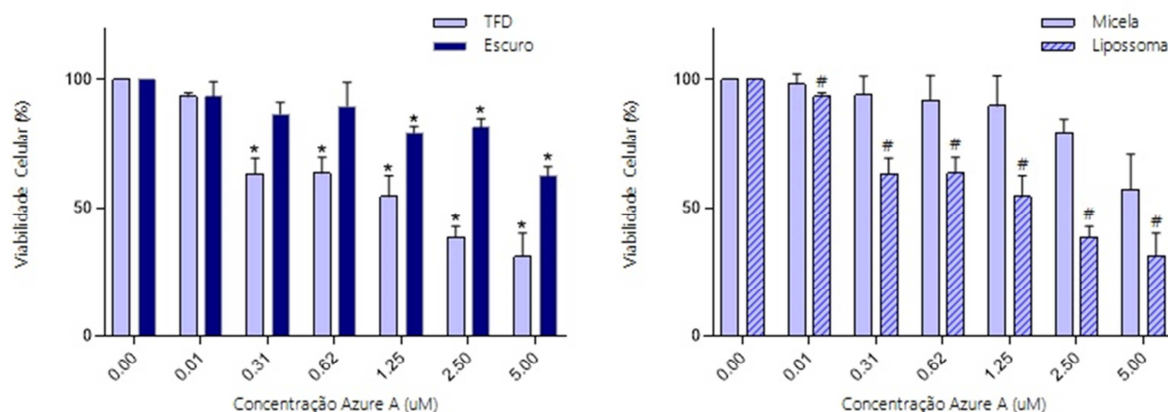


Figura 2 - Em A, efeitos dos tratamentos com DPPC/F-127/AA (0,31; 0,62; 1,25; 2,5; e 5,0 μ M, por 20h, na viabilidade (MTT) de células Caco-2, imediatamente após fotoativação (24 J/cm², 20min) e em células mantidas no escuro ($n=3$). Em B, comparação das viabilidades imediatamente após TFD (24 J/cm², 20min) em células tratadas com F-127/AA versus tratadas com DPPC/F-127 nas mesmas concentrações. Dados expressos como a média $\pm$ EPM da porcentagem relativa, adotando-se o controle não tratado como 100% de viabilidade, * significativo em relação ao controle não tratado ($p < 0,05$). # significativo em relação ao tratamento com micela ($p < 0,05$), $n = 3-5$.

A figura 2A mostra resultados de viabilidade de células Caco-2 tratadas com DPPC/F-127/AA, em concentrações que variaram de 0,31 a 5,0 μ M, por 20h, obtidos imediatamente após TFD e de células mantidas no escuro. O tratamento com a formulação lipossomal mista de AA, causou reduções da viabilidade em todas as concentrações avaliadas, já imediatamente após TFD. Entretanto, a viabilidade também mostrou-se diminuída no escuro, para as concentrações de 1,25 a 5,0 μ M. De fato, efeitos independentes de fotoativação do AA já foram demonstrados e estão relacionados a ações inibitórias destes compostos sobre a atividade mitocondrial (DE SOUZA *et al*, 2021). Tais efeitos poderiam explicar a diminuição de viabilidade no escuro, considerando que a estimativa de viabilidade obtida pelo método MTT-Formazan baseia-se na redução enzimática do MTT a formazan, catalisada por desidrogenases mitocondriais. A figura 2B, mostra a comparação dos efeitos de F-127/AA e DPPC/F-127/AA, nas mesmas concentrações de AA. Como podemos observar, o uso do AA formulado em lipossomos mistos foi significativamente mais eficiente em reduzir a viabilidade de células Caco-2, ainda que imediatamente após a fotoativação. Isso se deve, provavelmente, a uma maior eficiência dos lipossomos em entregar o fotossensibilizador AA.

CONCLUSÕES

AA mostrou-se eficiente como fotossensibilizador na TFD, mas alterou a viabilidade no escuro. O tipo de nanocarreador afetou as ações do AA na viabilidade de Caco-2 na TFD e na ausência de luz, provavelmente devido a diferenças na entrega do AA.

AGRADECIMENTOS

CAPES; CNPq (Universal, 408561/2023-8). A. W. S. foi bolsista (PIBIC-CNPq).

REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.20114>. Acesso em: 28 ago. 2024.

DE OLIVEIRA SANTOS, M. *et al.* Estimated cancer incidence in Brazil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e- 213700, 2023. Disponível em: <https://www.cancer.net/sites/cancer.net/files/art21-ingles.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2024.

DE SOUZA, B. T. L. *et al.* The photosensitizer azure A disrupts mitochondrial bioenergetics through intrinsic and photodynamic effects. **Toxicology**, v. 455, p. 152766, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X21000895>. Acesso em: 28 ago. 2024.

FRANCISCO, C. M. L. *et al.* The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent. **New Journal of Chemistry**, v. 41, p. 14438-14443, 2017. DOI: 10.1039/c7nj02173a. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/nj/c7nj02173a>. Acesso em: 15 ago. 2024.

MISBA, L.; KHAN, A. U. Enhanced Photodynamic Therapy using Light Fractionation Against Streptococcus Mutans biofilm: Type I and type II Mechanism. **Future Microbiology**, v. 13, p. 437-454, 2018. DOI: 10.2217/fmb-2017-0207. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fmb-2017-0207>. Acesso em: 15 ago. 2024.