

ELUCIDAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA DE ALUMÍNIO-CLORO FRENTE AO CÂNCER CERVICAL

Izabele Marini Couto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Bruno Valeze, Wilker Caetano, Lucimara Rodrigues Carobeli (Coorientadora), Marcia Edilaine Lopes Consolaro (Orientadora).

E-mail: ra129503@uem.br

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

Farmácia - Análise Toxicológica

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; câncer cervical; ftalocianinas.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas é o subtipo de câncer cervical mais frequente, representando 70% do total de casos. Os tratamentos atuais apresentam baixa eficácia e causam efeitos colaterais sistêmicos, o que reforça a necessidade de alternativas mais seletivas e menos invasivas. A terapia fotodinâmica (TFD) com a ftalocianina de alumínio-cloro (ALPcCl) é uma estratégia promissora e já demonstrou atividade fototóxica em células de câncer cervical; entretanto, seu mecanismo de ação ainda é incerto. Neste trabalho foram investigados os efeitos da TFD mediada por ALPcCl na migração, vias de morte celular e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) frente à linhagem de câncer cervical SiHa. Os resultados evidenciaram que a TFD com ALPcCl apresentou efeito antitumoral e antimetastático na linhagem celular humana de câncer escamoso SiHa, atuando por diferentes mecanismos como produção de EROs, indução de apoptose e inibição da migração celular. Esses achados reforçam o potencial da TFD com ALPcCl como uma estratégia antitumoral promissora para o câncer cervical de células escamosas.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o terceiro tipo de câncer mais frequente em mulheres no Brasil (INCA, 2023). Entre seus subtipos, o carcinoma de células escamosas é o mais comum, e está associado à infecção persistente pelos tipos de alto risco oncogênico de *Papillomavirus humano* (HPV), principalmente o HPV16 (Okunade, 2020). O tratamento envolve cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Entretanto, estes métodos nem sempre são efetivos, além de causarem efeitos adversos sistêmicos. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) é uma alternativa promissora, pois utiliza fotossensibilizadores (FS) e luz em comprimento de onda específico para induzir seletivamente a morte celular tumoral. Entre os fFS, as ftalocianinas se destacam pela boa penetração tecidual e alta eficiência na geração de oxigênio singlete (Carobeli et al. 2021). Este estudo avaliou os mecanismos de ação da TFD com ftalocianina de alumínio-cloro (ALPcCl) na linhagem humana de câncer cervical escamoso SiHa (HPV 16 positiva). Foram investigados os efeitos na migração, via de morte celular e espécies reativas de oxigênio, visando elucidar a atividade de nova e promissora alternativa para o tratamento do carcinoma de células escamosas

cervicais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem celular e tratamento fotodinâmico

Células SiHa, derivadas de carcinoma de células escamosas cervicais humano e positivas para HPV16, foram expostas a 3,6 $\mu\text{mol/L}$ ou 14 $\mu\text{mol/L}$ de AIPcCl por 2 h no escuro e irradiadas por 20 min com uma fonte de luz vermelha (600-750 nm). Células expostas apenas ao meio de cultura (DMEM) foram utilizadas como controle não tratado (NT).

Deteção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de EROs foi avaliada pela conversão do corante H2DCFDA em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Após o tratamento, 20 μM de H2DCFDA foram adicionados por 15 min, e quantificada pela fluorescência celular total corrigida (CTCF). Células tratadas com peróxido de hidrogênio foram usadas como controle positivo. (Damke et al. 2020).

Avaliação da via de morte celular

Após tratamento, realizou-se a marcação celular com Anexina V, indicador de morte por apoptose, e Iodeto de Propídeo (PI), indicador de morte por necrose. As células foram analisadas por citometria de fluxo (Damke et al. 2020).

Ensaio de migração celular – Teste da Ferida

A monocamada confluenta de células SiHa foi lesionada com ponteira de 1000 μL , e após os tratamentos, a migração celular foi monitorada em microscópio comum invertido (EVOS® FL, Life Technologies, USA) por 24, 48 e 72 h (Damke et al. 2020).

Análises estatísticas

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.0 para aplicar o teste ANOVA seguido de Tukey-Kramer ($p < 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o objetivo de avaliar os mecanismos de ação da TFD com AIPcCl, foi inicialmente realizado o experimento de detecção de EROs, já que este é um dos principais meios de indução de dano celular promovido pela TFD. As células tratadas apresentaram fluorescência correspondente à formação de EROs, tanto em 3,6 $\mu\text{mol/L}$ quanto 14 $\mu\text{mol/L}$ da AIPcCl, de maneira semelhante ao controle positivo (Figura 1A). A análise quantitativa mostrou o aumento da geração de EROs de maneira dependente ao aumento da concentração de AIPcCl (Figura 1B).

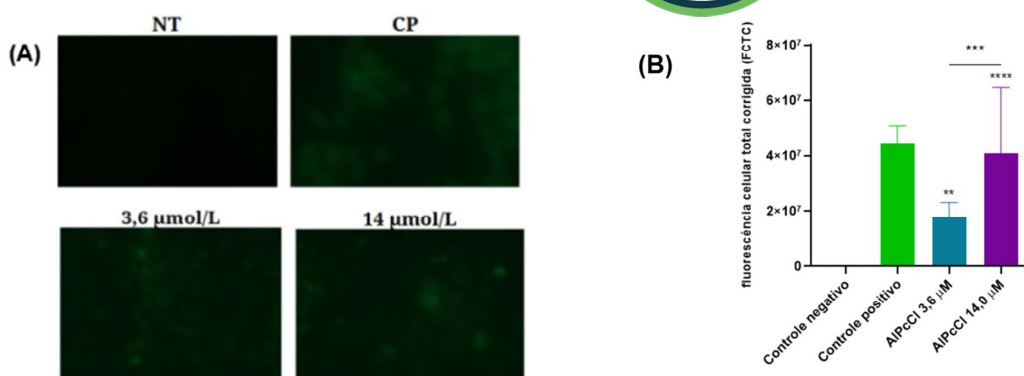


Figura 1. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após TFD com AIPcCl em células SiHa. **(A)** Células não tratadas (NT), controle positivo (CP) e células tratadas com 3,6 e 14 µM de AIPcCl. Objetiva de 40x. **(B)** Quantificação de EROs determinada por meio da medida da fluorescência celular total corrigida (CTCF). ** $p=0,0062$; *** $p=0,0002$ e **** $p<0,0001$ comparado ao NT.

A avaliação da via de morte celular por meio de citometria de fluxo com os marcadores anexina V (apoptose) e PI (necrose) indicou que a apoptose é a principal via de morte decorrente da TFD com AIPcCl (Figura 2A e B), com aproximadamente 30% das células com marcação positiva para Anexina V e 20% para Anexina V e PI (Figura 2B).

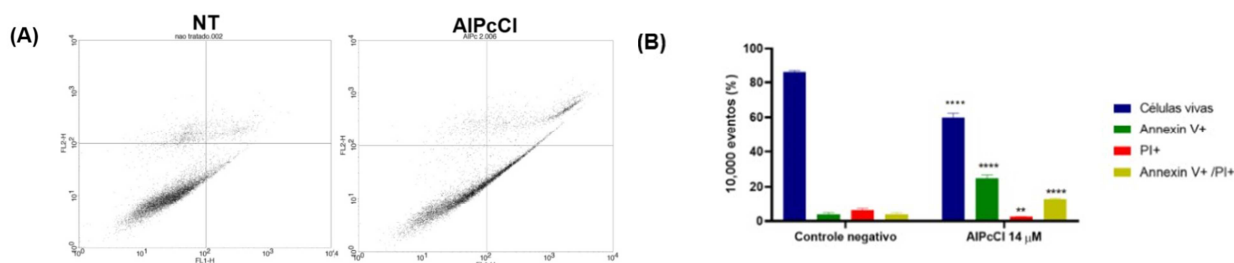


Figura 2. Análise da via de morte celular em células SiHa após TFD com AIPcCl. **(A)** Representação da intensidade da fluorescência de Annexin V-FITC no eixo X e a fluorescência de PI no eixo Y. **(B)** Porcentagem de células vivas, células em apoptose inicial (Annexin V+), apoptose tardia (Annexin V+/PI+) e necrose (PI+); ** $p=0,0027$; **** $p<0,0001$ em comparação ao grupo não tratado.

No ensaio de migração celular (Figura 3A, B), o grupo NT apresentou fechamento progressivo da ferida ao longo do tempo, alcançando aproximadamente 35% de fechamento após 72 horas. A TFD com AIPcCl, na concentração de 3,6 µmol/L, reduziu significativamente a migração celular em todos os tempos analisados, apresentando valores próximos de 10% de fechamento da ferida em 72 horas. Na concentração de 14 µmol/L, a TFD com AIPcCl inibiu de forma marcante a migração celular, evidenciada pela ausência de fechamento da ferida em até 72 horas. Assim, a TFD com AIPcCl parece inibir a capacidade migratória das células SiHa de maneira dependente do aumento da concentração do FS, sugerindo um efeito antimetastático.

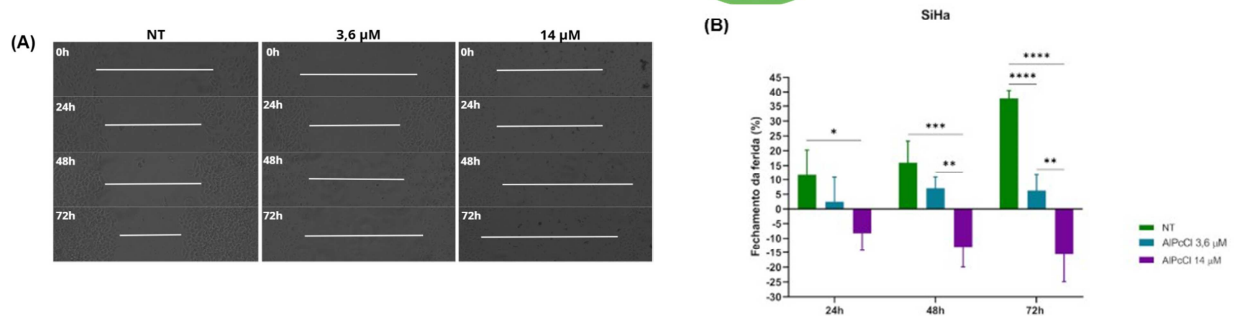


Figura 3. Análise da migração em células SiHa após a TFD com AIPcCl. **(A)** Células não tratadas (NT) e células tratadas com 3,6 e 14 µM de AIPcCl, acompanhadas ao longo de 72 h. Objetiva de 10x. **(B)** Porcentagem de fechamento da ferida. * $p=0,0158$; ** $p=0,0018$; *** $p=0,0002$; **** $p<0,0001$ comparado ao NT.

CONCLUSÕES

A TFD com AIPcCl apresentou efeito antitumoral e antimetastático na linhagem celular humana de câncer escamoso SiHa, atuando por diferentes mecanismos como produção de EROs, indução de apoptose e inibição da migração celular. Esses achados reforçam o potencial da TFD com AIPcCl como uma estratégia antitumoral promissora para o câncer cervical de células escamosas.

AGRADECIMENTOS

À UEM, ao LabCito e ao CNPq pelo apoio por meio da bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estatísticas de câncer: atualizado em 2023. **INCA**, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>. Acesso em: 15 ago. 2025.
- OKUNADE, K. S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 40, n. 5, p. 602–608, 10 set. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31500479/>. DOI: 10.1080/01443615.2019.1634030. Acesso em: 15 ago. 2025.
- CAROBELI, L.R. et al. Phthalocyanine and Its Formulations: A Promising Photosensitizer for Cervical Cancer Phototherapy. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2057–2057, 2 dez. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8705941/>. DOI:10.3390/pharmaceutics13122057. Acesso em: 15 ago. 2025.
- 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**, v. 255, p. 117858, 15 ago. 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117858. Acesso em: 15 ago. 2025.