ATIVIDADE ANTITUMORAL DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA DE ALUMÍNIO-CLORO EM MODELO 3D DE CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS

Guilherme Antônio Zanoni Rodrigues (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Izabele Marini Couto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Beatriz Camillo Santos, Wilker Caetano, Lucimara Rodrigues Carobeli (Coorientador), Marcia Edilaine Lopes Consolaro (Orientador). E-mail: ra139129@uem.br.

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

Área: 40300005 - Farmácia: 40303004 - Análise Toxicológica

Palavras-chave: Esferoides 3D; Ftalocianina de alumínio-cloro; Câncer cervical.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas é o principal subtipo histológico do câncer cervical e está associado principalmente à infecção persistente pelo *papilomavírus humano* (HPV). A terapia fotodinâmica (TFD) utiliza um fotossensibilizador (FS), ativado por luz de comprimento de onda específico, para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e promover danos às células tumorais. Estudos prévios com ftalocianina de alumínio-cloro (AlPcCl) demonstraram atividade antitumoral em células da linhagem SiHa (HPV 16-positiva) cultivadas em modelos 2D. Entretanto, esses modelos não reproduzem adequadamente o microambiente tumoral. Assim, este estudo avaliou a atividade da TFD com AlPcCl em esferoides 3D da linhagem SiHa. Inicialmente, foram testadas diferentes técnicas para formação dos esferoides e, após ajustes, estabeleceu-se um protocolo baseado em agarose e colágeno tipo I. Os esferoides foram tratados com diferentes concentrações de AlPcCl, permanecendo por 2 ou 24 horas no escuro e posteriormente sendo iluminados por 20 ou 40 minutos com luz vermelha (600–750 nm). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de resazurina. Houve redução da viabilidade após a iluminação, com efeito mais evidente após 24 horas de incubação e 40 minutos de iluminação. Entretanto, também foi observada redução da viabilidade nos grupos mantidos no escuro e no controle com dimetilsulfóxido (DMSO), indicando possível efeito citotóxico da AlPcCl e influência do veículo. Os resultados demonstram atividade fototóxica da AlPcCl em esferoides de SiHa e indicam a necessidade de novos ajustes experimentais

INTRODUÇÃO

O câncer cervical constitui importante problema de saúde pública, sendo o carcinoma de células escamosas seu principal subtipo histológico. A doença apresenta forte associação com a infecção persistente por tipos oncogênicos do papilomavírus humano (HPV), especialmente o HPV16 (OKUNADE, 2020).

A TFD apresenta-se como uma alternativa terapêutica promissora. Nessa abordagem, um agente fotossensibilizador (FS) é ativado por luz e, na presença de oxigênio, promove a formação de EROs, capazes de causar danos celulares. Entre os FS estudados, as ftalocianinas apresentam características favoráveis para aplicação em fototerapia, incluindo absorção de luz na região do vermelho e capacidade de geração de espécies reativas (CAROBELI et al., 2021).
Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram efeito antitumoral da AlPcCl em linhagem celular humana de câncer cervical escamos HPV16-positiva (SiHa), com aumento de EROs, indução de apoptose e redução da migração celular. Entretanto, modelos 2D apresentam limitações para representar a organização e as interações presentes nos tumores sólidos. Os esferoides 3D permitem maior interação célula-célula e formação de gradientes de nutrientes, oxigênio e distribuição de agentes terapêuticos, aproximando-se das características do microambiente tumoral (HABANJAR et al., 2021).
Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade da TFD com AlPcCl em esferoides da linhagem SiHa e estabelecer condições experimentais para investigação de sua citotoxicidade e fototoxicidade**.**

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagem celular e formação dos esferoides

As células SiHa foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina-estreptomicina e anfotericina B, a 37 °C e 5% de CO□.
Inicialmente, foram testadas as técnicas de gota suspensa e sobreposição líquida para a formação de esferóides. Como não foram obtidos esferoides compactos e estáveis, o protocolo foi ajustado. Placas de 96 poços com fundo em U foram revestidas com agarose a 1,5% e receberam 1 × 10^5 células SiHa em 100 µL de meio. As placas foram centrifugadas e após 24 h foi adicionado colágeno tipo I (3 µg/mL), seguido de nova centrifugação. Os esferoides foram mantidos a 37 °C e 5% de CO□ e acompanhados por microscopia óptica comum.

Tratamento e avaliação da viabilidade

Os esferoides foram tratados com AlPcCl nas concentrações de 0,9 a 56 µM, preparadas a partir de solução estoque em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram avaliados períodos de 2 e 24 horas no escuro, seguidos de 20 ou 40 minutos de iluminação com luz vermelha (600–750 nm). Foram utilizados grupos controle sem tratamento e contendo DMSO.
A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de resazurina após 24 horas de incubação. Os resultados foram expressos como porcentagem de células vivas em relação ao controle. As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 8.0, utilizando teste t de Student não pareado, considerando-se $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas inicialmente testadas não produziram estruturas 3D compactas. Após a utilização de agarose e colágeno tipo I, foram obtidos esferoides compactos e estáveis entre o quarto e o sexto dia de cultivo, permitindo o estabelecimento do modelo 3D de células SiHa (Figura 1).

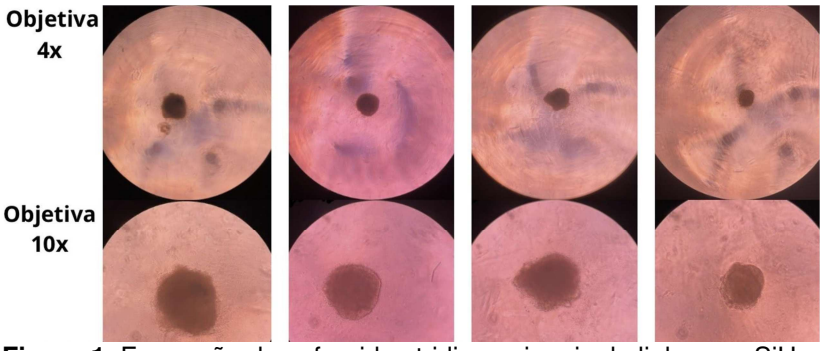


Figura 1. Formação de esferoides tridimensionais da linhagem SiHa pela técnica de sobreposição líquida com adição de colágeno tipo I. Imagens obtidas por microscopia óptica invertida.

Após a padronização do modelo, foram avaliadas 4 condições de tratamento, combinando 2 ou 24 horas de incubação no escuro com 20 ou 40 minutos de iluminação (Figura 2). Nos experimentos com 2 horas de incubação no escuro antes da iluminação, foi observada redução da viabilidade em diferentes concentrações de AlPcCl. Com 20 e 40 minutos de luz (Figura 2 A e B, respectivamente), a viabilidade reduziu para cerca de 60-70% com 56 µM de AlPcCl.

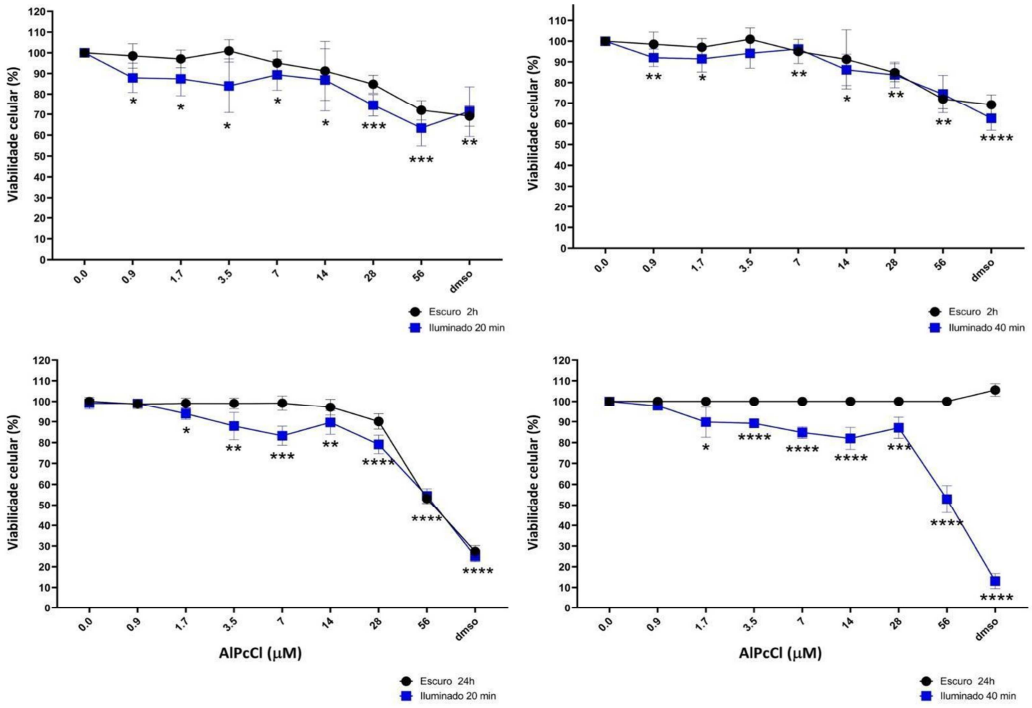


Figura 2. Viabilidade celular dos esferoides de células SiHa após tratamento com diferentes concentrações de AlPcCl. Os gráficos representam as condições de (A) 2 h no escuro + 20 min de

iluminação, (B) 2 h no escuro + 40 min de iluminação, (C) 24 h no escuro + 20 min de iluminação e (D) 24 h no escuro + 40 min de iluminação. Dados expressos como média ± desvio padrão.

Nos experimentos com incubação de 24 horas no escuro antes da iluminação, ocorreu redução mais acentuada da viabilidade principalmente após a exposição à luz. Após 20 minutos de iluminação, a viabilidade foi aproximadamente 55% na concentração de 56 µM. Com 40 minutos de luz, a viabilidade foi reduzida a aproximadamente 50% em 56 µM (Figura 2 C e D, respectivamente).
De modo geral, os resultados indicam que a exposição à luz potencializou a redução da viabilidade dos esferoides tratados com AlPcCl, especialmente após 24 horas de incubação e 40 minutos de iluminação, caracterizando efeito fototóxico.
A comparação entre os períodos de incubação sugere que o aumento do tempo de incubação pode favorecer o efeito fototóxico, embora esse padrão não tenha sido uniforme entre todas as condições. Entretanto, a redução da viabilidade também foi observada em algumas condições nos grupos mantidos no escuro, demonstrando que parte do efeito pode ocorrer independentemente da ativação luminosa. Além disso, a expressiva morte celular observada nos grupos contendo somente DMSO (controle não tratado) indica influência do veículo sobre a viabilidade celular. Assim, embora os resultados demonstrem atividade fototóxica da AlPcCl, não é possível atribuir toda a redução observada exclusivamente à TFD.
Esses achados reforçam a importância dos modelos 3D para avaliação de tratamentos antitumorais, uma vez que a organização dos esferoides pode modificar a distribuição do FS e a resposta celular. Novos experimentos são necessários para definir concentrações e condições de incubação que reduzam os efeitos citotóxicos independentes da iluminação.

CONCLUSÕES

Foi estabelecido com sucesso um protocolo para formação de esferoides 3D de células SiHa utilizando agarose e colágeno tipo I. A AlPcCl apresentou efeito fototóxico após iluminação, mais evidente após 24 horas de incubação e 40 minutos de exposição à luz. Entretanto, os efeitos observados no escuro e nos grupos somente com DMSO indicam a necessidade de novos ajustes experimentais para melhor diferenciar a citotoxicidade da fototoxicidade do tratamento.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Laboratório de Citologia Clínica e Infecções Sexualmente Transmissíveis (LabCito) e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

CAROBELI, L. R. et al. Phthalocyanine and its formulations: a promising photosensitizer for cervical cancer phototherapy. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 12, p. 2057, 2021.

HABANJAR, O. et al. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 22, p. 12200, 2021.

OKUNADE, K. S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 40, n. 5, p. 602–608, 2020.