

ESTUDO DO POTENCIAL DE INDUÇÃO DE MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA DA TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA POR NANOEMULSÃO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA EM CÉLULAS MURINAS DE CÂNCER DE MAMA (4T1)

Victor Carlos Mello da Silva¹, Luis Alexandre Muehlmann ²

1. Graduando, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília

2. Professor Adjunto, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília

Resumo:

Células cancerosas tratadas com terapia fotodinâmica (TFD) podem liberar padrões moleculares associados a dano (DAMPs), e sofrer morte celular imunogênica. Este tipo de morte celular pode levar à ativação do sistema imunitário. Assim, o objetivo deste trabalho é verificar, se a TFD com nanoemulsão contendo ftalocianina (Ne-AIFtCl) induz morte celular imunogênica em células 4T1. Foi analisada a presença de DAMPs em células 4T1 tratadas com TFD com nanoemulsão de AIFtCl. E também foi observado o estresse oxidativo causado por ela. Houve aumento significativo da liberação de HMGB1 e IL1 beta em células cancerosas tratadas com TFD quando comparadas às não tratadas. Também foi possível observar, em células tratadas, a produção de espécies reativas de oxigênio. A presença de estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio, juntamente com a liberação de DAMPs, são indicativos de que o tratamento da TFD mediada pela Ne-AIFtCl pode promover morte celular imunogênica.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, estresse oxidativo, morte celular imunogênica

Apoio financeiro: CAPES, FAP-DF, CNPq

Introdução:

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Nos dados de mortalidade da Organização Mundial da Saúde em 2015, há uma estimativa de 84 milhões de mortes por câncer nos últimos 10 anos. (Travis et al., 2015) Ele se desenvolve em um processo de várias etapas, através das quais um evento iniciador conduz à proliferação celular desenfreada. Ao formar pequenas massas tumorais, o tecido saudável circundante é incapaz de competir com as células cancerosas para um fornecimento

adequado de nutrientes do sistema sanguíneo, podendo levar à apoptose e necrose das células normais, seguido por disfunção de órgãos e ocasionalmente à morte (Chen et al., 2015)

A combinação da remoção cirúrgica com quimioterapia, ou radioterapia é a estratégia comumente indicada para a maioria dos cânceres. Entretanto, a taxa de morbidade e mortalidade associada a essas terapias é bastante significativa. O que é explicada pela sua atuação em células normais, além das tumorais. O aumento da eficácia do tratamento está associada à capacidade de atingir seletivamente o tecido tumoral. (Steichen et al., 2013) A terapia fotodinâmica (TFD) tem se apresentado como uma alternativa segura e eficaz ao tratamento de diversos tipos de câncer. A sua eficácia decorre da indução direta de morte das células neoplásicas, da destruição da microvasculatura tumoral e do reforço da imunidade antitumoral. (Garg & Agostinis, 2014)

A terapia fotodinâmica (TFD) pode induzir morte celular imunogênica (MCI), evento que pode ser usado para ativar o sistema imunitário contra antígenos tumorais, levando eventualmente à eliminação tanto do tumor primário tratado com a TFD quanto de focos metastáticos (Garg & Agostinis, 2014). A MCI é caracterizada pela ocorrência de apoptose seguida da exposição e/ou liberação, de padrões moleculares associados a dano (DAMP), como calreticulina, HMGB1 e proteínas de choque térmico (Verfaillie et al., 2012; Kepp et al., 2009)

Assim, o objetivo deste trabalho é verificar, *in vitro*, se a TFD com nanoemulsão de AIFtCl induz morte celular imunogênica em células 4T1, analisando pelo método de ELISA a presença de DAMPs em células 4T1 tratadas.

Além de observar a indução de estresse oxidativo, por microscopia de fluorescência.

Metodologia:

Inicialmente foram plaqueadas células 4T1 em placas de 96 poços na concentração de 1000 células por poço. As células plaqueadas foram submetidas ao tratamento com nanoemulsão de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl). No tratamento, as células foram expostas à NE-AIFtCl em seis diferentes tempos de exposição, em suas respectivas CC50%, concentrações encontradas em testes de viabilidade celular (MTT). As placas foram irradiadas durante 15 minutos na fluência de 25,88 j/cm².

Análise do Perfil de liberação de IL1 β

Após tratadas, como descrito anteriormente, foi analisado o perfil de Liberação de IL1 β pelo método ELISA. Após 24 horas do tratamento, foram adicionados os padrões, amostras e controles nos seus respectivos poços de uma placa para ELISA, previamente revestidos com um anticorpo monoclonal específico para IL1 β . Logo em seguida, adicionou-se o anticorpo policlonal conjugado com biotina, e então, a placa foi incubada por 2 horas. Terminando o tempo, a placa foi lavada com PBS 4 vezes. Em seguida adicionou-se a avidina conjugada com peroxidase. Após 30 minutos, lavou-se novamente a placa 4 vezes com PBS e então foi adicionada a cada poço uma solução do cromógeno. Assim, apenas os poços contendo IL1 β , o anticorpo conjugado com biotina e a avidina conjugada com a peroxidase tiveram alteração na cor. Por fim foi feita a leitura da absorbância a 450nm. A coloração foi proporcional à quantidade de IL-1 β na amostra.

Análise do Perfil de liberação de HMGB1

Após o tratamento com NE AIFtCl, foi feita a análise do perfil de liberação de HMGB1 também pelo método ELISA. Foram feitas duas análises, 24 e 48h pós tratamento. A concentração de HMGB1 foi analisada pelo teste ELISA sanduíche disponível comercialmente. Obedecendo-se as instruções de fabricante. Resumidamente, os poços da placa foram pré-revestidos com anticorpos para HMGB-1, seguindo-se então a adição das amostras, brancos e controles a seus respectivos poços. Então, foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-HMGB-1 conjugado a peroxidase, e assim, foi possível a formação

do complexo antígeno-anticorpo. Para se ocorrer a reação colorimétrica foi adicionado tetrametil benzidina. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância das placas a 450 nm.

Ensaio para visualização do Estresse Oxidativo

Para visualização do Estresse oxidativo, foi utilizada a sonda CellROX® green. Para o ensaio, foram plaqueadas 10.000 células por poço em placa de 12 poços, onde cada poço recebeu uma lamínula circular, para que posteriormente pudesse ser retirada e levada ao microscópio de fluorescência. O marcador, quando internalizado pela célula, é oxidado pelos radicais livres e assim emite fluorescência em verde. As lamínulas com as células tratadas, foram levadas ao microscópio de fluorescência imediatamente após o tratamento com NE-AIFtCl, já descrito anteriormente.

Resultados e Discussão:

Foi observado um significativo aumento no perfil de liberação de IL-1 β e HMGB-1, quando comparados às células que não receberam tratamento. E também foi possível observar a presença de estresse oxidativo em células tratadas.

Pode-se afirmar que, a terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão de alumínio-ftalocianina provoca uma importante elevação da liberação de IL-1 β e HMGB1, em todos os tempos de exposição. Além de provocar estresse oxidativo na célula tratada. Assim, estão presentes condições mínimas para que ocorra morte celular imunogênica.

A presença de estresse oxidativo associada à liberação de DAMPs são indicativos de que a TFD aplicada neste trabalho induz morte celular imunogênica.

Conclusões:

Em virtude do que foi mencionado, o presente estudo conseguiu apresentar o potencial de indução de MCI da terapia fotodinâmica mediada por NE-AIFtCl. Porém, ainda são necessários novos ensaios sobre a exposição e liberação de outros DAMPs. Além de que, para perspectivas futuras, um importante próximo passo seria o estudo *in vivo* da resposta imunitária adaptativa, favorecida pela morte celular imunogênica estudada.

Referências bibliográficas

GARG A. D. and P. AGOSTINIS. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2014. 13(3): p. 474-487.

KEPP O., SENOVILLA L., VITALE I., VACCHELLI E., ADIEMIAN S., AGOSTINIS P., GALLUZZI L. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*, 2014. 3(9), e955691.

LOPEZ-CASTEION G., & BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2011. 22(4), 189–195.

STEICHEN S. D., CALDORERA-MOORE M., PEPPAS N. A. . A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*. 2013. 48:416–427.

VERFAILLIE T et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death and Differentiation*, 2012. 19: 1880–1891.

XIA Q., XU, J., CHEN, H., GAO, Y., GONG, F., HU, L., & YANG, L. Association between an elevated level of HMGB1 and non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and literature review. *OncoTargets and Therapy*, 2016. 3917–3923.

WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998. v. 42, n. 1, p. 13-28.

YANG, H. et al., The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J. Leukoc Biol.*, v. 93, n. 6, p. 865-873, jun./2013.