

TÍTULO

Lipossomas multifuncionais: estratégia terapêutica seletiva do câncer através da técnica de hipertemina magnética fluida.

Maria Alice Brangion Silva (IC), Daniel Cristian (PQ)¹

Universidade Federal De Itajubá

Orientações: Maria A. B. Silva (IC), Daniel Cristin (PQ), Daniel Bragança (PQ), Nadia Leão (PQ).

¹Universidade Federal de Itajubá.

Palavras-chave: cultivo celular, lipossomas, citometria de fluxo, lupeol.

Introdução

Mesmo diante dos avanços nas terapias para o tratamento do câncer, ainda infelizmente a maioria dessas terapias apresentam muitos efeitos colaterais e sua aplicação é limitada pela resistência ao tratamento e recorrência da doença. Portanto, um novo medicamento ou um novo sistema de liberação de medicamentos poderá trazer novas perspectivas para os pacientes com câncer.

Quando se fala em potenciais substâncias para o tratamento do câncer destaca-se o lupeol. Nas últimas décadas, numerosos estudos confirmaram que o lupeol desempenha um papel antitumoral significativo em várias linhagens de células tumorais e modelos de câncer. Estudos recentes sugerem que uma forma de otimizar os efeitos do lupeol é através do encapsulamento com lipossoma, conhecido um potencial carreador para agentes quimioterápicos anticancerígenos. Nesse trabalho foi avaliado por citometria de fluxo o efeito citotóxico do composto lupeol carreador por lipossomas (TLS-LUP) in vitro em células A549 E MDA-MB 231.

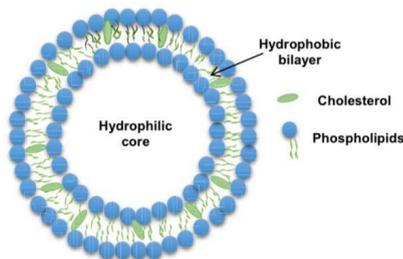


Figura.1 Sistema representativo dos lipossomas. (NSAIRAT et al., 2022)

Metodologia

Lipossomas em branco (TSL-BLK) ou carregados com lupeol (TSL-LUP) foram preparados com base no método de hidratação lipídica, descrito pela primeira vez por Bangham et al. (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965). Resumidamente, 2,25 mL de DPPC 30 mM, 0,6 mL de DSPC 20 mM e 0,15 mL de DSPE-PEG2000 10 mM, dissolvidos em clorofórmio, foram transferidos para um frasco de fundo redondo totalizando uma concentração lipídica total de 40 mM (razão molar de 7,5 : 2,0 : 0,5, respectivamente). O equivalente de lupeol a 0,1% (p/v) ou 0,05% (p/v) foi adicionado à solução lipídica. Um filme lipídico foi preparado por evaporação do clorofórmio sob pressão reduzida em um aparelho rotativo. Na etapa seguinte, o filme lipídico foi hidratado com 3,0 mL de solução salina tampão fosfato (PBS), pH 7,4. A dispersão obtida foi submetida a agitação vigorosa em vórtice, produzindo lipossomas multilamelares. As vesículas multilamelares resultantes foram calibradas usando um kit Mini-Extrusor (Avanti, São Paulo, Brasil) e membranas de policarbonato (200 nm) nas quais foram realizados 5 ciclos de extrusão. O lupeol não carregado foi separado por diálise. Para este procedimento, um volume de 10 mL de lipossomas foi pesado e adicionado dentro de saco de membrana de celulose (Sigma-Aldrich, cut off 12 kDa ; São Paulo, Brasil). O sistema foi agitado em 2.000 mL de água ultrapura por 48h à temperatura ambiente. Na sequência, todo o conteúdo do saco foi retirado e pesado em que uma solução tampão PBS (pH 7,4) foi adicionada até obter o mesmo peso antes do processo de diálise. A concentração de lupeol foi medida por cromatografia

líquida de alta eficiência (HPLC). Amostras estéreis de TSL-BLK ou TSL-LUP foram obtidas através de exposição à luz UV (253,7 nm – 5 W) de uma caixa de esterilização pessoal por 8h.

O estudo foi conduzido em células de linhagem de tumor de mama, MDA-MB 231 (*Triple Negative Breast Cancer Cells - TNBC*) e células de linhagem adenocarcinoma alveolar de pulmão humano, A549. Linhagens celulares de passagem baixa e com boas propriedades de adesão, foram obtidas de frascos de cultura celular apropriados de 50 mL. O meio DMEM (4500 mg.L⁻¹ de glicose; 4 M; glutamina; 11 mg. L⁻¹;

piruvato de sódio; 3,7 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), suplementado com soro fetal bovino a 10% e estreptomicina 1% foi utilizado como meio de cultura. As células foram incubadas na incubadora de CO2 modelo 311 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, EUA) com uma atmosfera controlada (95% de O₂; 5% de CO₂ a 37 °C).

Para avaliar a atividade citotóxica da formulação TSL-LUP 40 e 60µg/ml após atingirem confluência adequada as células, foram plaqueadas em placas de 12 poços, em triplicata, em concentrações de 2 x 10⁶ células por poço. As placas foram incubadas em estufa, por 24 horas, em condições de 5 % de CO₂ e temperatura de 37 °C, para adequada adesão ao fundo dos poços. Após este tempo, foram adicionadas aos poços concentrações de 40 e 60 µg/ml durante um tratamento de 48 h.

A citotoxicidade das amostras (triplicatas) foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento FACsVerse e os reagentes PI e Annexin V.

Resultados e discussão

A identificação de células com base em seus perfis de coloração com Annexin V e PI foram examinadas usando citômetro de fluxo. Para esta avaliação, as células foram divididas por regiões: apoptose tardia (região UR), apoptose precoce (região LR), (região UL), não corada com nenhum; células vivas (região LL).

A concentração de TSL-LUP 40µg/ml induziu morte por apoptose tardia de 73.2% nas células A549, enquanto que 8,79% dessas células morreram por apoptose precoce (Figura 2). Nos gráficos plott count a esquerda da figura 1 é possível observar uma maior concentração de células a direita do gráfico que caracteriza células inviáveis.

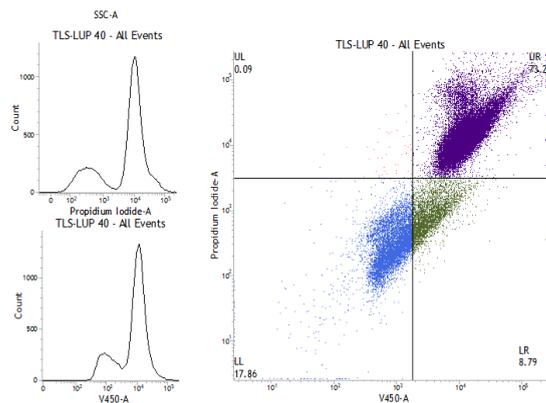


Figura 2 – Concentração de TSL-LUP 40µg/ml em linhagem celular A 549.

Na figura 3 podemos observar no plott de PI por Annexina V que a concentração de TSL-LUP 60µg/ml induziu 68,93% de morte por apoptose tardia nas células A549. Quando observado o processo de apoptose precoce, a concentração de 60µg/ml foi mais significativa quando comparado a concentração de 40µg/ml (22,96% e 8,79% respectivamente). No gráfico plott count a esquerda da figura e pode-se observar claramente duas populações de células, sendo o pico menor de células viáveis e o pico maior de células inviáveis, tanto para IP quanto para Annexina.

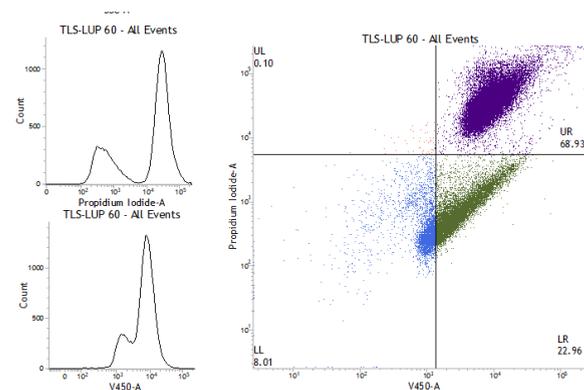


Figura 3 – Concentração de TSL-LUP 60µg/ml em linhagem celular A549.

Esses dados sugerem que um maior número de células A549 morreram por apoptose tardia com as concentrações de 40µg/ml e 60µg/ml de TSL-LUP.

Células MDA-MB-231

O efeito citotóxico do TLS-LUP 40µg/ml e 60µg/ml foi também avaliado em células MDA-MB231. Inicialmente podemos observar que o composto TLS-LUP 40µg/ml apresentou um efeito citotóxico menos significativo nesse modelo quando comparado a população de células viáveis (mortes por apoptose precoce 37,74% e por apoptose tardia 7,85% e 54,39% respectivamente) (figura 4 e 5).

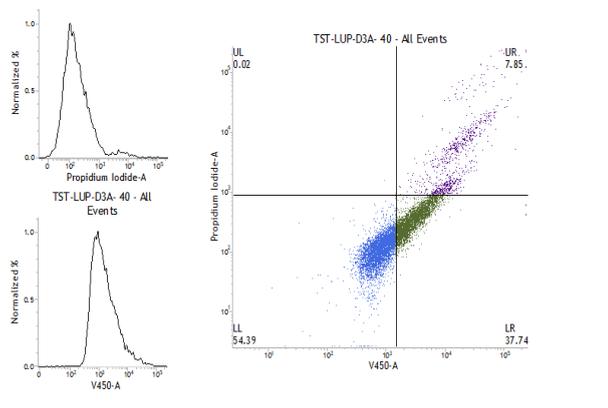


Figura 4 – Concentração de TLS-LUP 60µg/ml em linhagem celular MDA-MD 23.

A concentração de TLS-LUP 60µg/ml induziu morte por apoptose precoce em 22,26% da população e 40,34% dessas morreram por apoptose tardia. Sugerindo um maior efeito citotóxico da concentração de TLS-LUP 60µg/ml nesse modelo celular quando comparado a TLS-LUP 40µg/ml.

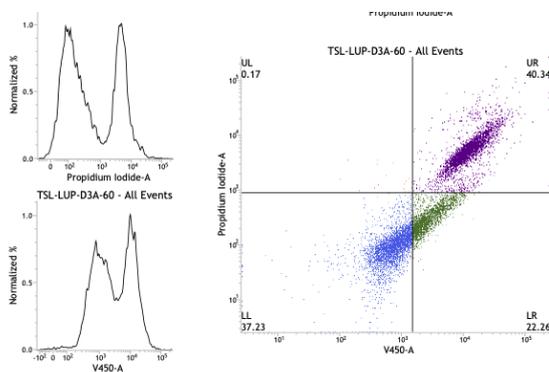


Figura 5 – Concentração de TLS-LUP 60µg/ml em linhagem celular MDA-MD 231.

Conclusões

Em concordância com outros artigos científicos, no presente trabalho a detecção da morte celular por citometria de fluxo demonstrou ser um método de alta confiabilidade para revelar os potenciais efeitos citotóxicos de produtos naturais ou compostos sintéticos (MCKINNON, 2018b; PICOT et al., 2012b).

Em relação os efeitos citotóxicos do TLS-LUP, nossos resultados estão em linha com atuais pesquisas como a de Zang e colaboradores, que observaram maior captação de lupeol encapsulado com lipossoma-galactose nas células HepG2 como também o tratamento com esse composto apresentou maior eficiência apoptótica quando comparado ao lupeol livre (ZHANG et al., 2021).

Dessa forma, neste presente estudo, temos como objetivo prosseguir investigando os mecanismos que levaram à morte as linhagens celulares A549 e MDA-MB231.

Agradecimento

Obrigada pelo o apoio neste projeto CNPQ, orientadores Daniel Cristian, Nádia Leão.

Referências

BANGHAM, A. D. D.; STANDISH, M. M. M.; WATKINS, J. C. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 238–52, 1 ago. 1965.

PICOT, J. et al. **Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. Cytotechnology**, mar. 2012a.

ZHANG, J. et al. In vitro and in vivo antitumor effects of lupeol-loaded galactosylated liposomes. **Drug Delivery**, v. 28, n. 1, p. 709–718, 2021.