

Citotoxicidade e Indução de Apoptose por psoralenos

Vieira, Claudinéa Rocha ¹; **Guillo, Lúcia Andreu** ²

Palavras Chave: PUVA-terapia, Melanoma, TMP, Fototoxicidade.

1. INTRODUÇÃO (Justificativa e Objetivos)

A pesquisa com novas drogas para a cura do melanoma tem sido o objetivo de pesquisadores preocupados com este tipo de câncer. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil vão a óbito, 35% de pessoas que desenvolvem o melanoma. A incidência está aumentando numa frequência de 4,5% por ano (Rosenthal,1995) e, acredita-se que embora considerada uma patologia rara, o melanoma representa 65% de todos os óbitos por câncer de pele (Ornellas, 2000). Diante da grande necessidade de encontrar novas alternativas terapêuticas para o melanoma. A utilização de finonacumarinas, como trimetilpsoraleno (TMP) derivado das psoralenas, que tem ação direta no DNA, é uma alternativa. O tratamento Puva (combinação de UVA com psoralenas) é realizado com êxito nas afecções cutâneas tais como: vitiligo e psoríase (Gasparro,2000). Ainda é desconhecido o mecanismo molecular o qual a droga exerce sua função citotóxica. Porém, com o excelente resultado do PUVA, investigamos o mecanismo de ação do TMP em células de melanoma. A terapia conhecida como PUVA – terapia, é a combinação de derivadas de psoralenos como o TMP e radiação UVA (320 – 400nm) utilizada com êxito no tratamento de psoríase e vitiligo. Não há um conhecimento concreto do mecanismo molecular responsável pela eficiência da terapia – Puva. A pesquisa é desenvolvida para investigar a fototoxicidade e a indução de apoptose pelo TMP, em células de melanoma da linhagem SKMEL 3F, que foram irradiadas com luz UVA (0,3J/cm²) após serem tratadas com TMP com concentrações variadas e, incubadas por 24, 48 e 72 horas. A citotoxicidade do TMP foi analisada pelo método do MTT. Após extrair e lisar o DNA, este foi analisado em gel de agarose a 1% depois de corrida eletroforética. Observa-se no tratamento com 4,3µM de TMP, incubada por 24 horas a fragmentação do DNA. Com o tratamento de TMP/UVA foi verificada a perda de adesão celular e um arredondamento. A partir de pesquisas com os psoralenos e de seus mecanismos de ação a eficiência de sua terapêutica poderá melhor ser compreendida.

2. METODOLOGIA

Em pesquisa, realizada em linhagem de células SKMEL 37 de melanoma, com o trimetilpsoraleno, posteriormente analisado o potencial citotóxico de TMP com concentrações variadas de 4,3.10 µM, incubadas por meia hora e irradiadas com luz UVA sob fluência

de 0,32 mj/cm/s. Após coletar as células, adicionou tampão de lise (SDS 0,5%) e incubação de RNase e proteinase K por meia hora a 37° C, aplicando as amostras em gel de eletroforese, metodologia (WALKER, et al, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pesquisas realizadas, em nosso laboratório por (Leite, et al, 2004) demonstrarem através terapia - PUVA o efeito fototóxico em cultura de célula de melanoma humano. Contudo não é conhecido o mecanismo de ação do TMP. Nossos resultados demonstraram que há indicativo de um mecanismo envolvendo a apoptose celular. Na figura 1, são apresentados os resultados, analisados em gel de eletroforese. Verificou-se um arraste do DNA em amostra tratada com 4,3 μ M de TMP com UVA nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 hs (canaletas: 2 A, 3 B e 3C). Entretanto, no tratamento com o período de 48 hs (canaletas: 3 B e 4 B), esse arraste é mais evidente, nos demais canaletas houve um arraste moderado. No gel de 72 hs, teve um arraste moderado com poucas células, pois o efeito do TMP é dose dependente indicando maior tempo poucas células e maior citotoxicidade.

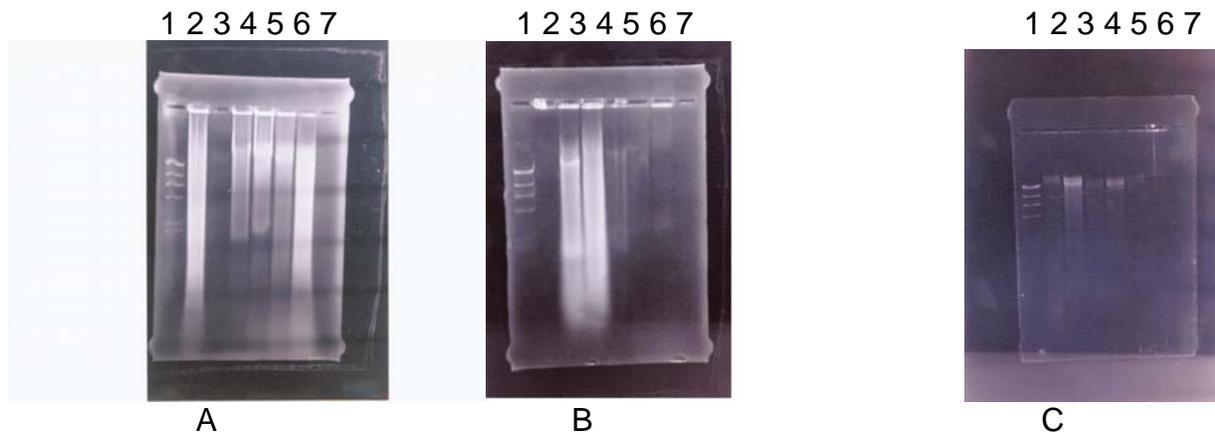


Figura 1. Indução de apoptose por tratamento de PUVA em linhagem de células skmel 37. Gel de eletroforese com amostras tratadas com TMP, em tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). A: 1-peso molecular Hind III, 2- 4,3 μ M, 3- DMSO, 4- 0,43 μ M, 5- 0,043 μ M, 6- 0,043 μ M, 7- 2,0 μ M. B: Hind III, 2- DMSO, 3-4,3 μ M , 4- 0,43 μ M, 5- 0,043 μ M, 6- 0,043 μ M, 7- 2,0 μ M. C: Hind III, 2- DMSO, 3-4,3 μ M , 4- 0,43 μ M, 5- 0,043 μ M, 6- 0,043 μ M, 7- 2,0 μ M.

4. CONCLUSÃO

A análise de DNA das amostras tratadas com TMP indicam sua fragmentação, embora não seja evidente o aparecimento do perfil característico das bandas relativas ao nucleossomos formados nos eventos apoptóticos. A terapia – PUVA induziu as células à apoptose por indução de caspase – 8. Estes estudos e seus resultados podem ser de grande relevância para o conhecimento do mecanismo de ação de psoralenos e, a indicação da terapia – PUVA no tratamento do melanoma.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES, J. Melanoma, a forma mais letal da doença. **Scientific American – Brasil**, ano 2, nº 15, p. 49-50, 2003.

GASPARRO, F.T. The role of PUVA in the treatment of psoriasis. Photobiology issues related to skin cancer incidence. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 6, 337-348, 2000.

LEITE, V.C., SANTOS, R.F., CHEN, L.C., GUILLO, L.A. Psoralen derivatives and longwave ultraviolet irradiation are active in vitro against human melanoma cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 76, 49-53, 2004.

WALKER, P.R., LEBRANC, J., SMITH, B., PANDEY, S. SIKORSKA, M. Detection of DNA fragmentaton and endonucleases in apoptosis. **METHODS: A companin to Methods in Enzimology** v. 17 p. 329-338,1999.

Fonte de Financiamento: CAPES, UFG, CNPQ

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Bioquímica Celular e Molecular, claudiaufg@yahoo.com.br

² Orientador / Instituto de Ciências Biológicas / UFG, guilo@icb.ufg.br