

EFEITO DO FRACIONAMENTO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Graziela de Sousa¹, Felipe Gomes Benício¹, Rafael Melges¹, Renato Amaro Zângaro⁴.

¹ Aluno do curso de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento – São José dos Campos.

⁴ Professor orientador, Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento São José dos Campos.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Fracionamento, Laser.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Resumo - A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste em irradiar tumores com um comprimento de onda apropriado de luz, após a captação de um fotossensibilizante pelo tecido tumoral. A TFD é fundamentada no acúmulo preferencial do fotossensibilizante no tecido neoplásico, depois excitado por luz de comprimento de onda 630 a 700 nm, ocasionando morte do tecido tumoral. O presente trabalho buscou analisar a viabilidade celular frente a variações de fluência em células Hep-2 após TFD. Foram plaqueadas 1×10^5 células/mL, em placas de 96 poços, as quais foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e incubadas "over night" a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após, as células sofreram irradiação com laser diodo (*Thera Lase - DMC*) de comprimento de onda de 685nm, irradiância de 11 mW e fluência de 0,7 J/cm². Esta dose foi fracionada em 0,3 e 0,4 J/cm². O preparo das células para irradiação se deu pela incubação destas com o fotossensibilizante AlPcS₄, por 30 minutos. Findada a irradiação, aguardou-se o metabolismo celular, por 24 horas. Foi então feito o ensaio de MTT, o qual é utilizado para fazer a análise de viabilidade celular. Puderam ser observadas alterações na curva de morte celular, mostrando a tendência do fracionamento da TFD.

Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é um fenômeno físico-químico que permite diagnosticar e tratar lesões tumorais e não tumorais utilizando a ação combinada de uma luz e drogas fotossensibilizadoras, que atuam sobre tecidos alterados. (NÓBILE et al., 1998).

A TFD é uma forma de quimioterapia ativada por luz com várias aplicações, mas com ênfase especial no tratamento de câncer. As drogas fotossensibilizadoras acumuladas nas células cancerosas são ativadas por luz visível que causa danos à mitocôndria, membrana citoplasmática e lisossomos das células neoplásicas malignas com subsequente morte da mesma. (FURUZAWA, 1997).

A hipóxia tecidual induz a uma resposta molecular e fisiológica, incluindo uma resposta adaptativa associada com a ativação do gene. (FERRARIO et al., 2000).

A TFD causa um rápido decréscimo no potencial da membrana mitocondrial. (KESSEL et al., 2000).

Agentes fotossensibilizantes realizam processos de seletividade entre tecidos patológicos e normais. O trajeto destes agentes percorre uma variedade de organelas subcelulares para foto destruição. TFD causa uma rápida diminuição do

potencial de membrana mitocondrial, diminuindo citocromo c e mediando ao final a ativação da Apaf-1 e pro-caspase-9, procedente da ativação da caspase-3 (KESSEL et al., 2000). do fracionamento da dosimetria. (Messmann et al., 1995).

O fracionamento da irradiação podia realçar o efeito de TFD em duas maneiras: (a) atraso da parada programada ou do relaxamento da vasoconstrição vascular induzido por Ala-TFD e (b) por uso do protoporfirina recentemente dado forma IX (PpIX), produzidos durante o intervalo escuro (van den Boogert, 2001).

Objetivo

Analisar e comparar o índice de morte celular durante aplicação contínua de TFD e com fracionamento de dose.

Materiais e Métodos

Cultura de Células

Foram utilizadas células da linhagem Hep-2 (carcinoma de laringe humana), cultivadas em Meio Mínimo Essencial (MEM) de Dulbecco's suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

As células foram mantidas a 37°C em estufa úmida, em atmosfera de 5% de CO₂.

Preparação das células

As células foram plaqueadas em placas NUNC de 96 poços, foram utilizados poços alternados em fileiras alternadas, para que não houvesse interferência entre os poços. O número de células utilizado foi de 10⁵ células/ ml.

Amostragem

O experimento foi realizado duas vezes sendo que em cada uma delas foram feitas amostras em duplicata.

Tratamento Fotoquímico

Para o tratamento químico, utilizou-se o fotossensibilizante Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AlPcS₄) em concentração 5mM tendo 30 minutos de interação com as células.

O laser utilizado foi o Thera Laser DMC ($\lambda=685\text{nm}$) com irradiância de 11mW e fluência de 0,5 J/cm², sendo utilizado uma placa escura para isolar os poços.

Fracionamento

A fluência de 0,7 J/cm² foi fracionada em 0,3 e 0,4 J/cm² com intervalo de 150 segundos entre as doses. Este fracionamento de 0,2 e 0,4 J/cm² foi adotado em função do ajuste disponível no equipamento.



Figura 1 – Irradiação das amostras.

Ensaio de MTT

Foi utilizado o ensaio de MTT para a análise da viabilidade celular após o tratamento com a TFD, controle somente com o laser, controle somente com a droga e controle somente com as células sem tratamento.

O MTT é um ensaio no qual as células viáveis adquirem uma coloração púrpura pelo processo de formação de cristais de formazan, que se dá através da quebra do tetrazol pela ação da desidrogenase liberada na matriz mitocondrial (Mehler et al.,1995). Os cristais de formazan formados podem ser detectados utilizando-se a análise em leitor de ELISA (Zhang, et al, 1995)

Incubou-se a solução de MTT 10% com as células por 3 horas em estufa úmida a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ no escuro, após, descartando-se a solução anterior adicionou-se solução etanol: DMSO (1:1) a qual ficou no agitador por 20 minutos.

Passou-se então à análise do material em leitor de ELISA na faixa de 570nm, a qual foi realizada sem tampa.

Análise dos dados

Para a análise dos dados utilizou-se o programa Windows Excel 98 para calcular a média das amostras.

Resultados e Discussão

Nota-se no gráfico 1, que as células controle apresentaram elevada densidade óptica com relação às outras situações experimentais, indicando de fato que, a placa onde existe um maior número de células vivas apresenta uma cor púrpura mais acentuada (Mehler et al., 1995; Zhang, et al, 1995).

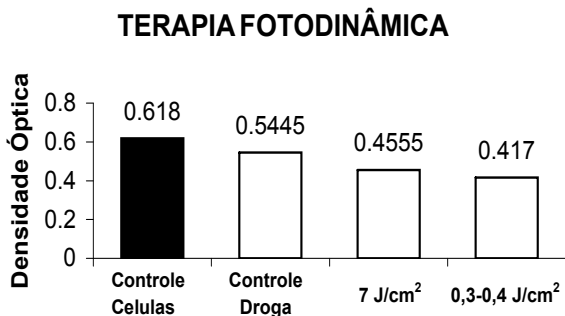


Gráfico 1 - Comparação da densidade óptica média apresentada para: (i) a placa controle com as células sem tratamento (ii) controle somente com a droga (iii) PDT com 7J/cm² (iiii) PDT fracionada com 0,3-0,4J/cm².

As amostras controle onde foi administrada somente a droga sofreram uma queda com relação ao número inicial, mostrando que a droga exerceu, por si só, certa toxicidade para a amostra.

Com relação ao efeito obtido ao se fracionar a dose da densidade de energia no uso da TFD, pôde ser notado que a morte celular aumentou em $\cong 8\%$ com o fracionamento em comparação à irradiação contínua de 0,7 J/cm². Embora a diferença tenha sido pequena, pode-se sugerir que o fracionamento na Terapia Fotodinâmica, parece potencializar o efeito da droga administrada, concordando com os achados de Messmann et al. (1995)

Conclusão

O fracionamento de dose para Terapia Fotodinâmica é ainda uma ferramenta com pouco conhecimento disponível para utilização, podendo se mostrar eficiente ou não de acordo com as proporções e doses aplicadas.

É muito importante a realização de estudos futuros, aplicando o fracionamento de dose em maior variabilidade de fluências, a fim de tentar elucidar a real eficiência do fracionamento e as proporções ideais para o fracionamento das doses.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e ao Laboratório de Cultura de Células por todo material e ajuda cedidos, especialmente à Dr^a. Cristina Pacheco-Soares e ao Dr. Newton Soares da Silva.

Referências Bibliográficas

Ferrario, A; Tiehl, K.F.; Rucker, N.; Schwarz, M.A.; Gill, P.S. and Gomer, C.J. Antiangiogenic Treatment Enhances Photodynamic Therapy Responsiveness in a Mouse Mammary Carcinoma **Cancer Res.**, Aug 2000; 60: 4066 - 4069.

Furuzawa, Sérgio Kaneo. **Terapia Fotodinâmica Utilizando Ácido 5-Aminolevulínico Experimental in Vitro**. Tese de Mestrado Universidade do Vale do Paraíba - S. José dos Campos, 1997.

Kessel, D.; Caruso, J.A. and Reiners, J.J. Potentiation of Photodynamic Therapy by Ursodeoxycholic Acid **Cancer Res.**, Dec 2000; 60: 6985 - 6988.

Liyang Zhang; Erin E. Connor; Nasser Chegin and Kathleen T. Shiverick; Modulation by Benzo[a]pyrene of epidermal growth factor receptors, cell proliferation, and secretion of human chorionic gonadotropin in human placental cell lines. **Biochemical Pharmacology**, vol. 50, nº 8, pp. 1171-1180, 1995.

Mark F. Meher; Ronen Marmur; Robert Gross; Peter C. Mabie; Ziyang Zang; Achilles Papavasiliou and John A. Kessler; Cytokines Regulate the cellular phenotype of developing neural lineage species. **Int. J. Devl. Neuroscience** vol. 13, nº 3/4 pp. 213-240, 1995.

Messmann H, Milkvy P, Buonaccorsi G, Davies CL, MacRobert AJ, Bown SG. Enhancement of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin photosensitisation in normal rat colon by threshold and light fractionation studies. **Br J Cancer**. 1995, Sep; 72(3):589-94.

Nóbile, Raúl; Olmedo, Raúl; Minuzzi, Gustavo. Fotodinamia diagnóstica y terapéutica. **Rev. méd. Córdoba**;86:37-9, 1998.

Van den Boogert J, van Staveren HJ, de Bruin RW, Siersema PD, van Hillegersberg R. Fracionada illumination for oesophageal ALA-TFD: food flow and PpIX formation. **Lasers Med Sci**. 2001;16(1):16-25.

