

**AVALIAÇÃO DA ADESÃO CÉLULA-MATRIZ APÓS A TERAPIA FOTODINÂMICA****Aline Neves Araujo<sup>1</sup>, Eriane Eller de Siqueira<sup>2</sup>, Antônio Cláudio Tedesco<sup>3</sup>, Cristina Pacheco Soares<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Prof. Artur Riedel, 275 – Jd. Eldorado, Diadema – SP, [araujo.alinen@gmail.com](mailto:araujo.alinen@gmail.com)<sup>2</sup>Universidade do Vale do Paraíba (Univap)/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) – Laboratório Dinâmica de Compartimentos Celulares; Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, São José dos Campos – SP, [erianellers@bol.com.br](mailto:erianellers@bol.com.br)<sup>3</sup>Universidade de São Paulo (USP)/Departamento de Química, Faculdade de Filosofia e Letras, Ribeirão Preto – SP, [atedesco@usp.br](mailto:atedesco@usp.br)

**Resumo-** A Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma modalidade estabelecida para o tratamento de tumores sólidos e outras lesões acessíveis. O presente trabalho propôs investigar os processo de adesão de células da linhagem HEP-2 (carcinoma de laringe humano) submetidas a PDT com os fotossensibilizantes Cloroalúminio ftalocianina lipossomal (AIPHCl), Alumínio ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS4) e Zinco ftalocianina (ZnPc). Para efetuar o estudo da modificação do potencial metastático, as células tratadas com os diferentes fotossensibilizantes e subsequentemente irradiadas foram analisadas em alteração da adesão das células a matriz extracelular, representada pelo colágeno do tipo IV ou poli-L-lisina. Os dados obtidos nos permitiram concluir que células da linhagem HEP-2 submetidas ao tratamento fotodinâmico não foram capazes de aderir de modo eficaz na superfície coberta por colágeno tipo IV.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica, Ftalocianinas, Adesão Célula-Matriz**Área do Conhecimento:** Biofísica**Introdução**

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma modalidade estabelecida para o tratamento de tumores sólidos e outras lesões acessíveis. Embora o conceito e prática de combinação de luz e corante fotossensibilizante para o tratamento de estados patológicos tenha ocorrido a quase um século, a compreensão dos mecanismos tem sido tremendamente melhorada ao longo dos anos (Pervaiz e Olivo, 2006). Entretanto maiores conhecimentos se fazem necessários para o preenchimento de lacunas nos mecanismos moleculares.

Desde a sua introdução até cerca de duas décadas, a PDT tem se tornado progressivamente uma técnica estabelecida para o tratamento de cânceres e, mais recentemente, outras doenças (PLATZER et al., 2002). Três mecanismos que levam a destruição tumoral primária in vivo tem sido propostos: a fotoinativação direta da célula tumoral, a destruição vascular e a ativação do sistema imunológico (HASSAN et al., 2000).

Nos dias atuais, com a aprovação de inúmeros fotossensibilizantes, a nova fase de desenvolvimento da PDT se concentrará no entendimento dos mecanismos da resposta de células e tecidos ao tratamento (MILLER et al., 2007), ou seja, na fotoinativação direta das células. A procura dos alvos moleculares da

terapia é intrinsecamente complexa. A variação do tipo celular, do fotossensibilizante e suas condições de incubação, e dos parâmetros utilizados para a iluminação podem alterar significativamente a resposta frente à PDT (CASTANO et al., 2005).

O presente trabalho propôs investigar os processo de adesão de células da linhagem HEP-2 (carcinoma de laringe humano) submetidas a PDT com os fotossensibilizantes Cloroalúminio ftalocianina lipossomal (AIPHCl), Alumínio ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS4) e Zinco ftalocianina (ZnPc). Uma variedade de ensaios foi realizada para melhor compreensão das alterações na adesão célula matriz.

Os mecanismos básicos dos efeitos da PDT na adesão celular não estão completamente elucidados. As porfirinas são as mais exploradas (CHRISTENSEN et al., 1985; GOMER; FERRARIO; MURPHEE, 1987; VONARX et al., 1995; MARGARON; SORRENTI; LEVY, 1997; ROUSSET et al., 1999; UZDENSKY et al., 2004a; UZDENSKY et al., 2004b; UZDENSKY et al., 2005), entretanto quase não há informações sobre o papel das ftalocianinas (CANTI et al., 1994; BALL et al., 2001) na adesão celular. Visto que a PDT é indicada principalmente em carcinomas precoces, nos quais não foi detectada metástase, é essencial que a influência da terapia no

processo metastático seja esclarecida, garantindo um procedimento seguro (ROUSSET et al., 1999).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações no potencial metastático de células HEP-2 (carcinoma de laringe humano) submetidas à terapia fotodinâmica com o agente fotossensibilizador Cloroalúminio ftalocianina lipossomal, Alumínio ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS<sub>4</sub>) e Zinco ftalocianina. Para efetuar o estudo da modificação do potencial metastático, as células tratadas com os diferentes fotossensibilizantes e subsequentemente irradiadas foram analisadas em alteração da adesão das células a matriz extracelular, representada pelo colágeno do tipo IV ou poli-L-lisina.

### Metodologia

A linhagem HEP-2, carcinoma epidermóide de laringe humana (CCL-23 ATCC-USA), utilizada nos experimentos, foi obtida do Instituto Adolfo Lutz/Seção de Cultura Celulares (São Paulo-SP). Essa linhagem celular tem sido amplamente utilizada quando se faz necessário um modelo de sistema neoplásico (CORBIERE et al., 2004; MAGGIORELLA et al., 2005; SUN et al., 2006), incluindo estudos da resposta celular frente a PDT (LIU; XU; ZHANG, 2004; MILANESIO et al., 2005) e estudos de adesão celular (LO; KEESE; GIAEVER, 1999; MAZUROV et al., 2003). Nosso grupo de pesquisa faz uso dessa linhagem celular como sistema modelo no estudo da aplicação de PDT *in vitro*. Manter o tipo celular permite estabelecer comparativos entre a resposta das células frente a PDT com agentes fotossensibilizante variados avaliando alterações na expressão de proteínas e nos compartimentos celulares.

O fotossensibilizante utilizado foi a alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AIPcS<sub>4</sub>), obtida da Frontier Scientific Porphyrin. A droga foi inicialmente diluída em PBS na concentração de 1mM e estocada a 4°C protegida da luz. Para sua utilização em cultura, a solução estoque de 1mM foi esterilizada por calor úmido (autoclave) e então diluída na concentração final de 10µM em meio MEM sem SFB.

Para a avaliação da resposta celular frente a PDT as células foram divididas em grupos:

- Controle: grupo isento de qualquer tratamento.
- Laser: grupo submetido apenas à irradiação.
- PDT: grupo incubado com AIPcS<sub>4</sub>, ALPHCl lipossomal e ZnPc e posteriormente irradiado, caracterizando a terapia fotodinâmica.

Para o ensaio de fluorescência 6, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos, as células foram submetidas ao tratamento para análise dos

filamentos de actina utilizando a técnica de microscopia de fluorescência. Os ensaios de adesão célula-célula e matriz-célula foram realizados 6, 12, 24 e 48 horas após os tratamentos para avaliar as modificações na capacidade de adesão ao longo dos períodos analisados. Para avaliar alterações no comportamento das células tratadas com tripsina, o ensaio de resistência foi realizado logo após a exposição das células à luz. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Culturas de células HEP-2 foram incubadas com 300µL dos fotossensibilizantes AIPcS<sub>4</sub>, ZnPc a 10µM e ALPHCl lipossomal a 2,5 µM por 60 minutos a 37°C. Após o período de incubação a cultura foi lavada 2 vezes com PBS, para a retirada do fotossensibilizante excedente, e a ela adicionada 300µL de meio MEM sem SFB e sem vermelho de fenol. A irradiação foi procedida no escuro com um aparelho clínico portátil de Laser semiconductor Kondortech Bio Wave LLLT Dual com meio ativo de InGaAlP (Fosfeto de índio-gálio-alumínio) operando no modo contínuo em comprimento de onda (λ) de 660nm, potência de 30mW, densidade de energia de 4,5J/cm<sup>2</sup> e densidade de potência de 30mW/cm<sup>2</sup>.

O colágeno de placenta humana tipo IV (Sigma) foi reconstituído em 0,25% (vol/vol) de ácido acético na concentração de 1mg/mL e refrigerado a 4°C, ou Poli-L-Lisina 0,01% em PBS. Para cobrir superfícies as placas foram incubadas com 272µL/poço da solução de colágeno ou Poli-L-Lisina, em PBS, *overnight* a 4°C. Posteriormente, a solução protéica foi retirada e os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com uma solução de BSA a 1% (peso/vol) por 30 minutos a temperatura ambiente. Retirada a solução de BSA, as placas foram gentilmente lavadas 3x com PBS e mantidas a 4°C e úmidas com PBS até suas utilizações.

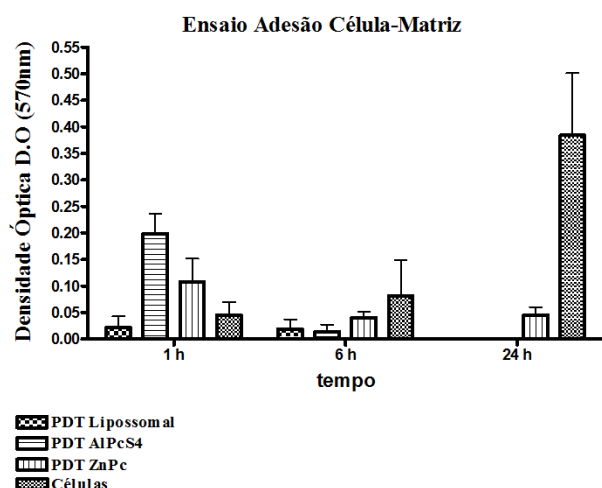
A cultura submetida aos tratamentos, após os períodos de incubação, foram plaqueadas na concentração de 10<sup>5</sup> células/poço em placas cobertas de colágeno humano tipo IV e incubadas a 37°C em meio MEM com 2% de SFB por 2 horas para permitir a adesão. Após este período, as células foram gentilmente lavadas 3 vezes com PBS, para a retirada das células não aderidas, e fixadas com etanol 96% por 10 minutos a temperatura ambiente. A cultura fixada foi marcada com cristal violeta a 0,1% em etanol 70% por 30 minutos. A placa foi lavada com água destilada, para a retirada do excesso do corante, e então adicionou-se 300µL de DMSO para a extração do marcador. A densidade óptica das placas foi lida em leitor de ELISA Spectra Count, operando no comprimento de onda de 570nm. O branco foi determinado usando a absorbância de 3 poços cobertos com colágeno tipo IV e

bloqueados com BSA submetidos a todos os tratamentos descritos acima, o valor da absorvância desses poços foi subtraído dos resultados obtidos.

## Resultados

Para observar alterações referentes à adesão das células a um componente da ECM foi utilizado o teste colorimétrico com cristal violeta, permitindo o estudo da quantidade de células que permanecem com a capacidade adesiva ao colágeno tipo IV ou poli-L-lisina intacta após os tratamentos.

Ao avaliar o grupo PDT-AIPHCl 1 hora (Fig.1), após o período de pré incubação das células com a matriz, não encontramos uma diferença significativa ( $P > 0,05$ ) comparado ao grupo controle, indicando um comportamento semelhante na taxa de adesão a matriz. Esse comportamento persiste no período de 6 horas. Passadas 24 horas a diferença observada é extremamente significativa ( $P < 0,001$ ) e persistindo no período de 48 horas. O mesmo padrão é verificado nos grupos PDT-AIPcS<sub>4</sub> e PDT-ZnPc, repetindo-se o padrão em 24 e 48 horas. Quando os grupos PDT são comparados entre si, observa-se uma alteração significativa da AIPHCl com a AIPcS<sub>4</sub>, no período de 1 hora ( $P < 0,05$ ). Nos outros períodos de observação não são detectadas alterações significantes no comportamento de adesão.



**Figura 1.** Ensaio adesão célula-matriz. Após PDT as culturas foram incubadas em matriz de colágeno IV ou poli-L-lisina, nos períodos de 1, 6 e 24 horas e analisadas através de teste colorimétrico com cristal violeta, por densidade óptica.

## Discussão

É sabido que células epiteliais dependem dos contatos apropriados de adesão célula-célula e célula-matriz para o crescimento e sobrevivência. A alteração da adesão entre célula e ECM foi extremamente influenciada por PDT. Foi possível observar uma queda acentuada do número de células aderidas após o tratamento fotodinâmico, quando o tratamento foi realizado com AIPHCl, que foi acompanhado pela AIPcS<sub>4</sub>. A capacidade de adesão simplesmente desaparece nos períodos de 24 e 48 horas. O tratamento com PDT-ZnPc revelou a presença de células com capacidade de adesão, o que é preocupante e demonstra a necessidade de uma nova aplicação de PDT, objetivando a completa eliminação de células resistentes. Runnels e colaboradores (1999) ao realizar o mesmo ensaio para avaliar a adesão em colágeno IV, fibronectina, laminina e vitronectina (componentes da ECM) obtiveram os mesmos resultados observados com PDT-AIPcS<sub>4</sub>. A redução da adesão de células OVCAR 3 (carcinoma de ovário humano) submetidas ao tratamento com BPD-MA foi atribuída ao alto índice de morte celular observado na cultura, porém, mesmo com as taxas decrescentes de integrina- $\beta_1$  nas placas de adesão focal, não ocorreram diferenças na expressão dessa proteína.

## Conclusão

O presente trabalho nos forneceu importantes informações referentes à adesão celular posterior à terapia fotodinâmica. Os dados obtidos nos permitiram concluir que células da linhagem HEP-2 submetidas ao tratamento fotodinâmico não foram capazes de aderir de modo eficaz na superfície coberta por colágeno tipo IV.

## Agradecimentos

FAPESP: 2006/06736-5

## Referências

CANTI, G.; LATTUADA, D.; NICOLIN, A.; TARONI, P.; VALENTINI, G.; CUBEDDU, R. Antitumour immunity induced by photodynamic therapy with aluminium disulfonated phthalocyanine and laser light. **Anti-cancer Drugs**. v. 5, p. 443-447, 1994.

CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N. AND HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization.

**Photodiagnosis and photodynamic therapy.**  
v.1, p. 279-293, 2004.

COOPER, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **The J Cell Biol.** v. 105, p. 1473-1478, 1987.

CORBIERE, C.; LIAGRE, B.; TERRO, F.; BENEYTOU J.L. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells. **Cell Res.** v. 14, n. 3, p. 188-196, 2004.

CHRISTENSEN, T.; MOAN, J.; SMEDSHAMMER, L.; WESTERN, A.; RIMINGTON, C. Influence of hematoporphyrin derivative (Hpd) and light on attachment of cells to the substratum. **Photochem. Photobiophys.** v.10, p.53-59, 1985.

DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy: Review. **J. Natl. Cancer Inst.** v.90, p. 889-902, 1998.

GOMER. C.J.; FERRARIO, A.; MURPHREE, A.L. The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumor metastasis. **Br. L. Cancer.** v. 56, p. 27-32, 1987.

HASSAN, T.; MOOR, A.C.E.; ORTEL, B. Photodynamic Therapy of cancer. In: WEICHSELBAUM, R.R. **Cancer Medicine.** Ontario: BC Decker, 2000.p.489-502.

LIU HF, XU SZ, ZHANG CR. Influence of CaNa<sub>2</sub> EDTA on topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. **Chin Med J.** v.117, n.3, p. 922-926, 2004.

LO C.M., KEESE C.R., GIAEVER I. Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. **Exp Cell Res.** v. 250, n. 2, p. 576-580, 1999.

MILLER, J.D.; BARON, E.D.; SCULL, H.; HSIA, A.; BERLIN, J.C.; McCORMICK, T.; COLUSSI, V.; KENNEY, M.E.; COOPER, K.D.; OLEINICK, N.L. Photodynamic therapy with phthalocyanine photosensitizer Pc 4. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 224, n. 3, p. 290-299, 2007.

PERVAIZ S, OLIVO M. Art and science of photodynamic therapy. **Clin Exp. Pharmacol P.** 2006;33:551-6.

PLATZER, K.; KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; HAMMERT, P. Characterization of the cell death modes and associated changes in cellular energy supply in response to AIPcS<sub>4</sub>-PDT. **Photochem. Photobiol. Sci.** v.1, p.172-177, 2002.

ROUSSET, N.; VONARX, V.; ELÉOUET, S.; CARRÉ, J.; KERNINON, E.; LAJAT, Y. AND PATRICE, T. Effects of photodynamic therapy on adhesion molecules and metastasis. **J. Photochem. Photobiol.** V. 52, p.65-73, 1999.