

AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA

**Geisa Nogueira Salles¹, Juliana Macedo Costa Couceiro¹, Renan Meyer Campoy¹
Antonio Cláudio Tedesco², Cristina Pacheco Soares¹**

- 1- 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; geisa_salles@yahoo.com.br
2- Universidade de São Paulo/ Departamento de Química/ Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Ribeirão Preto-SP
atedesco@usp.br

Resumo- O presente trabalho propôs investigar os processos de adesão de células da linhagem HEP-2 (carcinoma de laringe humano) submetidas a Terapia Fotodinâmica (PDT) com os fotossensibilizantes Cloroalúminio ftalocianina lipossomal (AIPHCl), Alumínio ftalocianina Tetrassulfonada (AIPcS₄) e Zinco ftalocianina (ZnPc). Para melhor compreensão das alterações na adesão célula-célula, as células submetidas ao tratamento foram marcadas com Calceína M e avaliadas por microscopia de fluorescência.

Palavras-chave: cultura de células, PDT, adesão celular
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 há 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.

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).

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).

Os fotossensibilizantes utilizados foram a alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AIPcS₄), obtida da Frontier Scientific Porphyrin, AIPHCl lipossomal cedida pelo Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco (USP-Ribeirão Preto) e Zinco ftalocianina (Sigma-Aldrich).

Para a avaliação da resposta celular frente a PDT, as células foram divididas em 4 grupos:

1. **Controle:** grupo isento de qualquer tratamento.
2. **Laser:** grupo submetido apenas à irradiação.
3. **PDT:** grupo incubado com AIPcS₄, AIPHCl lipossomal e ZnPc e posteriormente irradiado, caracterizando a terapia fotodinâmica.
4. **Fotossensibilizantes:** grupos incubados com os fotossensibilizantes somente.

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. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Culturas de células HEP-2 foram incubadas com 300µL dos fotossensibilizantes AIPcS₄, ZnPc a 10µM e AIPHCl 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 $4,5\text{J}/\text{cm}^2$ e densidade de potência de $30\text{mW}/\text{cm}^2$.

Para o ensaio de adesão célula-célula foi utilizado o marcador de viabilidade celular Calceína AM. A preparação da solução estoque foi feita diluindo o corante em DMSO até a concentração de 1mM e mantida a -20°C . Para uso nas células, a solução estoque foi diluída em meio sem soro na concentração de $2\mu\text{M}$ e utilizada no prazo de 24 horas.

A cultura foi tratada com solução de tripsina/EDTA por aproximadamente 5 minutos. A reação foi neutralizada com meio MEM com 10% de SFB e as células foram centrifugadas por 3 minutos a 2500rpm. O precipitado foi incubado com uma solução de Calceína AM ($2\mu\text{M}$) por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Para a retirada do marcador a amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas com meio MEM sem SFB. A lavagem com MEM foi repetida por mais 2 vezes sendo a última ressuspensão feita com meio MEM com 2% de SFB. Subsequentemente, 10^5 células foram depositadas em cada poço, de uma placa de 96 poços, contendo uma monocamada confluenta de células HEP-2 e então incubadas por 2 horas a 37°C para permitir a adesão. A cultura foi lavada gentilmente 3 vezes com meio sem soro para a retirada das células não aderidas e a contagem das células viáveis aderidas realizada com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica DMLB). Foram contados 3 campos em cada poço com no mínimo 100 células.

Resultados

Para o estudo da interação entre células submetidas aos tratamentos e uma cultura de células HEP-2 em monocamada, fez-se uso do indicador de viabilidade celular Calceína AM. Após os tratamentos, as células foram incubadas por 6, 12, 24 e 48 horas para, então, o ensaio de adesão célula-célula ser realizado.

O comportamento dos grupos controle e Laser em todos os tempos demonstra um aumento crescente de células aderidas ao decorrer dos períodos analisados. As culturas submetidas ao tratamento fotodinâmico após 6, 12, 24 e 48 horas (Fig.1) tiveram o número de células aderidas à monocamada significativamente reduzido ($P < 0,001$) quando comparado às células do grupo controle. No grupo PDT-ZnPc onde as taxas de adesão iniciam-se baixas, decrescem no tempo 12 horas e então, a partir de 24 horas, aumentam gradativamente, sendo observada no período de 48 horas uma queda significativa. Nos grupos

PDT-AIPcS₄ e PDT-AIPHCl, não se chegou a 100 células aderidas por tempo analisado.

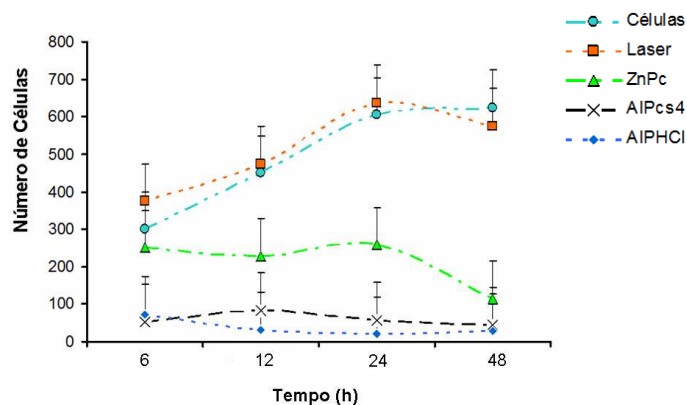


Figura 1 - Ensaio de adesão célula-célula. Após PDT as células foram incubadas por períodos de 6, 12, 24 e 48 horas, ao término destes períodos as culturas foram avaliadas por microscopia de fluorescência, com contagem do número de células aderidas a monocamada.

Discussão

Desde a sua introdução, há 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 à destruição tumoral primária *in vivo* são propostos: a fotoinativação direta da célula tumoral, a destruição vascular e a ativação do sistema imunológico (HASSAN *et al.*, 2000).

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).

Estudos referentes à consequência da terapia nas funções celulares revelaram que a resposta ao estresse pode levar a uma mudança na sinalização por cálcio, no metabolismo de lipídios, na produção de citocinas e proteínas de estresse (NOWIS *et al.*, 2005). Porém pouca atenção é dada para os efeitos da PDT nas propriedades adesivas das células.

As moléculas de adesão celular, que compreendem as caderinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas, são importantes para o crescimento e metástase de muitos cânceres (MCGARY *et al.*, 2002). A sinalização, mediada por essas moléculas, influencia diversos processos celulares incluindo expressão gênica,

ciclo celular e a morte celular programada (APLIN *et al.*, 1998).

Elemento importante no processo de adesão é a proteínas E-caderina. Steinhusen e colaboradores (2001) reportaram a E-caderina como sendo um dos substratos da caspase-3 durante a apoptose, sendo responsável pela clivagem do domínio citosólico da proteína, impedindo a formação do complexo caderina/catenina e comprometendo a adesão célula-célula.

Quando comparamos o comportamento das culturas submetidas a PDT-ZnPc e PDT-AIPHCl, constata-se que a ftalocianina lipossomal interfere de maneira acentuada na adesão célula-célula, sendo mais efetiva que a ftalocianina AIPcS₄, diferentemente na ZnPc que apresentou um numero de células aderidas superior a 200 células, ocorrendo queda neste número somente a partir de 24 horas. Esse comportamento frente à terapia foi observado por Foulter e colaboradores (1994). Utilizando um derivado de hematoporfirina, os autores relataram uma diminuição na adesividade de células de câncer de cólon a uma monocamada de células endoteliais. Galaz e colaboradores (2005) demonstraram que PDT com a Zn(II) ftalocianina foi responsável pela redução na expressão de E-caderina em cultura de queratinócitos primário.

É sabido que células epiteliais dependem de contactos apropriados de adesão célula-célula e célula-matriz para o crescimento e sobrevivência. A PDT demonstrou interferir negativamente na adesão célula-célula, estando o tipo de fotossensibilizante diretamente relacionado a este resultado.

A alteração da adesão entre célula e matriz extracelular (ECM) foi extremamente influenciada por PDT. Observou-se uma queda acentuada do número de células aderidas após o tratamento fotodinâmico, quando o tratamento foi realizado com AIPHCl, acompanhado pela AIPcS₄. 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 mesmo resultados observados com PDT- AIPcS₄. 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- β_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 permitiram concluir que a PDT com o fotossensibilizador AIPcS₄, ZnPc e AIPHCl altera negativamente a adesão célula-célula.

Agradecimentos

FAPESP: 2006/06736-5

Referências

APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K.; JULIANO, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrin, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacological Rev.** v.50, n.2, p.197-263, 1998.

BALL, D.J.; MAYHEW, S.; VERNON, D.I.; GRIFFIN, M.; BROWN, S.B. Decreased efficiency of trypsinization of cells following photodynamic therapy: Evaluation of a role for tissue transglutaminase. **Photochem. Photobiol.** v.73, n. 1, p. 47-53, 2001.

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.

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.

MARGARON, P.; SORRENTI, R.; LEVY, J.G. Photodynamic therapy inhibits cell adhesion without altering integrin expression. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1359, p. 200-210, 1997.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T. AND GOŁĄB, JAKUB. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**. v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

PLATZER, K.; KIESSLICH, T.; KRAMMER, B.; HAMMERT, P. Characterization of the cell death modes and associated changes in cellular energy supply in response to AIPcS₄-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.

RUNNELS, J.M; CHEN, N.; ORTEL, B.; KATO, D.; HASAN, T. BPD-MA-mediated photosensitization in vitro and in vivo: cellular adhesion and β_1 -integrin expression in ovarian cancer cells. **British Journal of the Cancer**. v. 80, n. 7, p.946-953, 1999.

STEINHUSEN, U.; WEISKES, J.; BADDOCK, V.; TAUBER, R.; BOMMERT, K.; HUBERT, O. Cleavage and shedding of E-caderin after induction of apoptosis. **J. of Biol Chem.** v.276, n.7, p.4972-4980, 2001.

UZDENSKY, A.; JUZENIENE, A.; MA, L.-W.; MOAN, J. Photodynamic inhibition of enzymatic detachment of human cancer cells from a substratum. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1670, p.1-11, 2004a.

UZDENSKY, A.; JUZENIENE, A.; KOLPAKOVA, E.; HJORTLAND, G.O.; JUZENAS, P; MOAN, J. Photosensitization with protoporphyrin IX inhibits attachment of cancer cells to a substratum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 322, p. 452-457, 2004b.

UZDENSKY, A.; KOLPAKOVA, E.; JUZENIENE, A.; JUZENAS, P; MOAN, J. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1722, p.43-50, 2005.

VONARX, V.; FOUTIER, M.T.; XAVIER DE BRITO, L.; ANASAGASTI, L.; MORLET, L. AND PATRICE, T. Photodynamic therapy decreases cancer colonic cell adhesiveness and metastatic

potencial. **Res. Exp. Med. (Berl)**. v.195, p.101-116, 1995.

YAN; N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 21, p. 35-56, 2005.