

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA

Andreza C. Siqueira¹, Juliana F. Mangolin¹, Karen C.M. Moraes², Antonio C. Tedesco³, Newton S. Da Silva¹, Cristina Pacheco Soares¹

¹Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP /Laboratório de Cultura Celular e Biologia Tecidual:
Av. Shishima Hifumi, 2911. CEP: 12.211-300. São José dos Campos – SP – Brasil.

E-mail: dreza.sca@bol.com.br

²Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), NUPEB, DECBI, Minas Gerais, Brasil.

karenmoraes_33@hotmail.com

³USP-Ribeirão Preto/Faculdade de Filosofia Ciências e Letras/Departamento de Química, Ribeirão Preto, SP. atedesco@usp.br

Resumo- A TFD é uma técnica que requer a exposição das células a um fotossensibilizante, oxigênio molecular e luz visível com o comprimento de onda compatível com o espectro de absorção do fármaco, esses elementos quando combinados criam uma reação fotodinâmica, resultando em alterações celulares. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão da proteína de adesão E-caderina em células HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana) utilizando como agente fotossensibilizante a Zinco Ftalocianina (ZnPc), Alumínio Ftalocianina Tetra Sulfonada (AIPcS₄) e Cloro Alumínio Ftalocianina Lipossomal (AIPHCl). As células foram incubadas com os agentes fotossensibilizantes (AIPcS₄, ZnPc a 10µM e AIPHCl lipossomal a 2,5 µM), e submetidas a irradiação utilizando laser de diodo (λ de 660nm, 30mW, 4,5J/cm², 30mW/cm²). Posteriormente as células foram submetidas à marcação 6, 12 e 24 horas após a terapia, com o anticorpo primário mouse anti-E-caderina e anti-mouse conjugado com FITC. Com exceção da TFD-AIPHCl no tempo de 24 horas, a TFD com o fotossensibilizador AIPcS₄, ZnPc e AIPHCl, alterou negativamente a expressão de E-caderina.

Palavras-chave: Cultura de células, Ftalocianinas, Terapia Fotodinâmica, E-caderina.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica para o tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas, caracterizado pelo crescimento exagerado de células não desejadas ou anormais. A técnica envolve ativação pela luz, na presença de oxigênio molecular, de certos corantes (fotossensibilizantes) que são de algum modo seletivamente absorvidos pelo tecido alvo. (HASSAN; MOOR; ORTEL, 2000). Este procedimento induz a inúmeras respostas celulares, incluindo a de morte celular.

Almejando destacar o potencial e estender a aplicação clínica, uma segunda geração de fotossensibilizantes (FSs), dentre eles as ftalocianinas, tem sido requerida para a terapia contra o câncer, essas constituem uma extensa classe de componentes com alto coeficiente de absorção (630-750 nm) (MARTINES *et al.*, 2007) o que permite maior absorção da luz em tecidos biológicos, apresentando assim excelentes propriedades de localização tumoral e alta eficiência fotossensibilizante (SIBATA *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2004).

Dentre os processos desencadeados pela TFD, a alteração na adesão das células de câncer a um

substrato ou a células é uma consequência importante da terapia (CASTANO *et al.*, 2004). 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).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão da proteína de adesão E-caderina em células HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana) utilizando como agentes fotossensibilizantes a Zinco Ftalocianina (ZnPc), Alumínio Ftalocianina Tetra Sulfonada (AIPcS₄) e Cloro Alumínio Ftalocianina Lipossomal (AIPHCl).

As caderinas são responsáveis por ligações homofílicas célula-célula (LODISH *et al.*, 2003), e alterações transitórias ou permanentes na expressão de E-caderina, tem demonstrado ser de grande importância no processo de metástase tumoral (HARINGTON; SYRINGOS, 2000). Devido a isso, foi observada a expressão das mesmas pela técnica de microscopia de fluorescência, visto que a perda de expressão de E-caderina pelas células reduz a aderência entre elas, resultando na migração dessas.

Metodologia

Para realização do experimento as células foram divididas em quatro grupos, sendo:

Grupo 1: Controle isento de qualquer tratamento;

Grupo 2: ZnPc, incubado com ZnPc, AIPcS₄ e AIPHCl e mantido na ausência de luz;

Grupo 3: Laser, submetido apenas à irradiação;

Grupo 4: TFD, incubado com ZnPc, AIPcS₄ e AIPHCl e posteriormente irradiado, caracterizando a Terapia Fotodinâmica.

Células HEp-2 foram cultivadas em placas com lamínulas, na concentração de 10⁶ células/poço e incubadas com os 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 com PBS (Solução Salina Tampão Fosfato), para a retirada do fotossensibilizante excedente, e a ela adicionada meio MEM (Meio Mínimo Essencial) sem SFB (Soro Fetal Bovino) 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/cm² e densidade de potência de 30mW/cm².

Posterior a irradiação, o PBS foi substituído por meio de cultura MEM (Meio Mínimo Essencial) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e 1% de antibiótico, e as células foram incubadas por 6, 12 e 24 horas a 37°C em atmosfera umidificada, com 5% de CO₂.

Após o período de incubação as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, bloqueadas com BSA e incubadas por 1 horas com anticorpo primário mouse anti-E-caderina (diluição 1:100) por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas com PBS contendo 2% de soroalbumina bovina e incubado com anti-mouse conjugado com FITC (1:100). As lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em lâminas contendo N-propil-galato. As lâminas montadas foram analisadas com o auxílio do microscópio de fluorescência (Leica DMLB) acoplado a um sistema fotográfico (Leica MPS-30).

Resultados

A expressão de E-caderina foi acompanhada através da técnica de microscopia de fluorescência, utilizando como marcador anticorpo primário mouse anti-E-caderina e anti-mouse conjugado com FITC, que marcam os receptores da membrana celular.

A análise das células submetidas a TFD com AIPcS₄, e marcadas com anticorpo anti-E-caderina revelam a ação do tratamento na interação entre as células, revelando que com o passar do tempo de incubação pós-TFD as células apresentam espaços entre as membranas e E-caderina presente na forma de pequenos grânulos concentrados nos contatos intercelulares (Fig. 1.B, C, D).

Pode ser observado interação entre as células submetidas a TFD com ZnPc após o período de 6 horas (Fig. 1.E), sendo que nos períodos de 12 e 24 horas verifica-se uma dispersão de grânulos para a região perinuclear (Fig. 1.F, G).

As células submetidas a TFD com AIPHCl (Fig.1.H), apresentam no período de 6 horas padrão semelhante ao encontrado com a ZnPc 12 horas. Com 12 horas não é possível observar interação entre as células, somente a presença de E-caderina em células isoladas (Fig. 1.I). Após 24 horas é possível observar interação entre células com forte expressão de E-caderina (Fig.1.J).

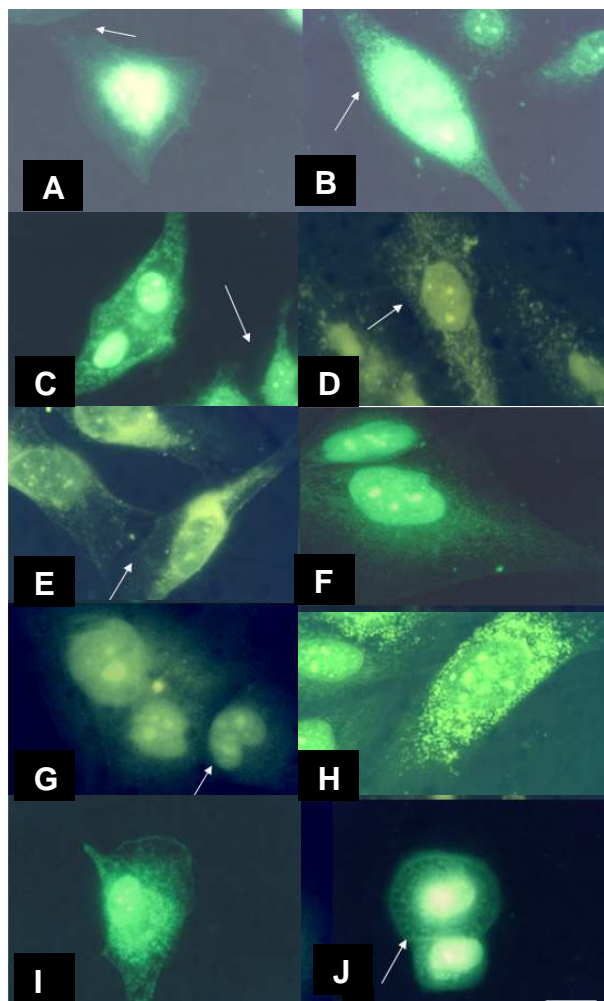


Figura 1: Imunofluorescência para E-caderina. Células HEp-2 submetidas a TFD foram marcadas com anticorpo anti-E-caderina e incubadas com

anti-mouse fluorescente, após os períodos de 6, 12 e 24 horas.

(A) controle demonstrando a presença de interação entre as células (seta).

(B, C, D) TFD- AIPcS₄ após 6, 12 e 24 horas respectivamente, observa-se ausência de interação entre as células, com a distribuição de pequenos grânulos no citoplasma acompanhando o contorno celular (seta).

(E, F, G) TFD-ZnPc após 6, 12 e 24 horas respectivamente, observa-se que após 6 horas ainda ocorre interação entre as células vizinhas (seta). Com 12 e 24 horas observa-se uma dispersão de grânulos de E-caderina para a região perinuclear.

(H, I, J) TFD-AIPHCl após períodos de 6, 12 e 24 horas respectivamente. Após 6 horas é possível verificar a presença de pequenos grânulos próximos a região intercelular (seta). No período de 12 horas verifica-se a presença dos grânulos, com ausência de células vizinhas. Após 24 horas, observa-se forte expressão de E-caderina entre células adjacentes (seta). Barra=10µm.

Discussão

Desde a sua introdução até cerca de duas décadas, a TFD tem se tornado progressivamente uma técnica estabelecida para o tratamento de cânceres e, mais recentemente, outras doenças (PLATZER *et al.*, 2002). Este procedimento induz a inúmeras respostas celulares, incluindo a de morte celular. Inúmeras moléculas de adesão estão envolvidas nesse processo e a expressão anormal dessas moléculas pode levar ao aumento ou decréscimo do potencial metastático.

Um elemento importante no processo de adesão é a proteína E-caderina. As caderinas compreendem uma larga família dependente de Ca²⁺, são responsáveis por ligações homofílicas célula-célula (LODISH *et al.*, 2003). Essas moléculas aparecem no início do desenvolvimento e mudanças na expressão de seus subtipos são essenciais na segregação de células para a formação de tecidos distintos, além de ter papel chave na manutenção da integridade tecidual em organismos adultos (STEINHUSEN *et al.*, 2001; MACGARY; LEV; BAR-ELI, 2002).

No presente estudo, a expressão de E-caderina se mostrou comprometida devido aos espaços entre as membranas, e a presença de E-caderina na forma de pequenos grânulos. Os efeitos da TFD com AIPcS₄ demonstraram serem mais acentuados já que, quando utilizado ZnPc observou-se a interação entre as células no período de 6 horas após o tratamento, e com AIPHCl esta interação é observada 24 horas após o tratamento.

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 TFD com a Zn(II) ftalocianina foi responsável pela redução na expressão de E-caderina em cultura de queratinócitos primário.

Alterações, transitórias ou permanentes, na expressão de E-caderina tem demonstrado ser de grande importância no processo de metástase tumoral (HARINGTON; SYRINGOS, 2000). Na progressão de tumores uma diminuição ou perda da expressão de E-caderina nas células neoplásicas levaria a redução da aderência dessas células entre suas vizinhas resultando na migração da mesma (BEAVON, 1999).

É sabido que células epiteliais dependem dos contatos apropriados de adesão célula-célula e célula-matriz para o crescimento e sobrevivência. A TFD demonstrou interferir negativamente na adesão célula-célula, estando o tipo de fotossensibilizante diretamente relacionado a este resultado. Essa perda na expressão de E-caderina tem sido documentada em vários tipos de câncer (BEAVON, 1999) incluindo os da região do pescoço (MATTIJSEN, *et al.*, 1993; ANDREWS *et al.*, 1997).

Conclusão

A TFD com o fotossensibilizador AIPcS₄, ZnPc e AIPHCl altera negativamente a expressão de E-caderina.

Agradecimentos

CNPq auxílio Bolsa PIBIC
FAPESP: 2006/06736-5
FAPESP: 2008/06654-4

Referências

- ANDREWS, N.A.; JONES, A.S.; HELLIWELL, T.R., et al. Expression of the E-cadherin-catenin adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. **Br. J. Cancer.** v. 75, p. 1474-80, 1997.
- BEAVON, I.R.G. Regulation of E-cadherin: does hypoxia initiate the metastatic cascade?. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.** v.52, p. 179-188, 1999.
- 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.

- FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C.; SOUSA G.; ZÂNGARO, R.A.; SILVA, N.S.; PACHECO, M.T.T.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament after PDT with AIPsS4. **Lasers in Medical Science.** v. 18, p. 207-212, 2004.

- FOULTIER, M.T.; VONARX-COINSMAN, V.; CORDEL, S.; COMBRE, A.; PATRICE, T. Modulation of colonic cancer cell adhesiveness by hematoporphyrin derivative photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v. 23, p. 9-17, 1994.

- GALAZ S.; ESPADA J. STOCKERT J.C.; PACHECO M.; SANZ-RODRIGUEZ F.; ARRANZ R.; RELLO S.; CANETE A.; VILLANUEVA A.; ESTELLES M.; JUARRANZ A. Loos of E-cadherin mediated cell-cell adhesion as an early trigger of apoptosis induced by photodynamic treatment. **J. Cellular Physiol.** v. 205, p. 86-96, 2005.

- HARRINGTON, K.J.; SYRIGOS, K.S. The role of E-cadherin-catenin complex: more than an intracellular glue? **Annals of Surgical Oncology.** v.7, n.10, p.783-788, 2000.

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

- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSIDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; DARNELL, J. E. 5a edição. **Molecular Cell Biology.** W.H. Freeman & Co, 2003.

- MACGARY, E.C.; LEV, D.C.; BAR-ELI, M. Cellular adhesion pathways and metastatic potencial of human melanoma. **Cancer Biology and Therapy.** v. 1, n.5, p.459-465, 2002.

- MARTINES, N.S.; MACHADO, A.H.A; DA SILVA, N.S; TEDESCO, A.C; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO-SOARES, C. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. **Arquivos Catarinenses de Medicina** Vol.36, no.1, 2007

- MATTIJSSSEN, V.; PETERS, H.M.; SCHALKWIJK, L., et al. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. **Int. J. Cancer.** v. 55, p. 580-5, 1993.

- 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.

- SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L. AND KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Bras. Jour. Of Medical and Biological Research.** V.33, p.869-880, 2000.

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