

OBTENÇÃO DE CLONES RESISTENTES A TERAPIA FOTODINÂMICA

**Juliana F. Mangolin¹, Andreza C. Siqueira¹, Karen C. Moraes², Antônio C. Tedesco³,
Cristina Pacheco Soares¹, Newton S. da Silva¹.**

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

E-mail: julianamangolin@hotmail.com

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 Terapia Fotodinâmica 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. Almejando destacar o potencial e estender a aplicação clínica, uma geração de fotossensibilizantes, dentre eles a ftalocianina, tem sido requerida para a terapia do câncer. Com o intuito de avaliar as alterações no potencial metastático de células HEP-2 após a terapia fotodinâmica com diferentes fotossensibilizantes e avaliar a capacidade de formação de colônias das células sobreviventes a TFD, ensaios foram realizados e verificou-se que em relação as ftalocianinas ZnPc e ALPHCl, a AIPcS₄ se apresenta mais efetiva, porém o ensaio clonogênico demonstra que as três ftalocianinas, favorecem a formação de colônias resistentes a TFD.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Ftalocianinas, Ensaio Clonogênico

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Define-se tumor, sinônimo de neoplasma ou blastoma, como o crescimento anormal de tecidos. Células doentes, com um distúrbio genético, passam a se reproduzir mais rapidamente do que as células normais levando à formação do tumor, podendo este ser benigno ou maligno. Diante dos graves efeitos colaterais e da eficiência limitada das terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia) outras alternativas estão sendo constantemente propostas na área de oncologia (cancerologia). Dentre estas se destaca a terapia fotodinâmica (TFD), uma modalidade relativamente nova no tratamento de câncer (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A combinação droga mais luz forma a base da TFD. Um composto fotossensível é introduzido no paciente e se acumula preferencialmente em células que se reproduzem rapidamente. Essas são posteriormente irradiadas, via laser através de um cateter de fibra óptica, junto ao tecido doente. A luz (tipicamente 600 a 800 nm) ativa o composto, gerando formas de oxigênio tóxicas que necrosam ou afetam convenientemente o tumor, levando-o ao colapso e à ação curativa do paciente (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Almejando destacar o potencial e estender a aplicação clínica, uma geração de

fotossensibilizantes, dentre eles a ftalocianina, tem sido requerida para a terapia do câncer. O interesse crescente por essa nova classe de FSs é justificado pelo alto coeficiente de absorção (630-750nm) permitindo uma maior penetração da luz em tecidos biológicos (CAHN *et al.*, 2001).

A resposta das células decorrente da aplicação da TFD é dependente da localização subcelular do fotossensibilizante (KESSEL; LUGUYA; VICENTE, 2003; TIJERINA; KOPECKOYA; KOPECEK, 2003; FEOFANOV *et al.*, 2004). É sabido que as células podem responder aos danos desencadeados pela TFD iniciando uma resposta de resgate ou ativando o processo de morte celular, seja por apoptose ou necrose (MOOR, 2000).

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 (AIPcS₄) e Zinco ftalocianina, tendo como objetivo específico avaliar a capacidade de formação de colônias das células sobreviventes a TFD.

Metodologia

Para o presente estudo foi utilizada a linhagem celular HEP-2 (CCL-23 ATCC-USA). Essa

linhagem 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). O meio de cultura MEM (meio mínimo essencial) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) foi utilizado para manutenção da cultura e devidamente esterilizado e estocado a 4°C.

As células foram rotineiramente cultivadas em garrafas de cultura de 25cm² juntamente com o meio de cultura e mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. A cultura foi subcultivada com tripsina 0,025% em ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,02% de forma a manter sua fase de crescimento exponencial.

O fotossensibilizante utilizado foi a alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AIPcS₄). A droga foi inicialmente diluída em PBS (Solução Salina Tampão Fosfato) na concentração de 1mM, pH7.2 e estocada a 4°C protegida da luz. Para sua utilização em cultura, a solução estoque de 1mM foi esterilizada por calor úmido e então diluída na concentração final de 10µM em meio MEM sem SFB.

Para a avaliação da resposta celular frente a TFD as células foram divididas em 4 grupos, sendo eles: 1. Controle: grupo isento de qualquer tratamento, 2. Laser: grupo submetido apenas à irradiação, 3. TFD: grupo incubado com AIPcS₄, AIPHCl lipossomal e ZnPc e posteriormente irradiado, caracterizando a terapia fotodinâmica.

Culturas de células HEP-2 foram incubadas com os fotossensibilizantes AIPcS₄, ZnPc a 10µM e AIPHCl lipossomal a 2,5µM por 60 minutos a 37°C. Após o período de incubação a cultura foi lavada com PBS para a retirada do fotossensibilizante excedente, e a ela adicionada 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/cm² e densidade de potência de 30mW/cm².

Para o ensaio clonogênico, as células foram plaqueadas na concentração de 100-200 células/poço e incubadas por 4 horas permitindo a adesão das células antes da TFD. Após a TFD as células foram incubadas por 7 dias e as colônias foram marcadas com solução contendo 0,5% de azul de metileno e 70% de etanol. Colônias com mais de 30 células foram consideradas. O mesmo procedimento foi realizado para os grupos Controle, Laser e Fotossensibilizante. A fração de sobreviventes foi calculada como a percentagem

de colônias formadas no grupo TFD comparada com o grupo Controle.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados

Para avaliar o comportamento das células sobreviventes a TFD, foi realizado o ensaio clonogênico com cultivo das células após o tratamento de TFD com os diferentes fotossensibilizantes.

Os resultados obtidos após 7 dias de incubação permitiu constatar a presença de colônias resistentes a TFD (Fig.1), sendo observado um comportamento semelhante das células tratadas com laser e incubadas com o fotossensibilizante AIPcS₄. O tratamento com ZnPc e AIPHCl apresentou uma redução na porcentagem de clones, sendo que a AIPHCl, permaneceu na faixa de 50%. As células submetidas a TFD-AIPHCl e TFD-ZnPc apresentaram próximo de 21% de colônias resistentes a PDT, sendo que TFD-AIPcS₄ apresentou um resultado de 14% de colônias sobreviventes.

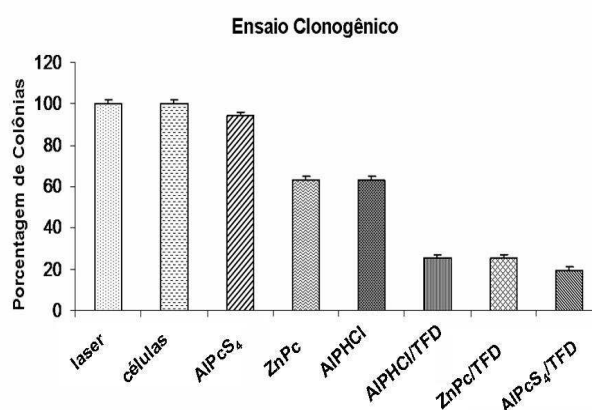


Figura 1. Ensaio clonogênico demonstrando a ação dos diferentes fotossensibilizantes sobre a cultura de células Hep-2. Os três fotossensibilizantes utilizados não obtiveram 100% de morte celular.

Discussão

O objetivo da TFD é não apenas destruir as células tumorais (DOUGHERTY *et al.*, 1998; OCHSNER, 1997; FERREIRA *et al.*, 2004) como também reduzir a metástase do câncer (GOMER *et al.*, 1987; ROUSSET *et al.*, 1999). Casas e colaboradores, 2008 descreveram a diminuição do fenótipo metastático em clones sobreviventes da

terapia, o que vem reforçar a necessidade de ensaios clonogênicos e subsequente avaliação destes a novas aplicações, para melhor desempenho clínico.

Com o intuito de avaliar o comportamento das células sobreviventes a TFD para a formação de novas colônias celulares, foram realizados ensaios clonogênicos das culturas submetidas a TFD-AIPcS₄, TFD-ZnPc e TFD-AIPHCl. Os resultados obtidos demonstram que as poucas células sobreviventes aos tratamentos ao término de 7 dias apresentam capacidade de multiplicação, o que nos permite constatar a possibilidade de migração para outras regiões do organismo.

Embora estejamos trabalhando com células isoladas, podemos extrapolar este resultado para *in vivo* uma vez que não foi avaliado o comportamento destas células frente ao sistema imunológico.

Os resultados aqui apresentados favorecem uma visão de como é o comportamento das células sobreviventes a TFD. Mesmo em número reduzido tais células apresentam capacidade de mitose, o que seria indesejável no tratamento para eliminação de células tumorais. Seguindo a linha de raciocínio de Casas e colaboradores, mais estudos são necessários para melhor compreensão do genótipo e fenótipo destas células bem como o comportamento de células de defesa, como macrófagos, na eliminação das mesmas, impedindo a migração para outras regiões do organismo.

Em estudos anteriores, utilizando somente AIPcS₄ verificamos que a mesma induz danos que comprometem a adesão celular, reduzindo o potencial metastático. Com o estudo comparativo verificamos que em relação às ftalocianinas ZnPc e AIPHCl, ela ainda se apresenta mais efetiva, porém o ensaio clonogênico demonstra que as três ftalocianinas, favorecem a formação de colônias resistentes a TFD.

Conclusão

Em relação às ftalocianinas ZnPc e AIPHCl, a AIPcS₄ se apresenta mais efetiva, porém as três ftalocianinas favorecem a formação de colônias resistentes a TFD.

Agradecimentos

Ao CNPq auxílio bolsa PIBIC.

Fapesp: 2006/06736-5

Referências

- CAHN, W.S.; BRASSEUR, N.; LA MADALEINE, C.; QUELLET, R.; VAN LIER, J.E. Current satatus

of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **European J. of Cancer**. v.33, p. 1855-1860, 2001.

- 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.

- 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.

- 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.

- FEOFANOV, A.; SHARONOV, G.; GRICHINE, A.; KARMAKOVA, T.; PLJUTINSKAYA, A.; LEBEDEVA, V.; RUZIYEV, R.; YAKUBOVSKAYA, R.; MIRONOV, A.; REFREGIER, M.; MAURIZOT, J.C.; VIGNY, P. Comparative study of photodynamic properties of 13,15-N-cycloimide derivatives of chlorin p6. **Photochem. Photobiol**. v.79, p.172-188, 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.

- 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.

- KESSEL, D.; LUGUYA, R.; VICENTE, M.G. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distribution. **Photochem. Photobiol**. v.78, p.431-435, 2003.

- LIU HF, XU SZ, ZHANG CR. Influence of CaNa₂ EDTA on topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. **Chin Med J**. v.117, n.3, p. 922-926, 2004.

- MAGGIORELLA, L.; WEN, B.; FRASCOGNA, V.; OPOLON, P.; BOURHIS, J.; DEUTSCH, E.

Combined radiation sensitizing and anti-angiogenic effects of ionizing radiation and the protease inhibitor ritonavir in a head and neck carcinoma model. **Anticancer Res.** v. 25, n. 6, p. 4357-62, 2005.

- MILANESIO M.E., ALVAREZ M.G., RIVAROLA V., SILBER J.J., DURANTINI E.N. Porphyrin-fullerene C60 dyads with high ability to form photoinduced charge-separated state as novel sensitizers for photodynamic therapy. **Photochem Photobiol.** v. 81, n.4, p. 891-897, 2005.

- MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J. Photochem. And Photobiol.** v.57, p.1-13, 2000.

- OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy. **J. of Photochem. and Photobiol.** v. 39, p. 1-18, 1997.

- 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.

- SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. **Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. Quim. Nova,** Vol. 25, No. 5, 801-807, 2002.

- SUN, Y.; XIE, M.; LIU, M.; JIN, D.; LI, P. Growth suppression of human laryngeal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated tissue factor pathway inhibitor gene 2. **Laryngoscope.** v. 116, n. 4, p. 596-601, 2006.

- TIJERINA, M.; KOPECKOVA, P.; KOPECEK, J. Mechanisms of Cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells exposed to free Mce6 or HPMA copolymer-Mce6 conjugates. **Photochem. Photobiol.** v.77, p.645-652, 2003.