

MARCADORES MOLECULARES DA VIA DA APOPTOSE CELULAR RELACIONADOS COM O EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM CARCINOMAS MAMÁRIOS

Jéssica Camila da Silva, Luciana Marques de Paula, Fernanda Aparecida dos Santos, Letícia Corrêa Fontana, Leandro Raniero, Juliana Ferreira, Renata de Azevedo Canevari.

Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, IP&D - Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP,
Av Shishima Hifumi, 2911 - São José dos Campos, SP, Brasil, 12244-000

jeeh_biomedica@yahoo.com.br

Resumo - O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo sendo a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma opção para o sucesso no tratamento de tumores sólidos, podendo constituir uma alternativa para redução tumoral. O objetivo deste trabalho é buscar marcadores moleculares envolvidos na via da apoptose celular que podem estar relacionados ao efeito da TFD em carcinomas mamários. A extração de RNA foi realizada utilizando-se o protocolo *RNeasy Lipid Tissue* (Qiagen) em 25 carcinomas mamários de 13 ratas, sendo 13 amostras de ratas que foram submetidas a TFD e 12 amostras que não receberam tratamento (grupo controle). A síntese de cDNA foi realizada pelo sistema de pré-amplificação *RT² First Strand Kit* (Qiagen) e a avaliação de alterações de expressão gênica foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) na plataforma *Rat Apoptosis RT² Profiler™ PCR Array* (SA Bioscience, USA). Um total de 11 genes apresentaram expressão alterada quando comparados os dois grupos. Este estudo sugere que a alteração na expressão de determinados genes pertencentes a via metabólica da apoptose podem explicar a rápida eliminação tumoral que ocorre após a TFD..

Palavras-chave: *marcador molecular, expressão gênica, qRT-PCR, apoptose, terapia fotodinâmica,*
Área do Conhecimento: *Biomedicina*

Introdução

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo sendo a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, a estimativa do número de casos novos de câncer de mama esperados no Brasil, em 2010, foi de 49.240 com um risco estimado de 49 casos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2010).

Este tumor é uma doença heterogênea sendo caracterizado por distintas aparências morfológicas, apresentação clínica e alterações genéticas. A heterogeneidade celular e molecular destes tumores é também evidenciada pelo grande número de genes relacionados ao controle do crescimento, morte e diferenciação celular.

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente de bom prognóstico, se tratado e diagnosticado oportunamente, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil, provavelmente pela doença ainda ser diagnosticada em estágios avançados.

A terapia fotodinâmica (TFD) é umas das novas opções de tratamentos em vários tipos de câncer, pois não acarreta tantos efeitos colaterais como a quimioterapia e radioterapia, além de não comprometer a função do órgão como pode ocorrer na remoção cirúrgica. A TFD possui a característica de induzir a citotoxicidade celular, utilizando a luz, um fotossensibilizador e o oxigênio molecular presente no tecido (BAGNATO, 2002).

Para a aplicação da TFD, busca-se a otimização de protocolos clínicos e experimentais, estabelecendo condições ideais para a aplicação da droga no paciente (concentração da droga, dose de luz, fracionamento de luz, intervalo de tempo entre a administração da medicação e a iluminação). Geralmente, a TFD é utilizada como terapia paliativa ou terapia primária, dependendo das indicações específicas. Atualmente, a TFD pode ser utilizada em associação a outros tratamentos como a quimioterapia, remoção cirúrgica, radioterapia ou outras terapias mais recentes como a terapia anti-angiogênica (OLEINICK et al, 2001).

A apoptose celular é o principal evento encontrado em todos os tecidos tumorais tratados pela TFD, onde ocorre uma rápida eliminação tumoral resultante da indução da apoptose pela terapia (OLEINICK et al, 2001). Em adição, quando desregulada, a apoptose pode contribuir para o aparecimento de várias doenças neoplásicas (BERGE et al., 2010; HEIJINK et al., 2011).

A avaliação da expressão gênica de genes relacionados a via da apoptose celular poderá contribuir para o desenvolvimento de marcadores moleculares que podem estar relacionados ao mecanismo de ação da TFD. Portanto, o objetivo deste estudo é pesquisar alterações na expressão de genes pertencentes a via metabólica da apoptose nos tecidos submetidos a TFD com o intuito de possibilitar o melhor entendimento de um dos mecanismos biológicos da TFD e da carcinogênese mamária

Metodologia

Animais

Este estudo segue as políticas e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo animais e os princípios éticos sobre a experimentação animal, editado pelo Comitê Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA) e obteve a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba (protocolo A09/CEAU/2010).

Foram utilizadas 13 ratas fêmeas da linhagem Sprague-Dawley, virgens, pesando entre 175 g a 200 g, obtidas do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica, UNICAMP. Os animais foram acondicionados em caixas de policarbonato especiais, no Laboratório de Terapia Fotodinâmica, UNIVAP, sendo mantidos três a cinco animais por caixa. As condições ambientais foram de temperatura ambiente, com 50 % de umidade, e ciclo de 12 horas de claro e escuro. Os animais foram alimentados com ração específica e água *ad libitum* por todo o experimento.

A neoplasia mamária foi induzida nas ratas com o 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) na dose de 70 mg/kg dissolvido em óleo de soja, e administrado por gavagem. Então, esses animais foram submetidos à inspeção de viabilidade diária e ao exame clínico realizado semanalmente, a palpação, até o desenvolvimento do tumor.

Os animais foram separados em dois grupos: GC (grupo controle) com 12 amostras provenientes de sete ratas com tumor de mama não tratado e G1 (grupo experimental) com 13 amostras provenientes de seis ratas submetidas à TFD e mortas após 48 horas. Todas as amostras

tumorais foram estocadas a -80°C para a análise de expressão gênica.

Terapia fotodinâmica

Para a aplicação da TFD, a fonte de luz utilizada foi o laser de diodo 660 nm (QuantumTech®) para excitação das clorinas. O laser foi acoplado a uma fibra óptica para a iluminação direta e intersticial. O fotossensibilizador utilizado foi a clorina *Photodithazine®* (PDZ), obtida a partir de uma cianobactéria *Spirulina platensis* e com estrutura modificada através da adição de N-metil-D-glicosamina 0,5% como um agente solubilizante e estabilizante.

Os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas, tendo livre acesso à água. Em seguida foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução estéril de cloridato de Ketamina a 5% (Vetanarcol® - Konig) na dose de 0,08 mg/kg de peso corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de xilazina 2 g (Coopazine® - Coopers) na dose de 0,04 mg/kg.

O fotossensibilizador foi diluído em soro fisiológico 0.9%. Os animais foram fotossensibilizados por via intraperitoneal na dose de 8 mg/Kg. A iluminação do tumor foi intersticial através de uma fibra óptica difusora acoplada ao laser. Os parâmetros de iluminação adotados foram: intensidade de 100 mW/cm e 100 J/cm de dose de luz.

Análise de expressão gênica

A extração e purificação do RNA foram realizadas utilizando-se o *Rneasy Lipid Tissue* (Qiagen). A quantificação e a qualidade do RNA foram avaliadas utilizando-se o NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade) e a eletroforese em gel de agarose, respectivamente.

Para cada experimento de qRT-PCR foi utilizado 1 µg de RNA total de cada amostra. Após a digestão do DNA (*RNase-Free DNase Set*, Qiagen) foi realizada a síntese de cDNA pelo sistema de pré-amplificação *RT² First Strand kit* (Qiagen). A detecção de alterações de expressão gênica pela PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi realizada no equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, USA) e na plataforma *Human Apoptosis RT² Profiler™ PCR Array* (Super-Array, USA). Esta plataforma é constituída por 84 genes chaves envolvidos na modulação dos processos biológicos da apoptose. Todas as placas contêm um controle de DNA genômico (GDC), três controles de transcrição reversa (RTC) e três controles positivos da PCR, onde seus valores

foram utilizados nos cálculos para determinação da expressão de cada gene alvo presente na placa.

A qRT-PCR foi realizada num volume de 25µl para cada poço da plataforma de *PCR array*, contendo os reagentes: RT² qPCR Master Mix, a diluição da reação de síntese de cDNA fita simples e água livre de nuclease. As condições da PCR consistiu em um programa de ciclagem de duas etapas, com um ciclo inicial à 95°C durante 10 minutos para ativar a DNA polimerase, seguido de 40 ciclos de 15s à 95°C e 1 minuto à 60°C imediatamente após o programa de ciclagem foi realizada a curva de dissociação para possibilitar a detecção de produtos inespecíficos e a formação de *primers-dimer*.

Análise dos resultados

Após a realização da qRT-PCR, a *baseline* foi definida automaticamente para cada placa e o valor do threshold (CT) foi posicionado acima do sinal de *background*, mas dentro de um terço até a metade da fase linear da amplificação. Os *thresholds* definidos foram os mesmos em todas as corridas PCR arrays. Os dados com os valores de *thresholds* foram exportados para serem posteriormente analisados pelo programa *RT² Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.3* (SABiosciences).

Para fazer a comparação dos grupos, foi realizado o cálculo do *fold change* ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$), que consiste no valor da expressão do gene normalizado ($2^{(-\Delta Ct)}$) na amostra do grupo experimental dividido pela expressão do gene normalizado ($2^{(-\Delta Ct)}$) na amostra do grupo controle, para cada gene. Os valores de *fold-change* maior que 1 indicou um aumento de expressão gênica. Os valores de *fold-change* menor que 1 indicou uma diminuição de expressão gênica.

Resultados

A quantificação do RNA foi realizada imediatamente após sua extração, onde todas as amostras de RNA extraídas apresentaram razão de 260/280 nm entre 1,8 e 2,0, indicando pureza das mesmas (PALMA *et al.*, 2008). Para a avaliação da qualidade do RNA extraído, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de agarose a 1% e tiocianato de guanidina (1M), corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e posterior visualização em luz ultravioleta. Na figura é ilustrado os resultados da eletroforese onde se observa a integridade do RNA pelas bandas de RNA ribossômico 18S e 28S.



Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1% onde se observa a integridade do RNA pelas bandas de RNA ribossômico 18S e 28S.

Considerando os controles utilizados nas plataformas PCR array, o controle de transcrição reversa (RTC) indicou que não houve contaminação no RNA das amostras, onde o valor de $\Delta Ct = \text{AVG Ct}^{\text{RTC}} - \text{AVG Ct}^{\text{PPC}}$ foi menor que 5 em todas as placas analisadas, indicando a ausência de inibição da reação. O valor do controle positivo da PCR (PPC) não variou mais que dois ciclos quando comparadas as placas, com média de 20,01 +/- 1,56 para o grupo controle (GC) e de 20,58 +/- 1,78 para o grupo experimental (G1), mostrando assim que não houve impureza na amostra de RNA que afetasse a amplificação da PCR. Em adição, foi verificada a consistência e a alta reprodutibilidade entre as diferentes placas de PCR array analisadas, demonstrada pela baixa variação entre as médias das replicas dos controles RTC e PPC que não chegou a ultrapassar um ciclo.

Dos 84 genes analisados pertencentes à via da apoptose celular, um total de 11 genes apresentaram expressão alterada quando comparados os dois grupos (Figura 2). Os genes *HRK*, *BIK*, *CASP14*, *CIDEA*, *GADD45a*, *TNF* e *CASP1* apresentaram expressão aumentada (valor de *fold change* superior a 2) e os genes *BIRC5*, *CASP6*, *TNFRSF11b* e *TP53* apresentaram diminuição de expressão (valor de *fold change* menor que 1) no grupo de tratamento (G1) em relação ao grupo controle (GC) (teste *t-Student*, $P < 0,05$). Na figura 2 é mostrado a comparação dos 11 genes com expressão diferencial.

Os genes *NOL3* e *PROK2* também apresentaram aumento de expressão no grupo submetido a TFD (G1) em relação ao grupo controle, contudo essa diferença não foi significativa. (teste *t-Student's*, $P < 0,05$). O gene *TP731* apresentou diminuição de expressão no grupo após tratamento (G1) em relação ao grupo controle (GC), contudo essa diferença não foi significativa.

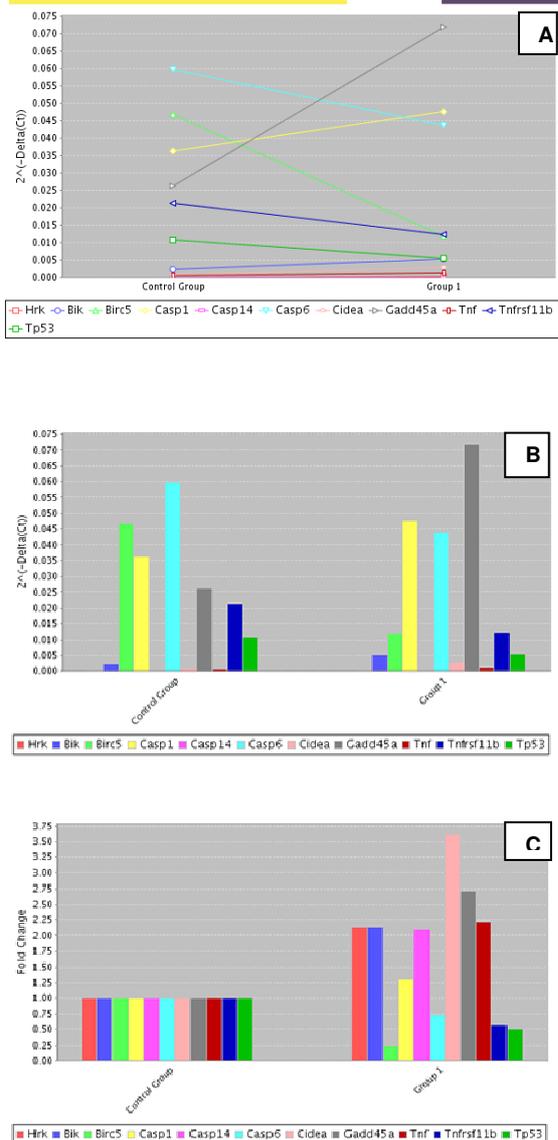


Figura 2 - Comparação da expressão relativa dos 11 genes da via da apoptose em que foi detectado expressão diferencial quando comparados o grupo controle (GC) com o grupo submetido a TFD (G1). As figuras A e B retratam os valores do nível de expressão relativa de cada gene ($2^{-\Delta Ct}$) entre amostras do grupo controle e amostras do grupo 1. A figura C ilustra o *fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), que consisti no valor da expressão do gene normalizado ($2^{-\Delta Ct}$) na amostra do grupo 1 dividido pela expressão do gene normalizado ($2^{-\Delta Ct}$) na amostra do grupo controle.

Discussão

A maioria dos genes em que foi detectada a expressão diferencial são pró-apoptóticos, com exceção dos genes *NOL3*, *PROK2*, *TNFRSF11b* e *BIRC5*. Este último age como um inibidor da morte celular prevenindo a atividade de caspases em qualquer um dos grupos de proteases envolvidas na apoptose. Este fato explica a

deteção no grupo G1 (grupo de animais que foi realizado a TFD) da diminuição de expressão de *BIRC5*, onde estudos em literatura demonstraram que ocorre o aumento da apoptose celular em tumores submetidos a TFD. Os genes *CASP6*, *TNFRSF11b* e *TP53* também apresentaram diminuição de expressão no grupo G1. Estes genes, além de participarem da via da apoptose celular, possuem várias funções, tais como reparo celular, necrose, entre outras.

Para se descobrir com maior confiabilidade e precisão o papel dos genes da via da apoptose celular nos tumores submetidos à TFD e com isso buscar marcadores moleculares que efetivamente estão envolvidos com o efeito dessa terapia na redução tumoral e em alguns casos, como relatados em literatura, na resistência e recidiva tumoral, neste estudo a casuística será aumentada, bem como será avaliado tumores recidivados e tecidos mamários normais. Desse modo, após esta etapa acreditamos que será possível a obtenção de um maior entendimento da relação entre a expressão diferencial de genes da via da apoptose celular e o mecanismo de ação da TFD na carcinogênese mamária.

Conclusão

Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos em literatura que relatam o aumento da apoptose celular em tumores submetidos a TFD. Este estudo sugere que determinados genes pertencentes a via metabólica da apoptose podem explicar a rápida eliminação do carcinoma mamário que ocorre após a TFD, podendo assim contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de ação da TFD e da carcinogênese mamária.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro. Processos 2009/18440-1 e 2011/09523-0.

Referências Bibliográficas

BAGNATO, V.S. Guia Prático de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento de Tumores, 2002.

BERGE, E.O.; KNAPPSKOG, S.; GEISLER, S.; STAALSEN, V.; MAREC, P.; BORRESEN-DALE, A.L.; PUNTERVOLL, P.; LILLEHAUG, J.R.; LONNING, P.E. Identification and characterization of retinoblastoma gene mutations disturbing apoptosis in human breast cancers. *Molecular Cancer*, v.9, n. 173, p. 1-13, 2010.

DOBBE, E.; GURNEY, K.; KIEKOW S.; LAFFERTY, J.S.; KOLESAR, J.M. Gene-expression assays: new tools to individualize treatment of early-stage breast cancer. *American Journal Health-system Pharmacy*, v. 65, n.1, p. 23-28, 2008.

HEIJINK, D.M.; JALVING, M.; OOSTERHUIS, D.; SLOOTS, I.A.; KOSTER, R.; HOLLEMA, H.; KLEIBEUKER, J.H.; KOORNSTRA, J.J.; VRIES, E.G.; JONG, S. TNF-related apoptosis-inducing ligand cooperates with NSAIDs via activated Wnt signaling in premalignant colon cells. *Journal of Pathology*, v. 223, p. 378-389, 2011.

NCA, Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Brasil, 2009.

OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical Photobiology Science*, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2001.

PALMA, B.F.; FERRARI, A.B.; BITAR, R.A.; CARDOSO, M.A.; MARTIN, A.A.; MARTINHO, H.S. DNA extraction systematics for spectroscopic studies. *Sensors*, v. 8, n. 6, p. 3624-3632, 2008.