

AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NA TERAPIA FOTODINÂMICA EM CÂNCER DE PRÓSTATA

Siqueira, E.E., Mangolin, J.F., Silva-Siqueira, A.C., Pacheco Soares, C.

Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares: Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP.
Av. Shishima Hifumi, 2911. CEP: 12.211-300. São José dos Campos – SP – Brasil.

E-mail: eriane.ellers@gmail.com

Resumo- Várias são as pesquisas na tentativa de tratamento /cura de câncer, muitos tratamentos alternativos tem sido desenvolvidos, dentre os quais se inclui a Terapia Fotodinâmica (PDT), a qual tem sido amplamente utilizada na Europa, Estados Unidos e alguns países da América do Sul. Entretanto a aplicação da TFD, apresenta alguns pontos que necessitam ser esclarecidos: o tipo de fotossensibilizante, a fonte de radiação, métodos de determinação da resposta biológica, entre outras. Visando melhor conhecer estes mecanismos, foram avaliados a participação das proteínas de choque térmico após tratamento com fotossensibilizante, já aprovado para TFD e novos fotossensibilizantes associados à nanotecnologia, potencializando a interação dos mesmos com as células tumorais.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Fotossensibilizantes, Proteínas de Choque Térmico
Área do Conhecimento: Biofísica

Introdução

O câncer é reconhecidamente a doença que mais tem provocado preocupação na história da humanidade (MACHADO, 2000). Tratamentos clássicos, constituídos pela quimioterapia, radioterapia e cirurgia, embora tenham sofrido avanço devido ao desenvolvimento de novos fármacos podem provocar inúmeros efeitos colaterais, comprometendo quase todas as funções orgânicas do indivíduo.

A descoberta de outros tipos de células que interagem com as células cancerígenas possibilitou caracterizar os cânceres não mais apenas a partir da célula tumoral propriamente dita, mas como uma doença complexa (OTAKE et al, 2006). Essa nova perspectiva permitiu o surgimento de novos alvos para os tratamentos, assim como o desenvolvimento de novas terapias, como a Terapia Fotodinâmica ou PDT (do inglês Photodynamic Therapy).

Entretanto, alguns aspectos da aplicação dessa terapia precisam ser esclarecidos, como os parâmetros que devem ser utilizados para tal (NERI et al, 2002), como exemplo podemos citar: o tipo de fotossensibilizante (a título de administração, o modo de preparo e concentração terapêutica), fonte de irradiação (tipo de irradiação parâmetros: comprimento de onda, energia, tempo de exposição, de duração de pulso, frequência de pulso), métodos de avaliação da resposta biológica, entre outros. Nesse sentido, diversos estudos estão sendo realizados com o intuito de esclarecer tais aspectos e processos que envolvem a PDT, estudando também formas de

aperfeiçoar os processos, por meio de novos fotossensibilizantes e novas fontes de luz, para uma maior eficiência da terapia no tratamento do câncer.

As proteínas de estresse ou choque térmico (HSPs) foram descobertas em 1962 (Ritossa, 1962) como um grupo de proteínas altamente conservadas cuja expressão pode ser induzida por diferentes tipos de estresse. O estresse oxidativo ativado por TFD induz a expressão de várias HSPs (Gomer, et al., 1996; Korbelik, et al., 2005). Zhou et al., 2008, demonstraram que principal função da translocação de HSP70 é estabilizar a membrana plasmática, embora este papel protetor falhe na prevenção da apoptose devido à ruptura da membrana mitocondrial.

Portanto neste projeto, visando melhor conhecer estes mecanismos, propomos avaliar a participação das proteínas de choque térmico, após o tratamento com diferentes fotossensibilizantes, em células de DU 145 (adenocarcinoma de próstata humana), em modelo in vitro.

Metodologia

Células DU 145 (adenocarcinoma de próstata humana) foram utilizadas para os modelos in vitro. As células foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco - DMEM (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) com 1,5g de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino, 1% penicilina-estreptomicina-neomicina; incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Um grupo de células foram tratadas com o fotossensibilizante Photosan® (SeeLab F&E GmbH, Germany), derivado de Hematoporfirina, análogo do Photofrin, certificado pela União Européia em 2002, (Zoeplf et al, 2005). A solução estoque do fotossensibilizante foi preparada na concentração de 1mM em PBS, após a diluição a solução foi estocada a 4°C protegido da luz até sua utilização no experimento. Logo após realizado a incubação com o fotossensibilizante e realizada a PDT (com períodos de 24h e 48h), foram marcadas às células com HSp70 e HSp90.

Após à incubação de um outro grupo de células (24h e 48h com tratamentos Ciclosporina A durante 1h de incubação e Staurosporina 10µM controle positivo para apoptose) o meio foi retirado e os poços lavados com PBS (Salina Tampão Fosfato). Os marcadores de morte celular foram acrescentados, Iodeto de e Anexina V. Para a fixação das células foram utilizados Paraformaldeído (PA) 4% e analisadas em microscopia de fluorescência, Microscópio Leica DMLI, com sistema de captura de imagem DFC310FX.

Resultados

A avaliação do processo de morte celular, às células DU-145 foram submetidas à marcação com Iodeto de Propídio e Anexina V..

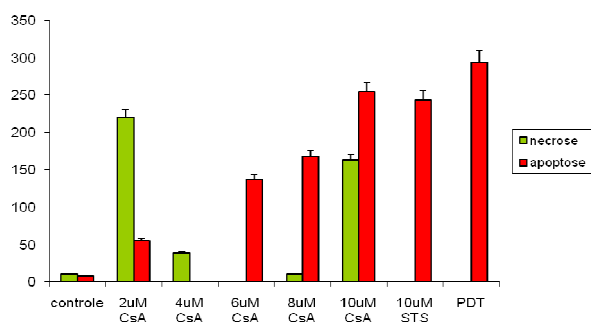


Figura 1. Avaliação de concentrações crescentes de CsA, sobre linhagem DU-145.

Para a realização dos cálculos foram utilizadas as imagens obtidas no microscópio Leica, sendo avaliada a intensidade de fluorescência do núcleo, marcado com iodeto de propídio e células positivas para Anexina V, analisadas através do programa de imagens Image J®. Foram quantificadas aproximadamente 100 células de cada grupo. O gráfico obtido permite verificar que as células do grupo controle, não apresentaram células apoptóticas ou necróticas. Como controle positivo para apoptose utilizamos Staurosporina A na concentração de 10µM, sendo possível

visualizar que ocorreu a presença de células apoptóticas, com intensidade equilibrada de fluorescência para iodeto de propídio e AnexinaV. As células submetidas a PDT, apresentaram um aumento significativo da intensidade de fluorescência como podemos observar no gráfico e nas imagens mais representativas apresentadas na (Figura 2.)

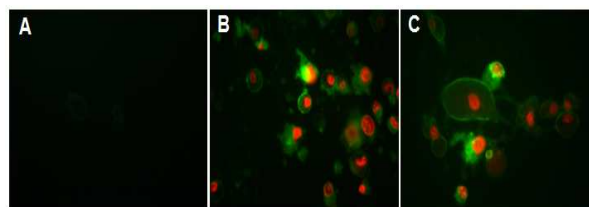


Figura 2. (A) Célular controle (B) Células DU-145 tratadas com Staurosporina 10µM controle positivo para apoptose. (C) Células DU-145 tratadas com Photosan e submetidas a PDT, tempo de 24 horas.

O estresse oxidativo ativado via Terapia Fotodinâmica após a reação com o fotossensibilizante, induz a expressão de várias HSPs, como podemos observar na (Figura 3.)

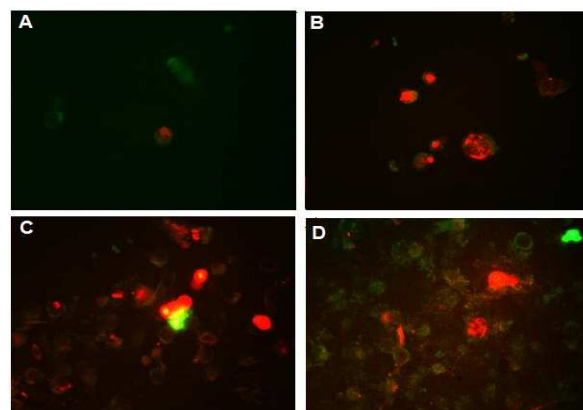


Figura 3. Células DU-145 marcadas com anticorpo anti-HSp-70 marcado com FITC e anticorpo anti-HSp-90 marcado com TRITC após PDT com Photosan. A- Células controle, B- Células DU-145 + laser, C- Células marcadas com HSp-70 e HSp-90 após 24 horas de PDT e D- Células marcadas com HSp-70 e HSp-90 após 48 horas de PDT.

Discussão

A Terapia Fotodinâmica pode ocasionar apoptose ou necrose, ou uma combinação dos dois mecanismos (OLEINICK et al, 2002). Sendo a apoptose, uma forma regulada de morte celular

fisiológica. As células que sofrem apoptose apresentam mudanças morfológicas típicas, como a deformação do núcleo, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de protuberância na membrana plasmática e fragmentação de DNA (ZHOU et al, 1996).

Para controle positivo de morte por apoptose foram utilizados o antibiótico Staurosporina - STS (Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. ChafkeÂ Ahmed Belmokhtar, Josette Hillion and Evelyne SeÂgal-Bendirdjian. *Oncogene* (2001) 20, 3354 ± 3362), já a Ciclosporina A (CsA), utilizada para avaliar a participação da mitocôndria no processo apoptótico, pois a mesma bloqueia a formação do Poro de Transição, e consequentemente a permeabilização da membrana mitocondrial. Para encontrar a dose ideal para inibição da apoptose, realizamos ensaios com concentrações crescentes de CsA, pois cada tipo celular responde de uma maneira diferente ao tratamento com este fármaco. O número de células mortas por apoptose e necrose foi avaliado através do programa Image J®, as imagens foram obtidas no microscópio Leica com Camera DFC acoplada.

O estresse oxidativo ativado por TFD induz a expressão de várias proteínas de choque térmico (Gomer, et al., 1996; Korbelik, et al., 2005). Zhou et al., 2008, demonstraram que principal função da translocação de HSP70 é estabilizar a membrana plasmática, embora este papel protetor falhe na prevenção da apoptose devido à ruptura da membrana mitocondrial. Vários autores tratam da participação da HSP70 na inibição da apoptose (Heat Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release and Upstream of Caspase-3 Activation. Chun-Ying Li‡, Jae-Seon Lee‡, Young-Gyu Ko§, Jong-Il Kim, and Jeong-Sun Seo. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 275, No. 33, Issue of August 18, pp. 25665–25671, 2000; Hsp70 Inhibits Heat-induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation. Adam R. Stankiewicz, Guillaume Lachapelle, Cheryl P. Z. Foo, Stefanie M. Radicioni, and Dick D. Mosser. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 280, NO. 46, pp. 38729–38739, November 18, 2005).

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que a Terapia Fotodinâmica com Photosan®, ocorre a presença de proteínas HSP70, sendo possível observar um aumento após 48 horas de incubação pós PDT. Observamos que em relação a HSP90, há uma diminuição no tempo de 48 horas pós PDT.

Ambas as proteínas HSp-70 e HSp-90, estão envolvidas na regulação da mitocôndria no processo de apoptose, entretanto na terapia fotodinâmica estas proteínas são expressas pela células tumorais DU-145, provavelmente com o objetivo de protegê-las da morte celular. Segundo ZHou ET al , 2008 a HSp-70 permite estabilização da membrana mitocondrial, enquanto que HSp-90 mantém o equilíbrio orgânico da célula tumoral. Assim com nossos resultados podemos sugerir que as células submetidas a PDT aumentem as proteínas HSp-90 e 70 na tentativa de equilibrar o seu metabolismo, já que quando é utilizada CsA na concentração de 4µM ocorre inibição do processo apoptótico via mitocondrial, mas quando as células são submetidas ao tratamento com CsA e PDT o processo apoptótico ainda ocorre.

Referências

- ADAM R. STANKIEWICZ, GUILLAUME LACHAPELLE, CHERYL P. Z.FOO, STEFANIE M. RADICIONI, AND DICK. MOSSER. Heat Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release and Upstream of Caspase-3 Activation. Chun-Ying Li‡, Jae-Seon Lee‡, Young-Gyu Ko§, Jong-Il Kim, and Jeong-Sun Seo. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 275, No. 33, Issue of August 18, pp. 25665–25671, 2000; Hsp70 Inhibits Heat-induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation. (*THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 280, NO. 46, pp. 38729–38739, November 18, 2005).
- CHAFKEÂ AHMED BELMOKHTAR, JOSETTE HILLION AND EVELYNE SEÂGAL-BENDIRDJIAN. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* (2001) 20, 3354 ± 3362).
- GOMER, C.J, RYTER, S.W, FERRARIO, A. et al. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Research*. 1996; 56 : 2355-2360.
- MACHADO, A. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*. Vol. 23, No 2. 2000.
- NERI, C. R.; PRADO, A. P. J. M.; RIBEIRO, A. O.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Determination of the photodynamic activity of porphyrins: potential photosensitizers for treatment of age-related macular degeneration. *Materials Science*, v. 20, n. 2, p. 69-75, 2002.

- OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochemical and Photobiological Science*. v. 1, p. 1-21, 2002.
- OTAKE, A. H.; CHAMMAS, R.; ZATZ, R. Câncer: Novos alvos para tratamento. *Ciência Hoje*, v. 38, n. 223, p. 28-33. Janeiro/Fevereiro 2006.
- RITOSSA, P. Problems of prophylatic vaccinations of infants. *Riv. Ist. Sieroter. Ital.* 1962; 37:79-108.
- ZHOU, F, XING, D. AND CHEN, W.R. Dynamics and mechanism of HSP70 translocation induced by photodynamic therapy treatment. *Cancer Letters*. 2008; 264: 135-144.
- ZOEPF T, JAKOBS R, ARNOLD JC, APEL D, Riemann JF. Palliation of nonresectable bile duct cancer: improved survival after photodynamic therapy. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100(11):2426-30.