

TERAPIA FOTODINÂMICA (660 nm) COM AIPcS $\square$ EM ESFERÓIDES MDA-MB-468: REDUÇÃO DA VIABILIDADE E ATIVAÇÃO DE HSP27

Autores: André Luiz Missio da Silva, Cristina Pacheco Soares.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, andremissio2003@gmail.com, cpsoares@univap.br

Resumo

Introdução. O câncer de mama foi o segundo tipo mais incidente em 2022, com aproximadamente 2,3 milhões de novos casos, representando 11% de todos os diagnósticos no mundo. **Objetivos.** Analisar parâmetros celulares e metabólicos em esferóides da linhagem MDA-MB 468 após terapia fotodinâmica (PDT) com Alumínio ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS $\square$) LED (660 nm). **Metodologia.** Células MDA-MB 468 cultivadas em meio L-15 formaram esferóides 3D em placas de 12 poços ($1,6 \times 10^5$ células/poço), divididos em quatro grupos: controle; AIPcS $\square$; LED e PDT (AIPcS $\square$ + LED). A viabilidade foi avaliada por resazurina (5%) e da HSP27 por microscopia confocal. **Resultados.** Considerando o controle como 100%, a atividade metabólica foi de 90% (LED), 85% (AIPcS $\square$) e 80% (PDT). O anticorpo confirmou a presença da proteína HSP27. **Conclusão.** A PDT reduziu a viabilidade celular em 20% e aumentou o número de proteínas HSP27 ativadas, evidenciando potencial promissor no tratamento.

Palavras-chave: Câncer de Mama, Terapia Fotodinâmica com Luz Vermelha, MDA-MB 468.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde, Biomedicina.

Introdução

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente entre mulheres, correspondendo a 23% dos casos e cerca de 17% das mortes por câncer na população feminina. Em 2022, estimaram-se 2,3 milhões de novos casos e aproximadamente 666 mil óbitos, ocupando a primeira posição em incidência em 157 países e liderando os índices de mortalidade por câncer em 112 deles. Diante desse cenário, torna-se essencial a realização de estudos que explorem novos recursos terapêuticos, sobretudo para o câncer de mama triplo-negativo, que apresenta comportamento mais agressivo e limitado arsenal terapêutico. Nesse contexto, a linhagem MDA-MB-468 é amplamente utilizada como modelo experimental por refletir características desse subtipo tumoral, incluindo elevada taxa de proliferação e potencial metastático. Estudos demonstram que variantes dessa linhagem podem produzir metástases extensas em linfonodos após injeção em modelos murinos e apresentam maior expressão de osteopontina, fatores associados à sua agressividade e relevância em pesquisas pré-clínicas (BRAY et al., 2022; CHAMBERS et al., 2005).

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade emergente e menos invasiva, que tem se destacado no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo o de mama, por utilizar um fotossensibilizador, luz em comprimento de onda específico e oxigênio molecular. Após a ativação luminosa, o fotossensibilizador gera espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete, promovendo morte celular direta, danos vasculares e ativação de respostas imunes, com seletividade para tecidos tumorais devido a características como vasculatura permeável, pH ácido e drenagem linfática deficiente (Triesscheijn et al., 2006; Hu et al., 2015; Kim e Chang, 2023). Apesar dos avanços, ainda são escassos os estudos que exploram o efeito da PDT em conjunto com a ftalocianina tetrasulfonada em modelos tridimensionais de câncer de mama, especialmente na linhagem MDA-MB-468, que reproduz de forma mais fiel a complexidade estrutural e o comportamento agressivo do tumor *in vivo*, reforçando a necessidade de investigações que considerem essas características. Nesse contexto, Hu et al. (2015) demonstraram que o uso da ftalocianina tetrasulfonada de alumínio (AIPcS $\square$) associada a nanopartículas em células MDA-MB-231 resultou em elevada geração de espécies reativas de oxigênio e destruição de aproximadamente 85% das células após irradiação, evidenciando o potencial terapêutico da técnica e fortalecendo a importância de estudos futuros em modelos tridimensionais da linhagem MDA-MB-468.

No contexto do presente estudo, a detecção de HSP27 após a aplicação da terapia fotodinâmica (PDT) sugere que as células tumorais ativaram mecanismos de defesa frente ao estresse oxidativo gerado, especialmente pelo aumento de oxigênio singlete, refletindo a importância dessa proteína na

manutenção da homeostase redox intracelular (Arrigo et al., 2005; Mehlen et al., 1997). A HSP27 é uma pequena proteína de choque térmico que atua como chaperona molecular, modulando a resposta celular ao estresse oxidativo por meio da manutenção da glutatona em sua forma reduzida, da regulação de enzimas como a glicose-6-fosfato desidrogenase e a glutatona redutase e da diminuição do acúmulo intracelular de ferro, catalisador de radicais hidroxila. Sua função protetora depende da formação de agregados oligoméricos, cuja estrutura é influenciada pela fosforilação de resíduos de serina; apenas os grandes agregados são capazes de modular espécies reativas de oxigênio e glutatona, conferindo proteção contra apoptose induzida por estímulos como TNF α (Mehlen et al., 1997). Dessa forma, o aumento observado de HSP27 em células submetidas à PDT pode refletir a ativação de mecanismos de defesa celular, reforçando a relevância de investigar sua regulação em contextos terapêuticos.

Dessa forma, avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica utilizando a ftalocianina tetrasulfonada de alumínio (AIPcS $\square$) associada à ativação por LED em esferoides tridimensionais da linhagem MDA-MB-468, considerando tanto a viabilidade celular quanto a expressão da HSP27, torna-se fundamental para compreender os mecanismos celulares de resposta ao estresse oxidativo induzido pelo oxigênio singlete.. Este estudo busca contribuir para a caracterização da eficácia da PDT em modelos mais próximos da complexidade tumoral *in vivo*, fornecendo informações sobre a interação entre fotossensibilizadores e vias de defesa celular, e assim fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes contra o câncer de mama triplo-negativo.

Metodologia

As células MDA-MB-468 cultivadas no laboratório de cultura celular, do IP&D, da UNIVAP foram cultivadas em meio L-15 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antimicótico, mantidas em garrafas de cultura, com trocas de meio realizadas às segundas, quartas e sextas-feiras, até atingir confluência adequada. Para a formação dos esferoides, utilizaram-se placas de 24 poços contendo moldes de agarose, com cinco moldes por placa. Cada molde foi incubado três vezes com troca de meio para equilibrar o pH da agarose.

Para formação dos esferoides as células cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² foram ressuspensas utilizando 3 mL de tripsina, transferidas para tubos de 15 mL e neutralizadas com a mesma quantidade de meio de cultura. As células foram então centrifugadas, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado em 2 mL de meio. Uma alíquota de 25 μ L foi utilizada para contagem celular em citômetro baseado em imagem Tali. A suspensão foi completada com meio até atingir 2,0 mL, permitindo a distribuição de 200 μ L por poço, correspondente a uma concentração final de $1,70 \times 10^5$ células/poço ($8,49 \times 10^5$ células/mL) contadas pelo TALI™ Image-Based Cytometer Invitrogen™ (ThermoFischer Scientific- Waltham, Massachusetts, EUA).

Após uma semana de cultivo, os esferoides foram incubados com 5% de AIPcS $\square$ em solução de 10% de AIPcS $\square$ em PBS por 1 hora, seguida de lavagem com PBS e adição de meio de cultura. Foram estabelecidos quatro grupos experimentais: (i) grupo escuro, com dois poços contendo AIPcS $\square$ que não foram submetidos à irradiação; (ii) grupo controle, com três poços sem tratamento; (iii) grupo PDT, com dois poços contendo AIPcS $\square$ que foram submetidos à irradiação; e (iv) grupo LED, servindo como controle do PDT, irradiado sem AIPcS $\square$. A irradiação foi realizada com LED de 660 nm por 1,45 minutos pela biotable biopdi irrada-Led5 660, do laboratório Photobios, do IP&D, da UNIVAP. No dia seguinte, foi realizada a avaliação metabólica com resazurina a 100 $\times$, incubando os esferoides por 1 hora, em seguida o sobrenadante foi transferido para placas separadas para avaliação da atividade metabólica por absorbância e fluorescência.

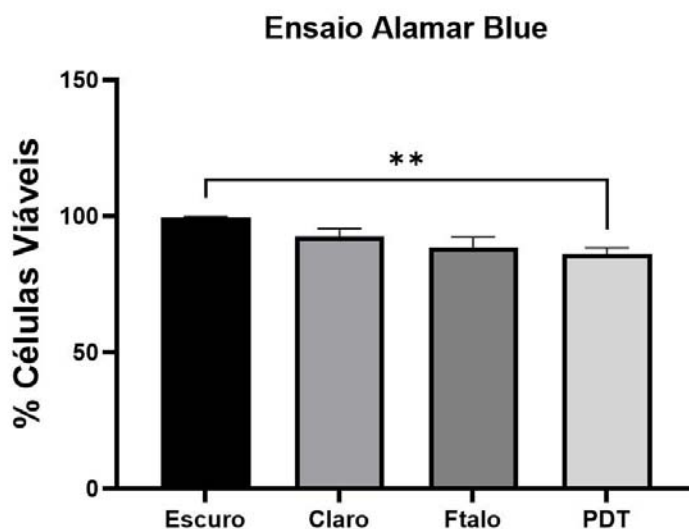
Posteriormente, os esferoides foram fixados em paraformaldeído 4% e permeabilizados com 1,6 μ L de Triton X-100 para permitir a penetração do anticorpo. Em seguida, foram incubados com anticorpo anti-HSP27 produzido em coelho (Sigma-Aldrich) por 24 horas. No dia seguinte, houve marcação de núcleo com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) das células pré-marcadas com HSP27. Os esferoides foram analisados por microscópio confocal usando diferentes filtros: N2.1/verde (excitação BP 515-560 nm), L5/azul (excitação BP 480/40 nm) e D/UV+violeta (excitação BP 355-425 nm), demonstrando elevada atividade nos esferoides submetidos à PDT em comparação aos controles não irradiados.

Resultados

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

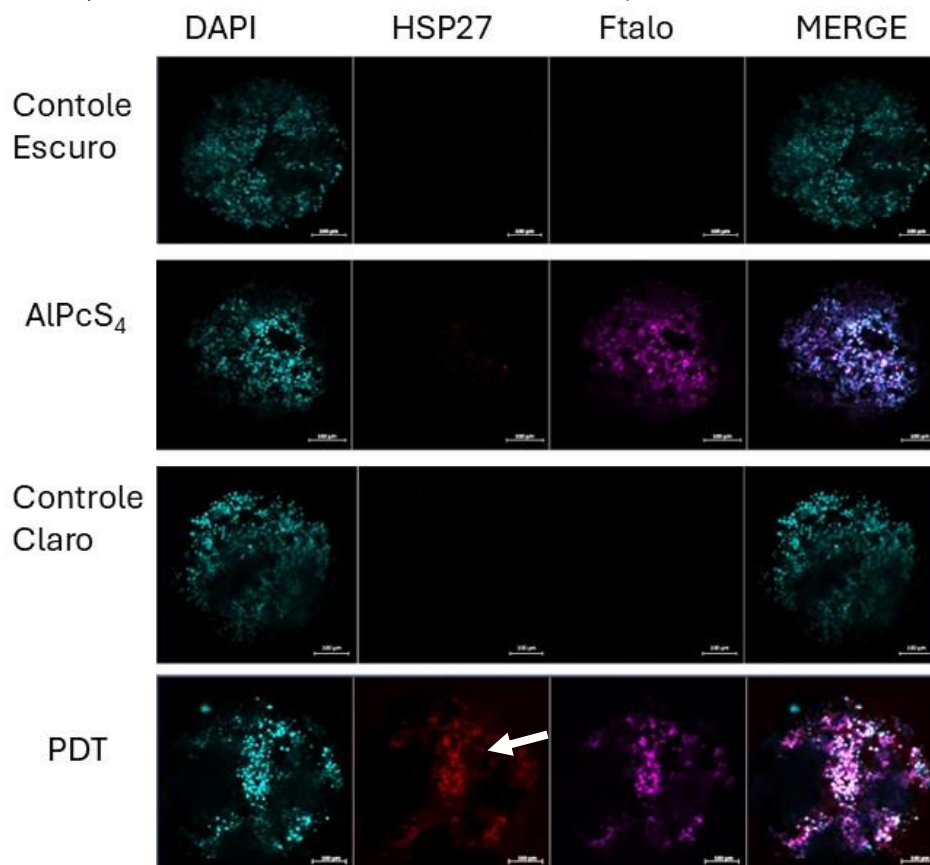
A análise da atividade metabólica revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Considerando o grupo controle (escuro) como referência (100% de atividade metabólica), o grupo LED (claro) apresentou 90% de atividade metabólica, o grupo tratado apenas com AIPcS₂ apresentou 85% (Ftalo), e o grupo PDT (AIPcS₂ + LED) apresentou a menor atividade metabólica, com 80%, indicando que a combinação do fotossensibilizante com irradiação promoveu maior redução da atividade metabólica das células MDA-MB-468.

Figura 1- Gráfico demonstrando redução na atividade metabólica celular pós-PDT com resazurina da marca Alamar Blue, $P < 0,05$ utilizando teste estatístico de Brown-Forsythe.



Fonte: O autor (2025).

Figura 2- Avaliação de HSP27 com 4 grupos por 4 filtros (célula, AIPcS₄, HSP27 e junção tripla dos filtros) com seta indicando o aumento na atividade proteica da HSP27 no PDT.



Fonte: O autor (2025).

Observou-se aumento da atividade de HSP27 nos esferoides submetidos à PDT em comparação aos grupos controle e LED, indicado pela seta na figura 2 análise, sugerindo a ativação de mecanismos de defesa celular frente ao estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio gerado durante a terapia. A microscopia confocal evidenciou marcação mais intensa da proteína nos esferoides PDT, corroborando o papel protetor da HSP27.

Esses resultados indicam que houve redução da viabilidade celular, e que a presença da HSP27 reflete a tentativa das células tumorais de se defenderem contra o estresse oxidativo, reforçando a relevância de estudos adicionais com aumento nas concentrações para otimizar parâmetros terapêuticos e compreender melhor a resposta celular em modelos tridimensionais de câncer de mama.

Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a terapia fotodinâmica (PDT) com AIPcS₄ reduziu a atividade metabólica dos esferoides MDA-MB-468, promoveu aumento da proteína HSP27. Esses achados corroboram o papel da PDT na indução de estresse oxidativo e na ativação de mecanismos adaptativos de defesa celular, uma vez que espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas durante o processo desencadeiam respostas como a ativação de chaperonas moleculares (Castano et al., 2006; Agostinis et al., 2011).

Estudos prévios com PDT mediada por azul de metileno (MB-PDT) a 640 nm e 4,5 J/cm² demonstraram que o tratamento induz morte celular significativa em células tumorais, enquanto células não malignas exibem maior resistência. Além disso, a MB-PDT promove autofagia com efeitos dependentes do tipo celular, resultando em citoproteção em MDA-MB-231 e MCF-10A, ou morte celular

em MCF-7. Em modelos tridimensionais, a seletividade do acúmulo de ERO sobre células tumorais foi ainda mais evidente, sugerindo maior acúmulo de ERO nos tecidos neoplásicos. Esses achados fornecem um contexto importante para os resultados observados com AIPcS $\square$, reforçando que a PDT pode reduzir a viabilidade de células tumorais enquanto induz respostas de defesa adaptativa.

A proteína de choque térmico 27 (Hsp27) desempenha papel protetor significativo contra apoptose induzida por radiação em células tumorais. Aloy et al. (2008) mostraram que linhagens Jurkat transfectadas com cDNA de Hsp27 apresentaram redução de 50% na apoptose 48 horas após irradiação, efeito associado ao aumento do glutatona, retardamento da detoxificação de ERO, atraso no colapso mitocondrial e modulação da ativação de caspases. Esses achados indicam que a Hsp27 confere resistência celular a estresses oxidativos e tratamentos citotóxicos, sugerindo a ativação da proteína e isso pode determinar a sensibilidade ou resistência de tumores à radioterapia e, possivelmente, à PDT.

Dessa forma, os dados deste estudo indicam que, embora a PDT com AIPcS $\square$ tenha reduzido significativamente a atividade metabólica dos esferoides de câncer de mama triplo-negativo, as células ativaram mecanismos adaptativos de defesa mediados pela HSP27. Esses resultados destacam a relevância de investigar estratégias combinatórias capazes de inibir respostas protetoras das células tumorais, como a HSP27, potencializando a eficácia da PDT e abrindo perspectivas para tratamentos mais eficientes em tumores resistentes.

Conclusão

A terapia fotodinâmica (PDT) combinada com o fotossensibilizador AIPcS $\square$ reduziu a atividade metabólica dos esferoides MDA-MB-468, demonstrando ação no modelo tridimensional de câncer de mama triplo-negativo. O aumento da atividade metabólica da proteína HSP27 nos esferoides submetidos à PDT evidenciou que as células ativaram mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelas ERO, confirmando a capacidade da terapia de gerar respostas celulares significativas. Estes achados reforçam o potencial da PDT como estratégia terapêutica promissora e indicam a necessidade de investigações adicionais para otimizar parâmetros de tratamento e compreender melhor a regulação de proteínas de choque térmico em modelos tridimensionais de câncer.

Referências

- AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.*, v. 61, n. 4, p. 250-281, jul.-ago. 2011. DOI: 10.3322/caac.20114. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617154>. Acesso em: 25 ago. 2025.
- ALOY, M.-T.; HADCHITY, E.; BIONDA, C.; ROUSSON, R.; ARRIGO, A.-P.; RODRIGUEZ-LAFRASSE, C. Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.*, v. 70, n. 2, p. 543-553, 2008. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2007.08.061. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360301607023321>. Acesso em: 25 ago. 2025.
- ARRIGO, A.-P.; VIROT, S.; CHAUFOUR, S.; FIRDAUS, W.; KRETZ-REMY, C.; DIAZ-LATOUE, C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 7, n. 3-4, p. 414-422, 2005. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2005.7.414>. Acesso em: 25 ago. 2025.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2022.
- CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer*, v. 6, n. 7, p. 535-545, jul. 2006. DOI: 10.1038/nrc1894. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrc1894>. Acesso em: 25 ago. 2025.
- DOS SANTOS, A. F.; TERRA, L. F.; WAILEMANN, R. A.; OLIVEIRA, T. C.; GOMES, V. M.; MINEIRO, M. F.; MEOTTI, F. C.; BRUNI-CARDOSO, A.; BAPTISTA, M. S.; LABRIOLA, L. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. *BMC*

Cancer, v. 17, n. 1, p. 194, 15 mar. 2017. DOI: 10.1186/s12885-017-3179-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5353937/>. Acesso em: 25 ago. 2025.

HU, Y.; YANG, Y.; WANG, H.; DU, H. Synergistic integration of layer-by-layer assembly of photosensitizer and gold nanorings for enhanced photodynamic therapy in the near infrared. ACS Nano, v. 9, n. 9, p. 8744-8754, 2015. DOI: 10.1021/acsnano.5b03063. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26267273>. Acesso em: 25 ago. 2025.

KIM, T. E.; CHANG, J. E. Recent studies in photodynamic therapy for cancer treatment: from basic research to clinical trials. Pharmaceutics, v. 15, n. 9, 2257, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15092257. Disponível em: <https://pmc-ncbi-nlm-nih.gov/articles/PMC10535460/>. Acesso em: 25 ago. 2025.

MEHLEN, P.; HICKEY, E.; WEBER, L. A.; ARRIGO, A. P. Large unphosphorylated aggregates as the active form of Hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3T3-ras cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 241, n. 1, p. 187-192, 1997. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7635. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9405255>. Acesso em: 25 ago. 2025.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H.; STEWART, F. A. Photodynamic therapy in oncology. Oncologist, v. 11, n. 9, p. 1034-1044, 2006. DOI: 10.1634/theoncologist.11-9-1034. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17030646>. Acesso em: 25 ago. 2025.

Agradecimentos

O presente trabalho contou com o apoio da Professora Doutora Cristina Pacheco e dos alunos Erick, Mariela e demais colegas do laboratório, a quem agradeço pelo apoio durante a pesquisa. Agradeço também à Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) e ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) pela estrutura e oportunidade oferecidas para a realização deste estudo.