

Resposta *in vitro* de Células Gliossarcoma 9L após Terapia Fotodinâmica utilizando Imagem de Bioluminescência

In Vitro Gliosarcoma 9L Cells Response after Photodynamic Therapy Using Bioluminescence Imaging

Eduardo H. Moriyama,^{1,2} Renato A. Zângaro¹, Marcos T. Pacheco¹, Antonio B. Villaverde¹, Brian C. Wilson²

Resumo

Objetivos: O presente estudo tem o objetivo de demonstrar os resultados iniciais da utilização da técnica de imagem de bioluminescência como método de monitoramento do tratamento de células de gliossarcoma de rato 9L após Terapia Fotodinâmica (TFD) utilizando o ácido aminolevulínico (ALA) como agente fotossensibilizante. **Métodos:** Para o presente estudo, células 9L foram transfectadas com um plasmídeo contendo o gene da luciferase, permitindo que essa linhagem celular produzisse a proteína luciferase, um dos substratos necessários para a reação de bioluminescência. No presente estudo, a TFD foi realizada utilizando diferentes doses de luz e de ácido aminolevulínico. Para validar a técnica de imagem de bioluminescência como método para o monitoramento da resposta de células tumorais e para a verificação da correlação entre o sinal luminoso e o grau de morte celular após TFD, foi utilizado o ensaio de viabilidade celular com Sulfurodamina B (SRB). **Resultados:** Os resultados deste trabalho mostram alta correlação entre o número de células e o sinal de bioluminescência ($R^2 = 0,996$). Os ensaios de viabilidade celular utilizando a técnica SRB, mostraram excelente correlação entre o número relativo de células sobreviventes após TFD e o sinal de bioluminescência, mostrando que a técnica de imagem de bioluminescência pode ser utilizada para o monitoramento da resposta tumoral após o tratamento de células tumorais com TFD. Os resultados do tratamento das células com terapia fotodinâmica mostram que a taxa de indução de morte celular varia de acordo com a dose de luz e fotossensibilizante empregada durante o tratamento. Nesse sentido, doses maiores de TFD resultaram em níveis mais elevados de indução de morte celular, com efeitos mais prolongados observados através do sinal bioluminescente decorridos 48 horas após a TFD. **Conclusão:** Este estudo demonstra que a técnica de imagem de bioluminescência pode ser utilizada para o estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica em células tumorais. Trabalhos em animais estão em andamento no presente momento para validar a técnica de imagem de bioluminescência após TFD *in vivo*.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Bioluminescência; Gliossarcoma; Luciferase; Protoporfirina IX; Ácido aminolevulínico.

¹ Departamento de Engenharia Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP;

² Department of Medical Biophysics, Princess Margaret Hospital, Ontario Cancer Institute, University of Toronto, Toronto, Canada

Endereço para correspondência: Prof. Dr. Eduardo H. Moriyama - Universidade do Vale do Paraíba - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Avenida Shishima Hifumi 2911, CEP:12244-000 São José dos Campos, SP - E-mail: moriyama@univap.br

Abstract

Objectives: The present study aims to demonstrate the initial results of the use of Bioluminescence Imaging technique (BLI) as a mean to monitor the tumor treatment response after aminolevulinic acid-Photodynamic Therapy (ALA-PDT) in rat gliosarcoma 9L cells. **Methods:** In the present study, the rat gliosarcoma 9L cells were transfected with a plasmid containing the luciferase gene, allowing this cell to produce luciferase protein, one of the substrates for the bioluminescence reaction. In the present study PDT was performed using different light and ALA doses. To validate the bioluminescence imaging technique as a mean to monitor the tumor cell response and to verify the correlation between cell death and the bioluminescence signal, Sulphorodamine B colorimetric assay (SRB) was used. **Results:** The results from the present study showed excellent correlation between the number of cells and the bioluminescent signal ($R^2 = 0.996$). The SRB viability assay showed an excellent correlation between the relative number of surviving cells after PDT and the bioluminescent signal, confirming that the bioluminescence imaging could be used as a reliable technique to monitor the tumor cell response after PDT. PDT treatment showed that cell tumor cell death induction varies with the light and photosensitizer doses. Thus, higher PDT doses resulted in higher levels of cell death rate *in vitro* observed by bioluminescence imaging technique 48 h after PDT. **Conclusions:** The present study demonstrates that BLI could be used to study the tumor response after PDT treatment. Future work using *in vivo* models are currently ongoing to validate this technique. **Key words:** Photodynamic therapy; Bioluminescence; Gliosarcoma; Luciferase; Protoporphyrin IX; Aminolevulinic acid.

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços nas áreas de diagnóstico, radioterapia, quimioterapia e técnicas cirúrgicas, a expectativa de vida dos pacientes acometidos com câncer de cérebro continua bastante baixa. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, aproximadamente 17.000 americanos são diagnosticados com câncer de cérebro todos os anos.¹

Tumores primários na região do cérebro tais como astrocitomas anaplásicos e glioblastomas multiformes representam a maior causa de morbidade e mortalidade na prática neurológica em pessoas na idade adulta.²⁻⁵ Gliomas com alto grau de malignidade levam a um prognóstico de aproximadamente 15 meses de sobrevida para pacientes com tumores de Grau IV - escala World Health Organization (WHO) - e 48 meses para gliomas anaplásicos (WHO Grau III).⁶

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma nova modalidade de tratamento de lesões malignas e de determinadas condições benignas, geralmente caracterizadas pelo elevado índice de multiplicação celular. O princípio da TFD está baseado na retenção de uma substância fotossensibilizante em células malignas e pré-malignas, seguido da reação entre esta molécula e a luz na qual o tecido é exposto.^{7,8} Esta fotoativação resulta na formação de substâncias altamente tóxicas, principalmente o oxigênio sincret

(1O_2) no interior das células tumorais resultando em conseqüente indução de morte celular.

Uma das grandes vantagens na utilização da TFD sobre as técnicas cirúrgicas convencionais se baseia em sua alta seletividade pelos tecidos tumorais. Primeiramente esta seletividade pode ser obtida através da retenção preferencial do fotossensibilizante em células tumorais e segundo pelo fato dos efeitos da TFD estarem limitados somente à regiões submetidas à exposição da radiação luminosa. Nesse sentido, o tecido normal não seria afetado pela TFD devido à ausência de luz e do agente fotossensibilizante.

Existem dois processos básicos responsáveis pela morte celular induzida pela TFD: a indução direta de células tumorais resultando em necrose e/ou apoptose celular e a constrição dos vasos sanguíneos do tumor resultando em morte celular por deprivação de nutrientes e/ou oxigênio.^{9,10} Vários estudos demonstram que o processo de morte celular está associado ao tipo de célula tumoral e principalmente do tipo de fotossensibilizante empregado.^{11,12}

O advento de novas técnicas de diagnóstico utilizando métodos ópticos oferece a possibilidade de obtenção de informações sobre o crescimento tumoral e da resposta terapêutica *in vivo* de forma não invasiva e em tempo real. As técnicas de imagem molecular vêm sendo amplamente utilizadas no campo da pesquisa em biomedicina, facilitando o estudo de fenômenos celulares

e moleculares durante estudos *in vivo* de várias patologias. Entre essas modalidades, a imagem de bioluminescência vem sendo intensivamente utilizada como técnica para detecção e monitoramento de tumores após tratamento em diversas áreas da oncologia. Bioluminescência é resultado da reação da luciferina sob condições fisiológicas no interior ou em associação com um organismo vivo.¹³ Luciferases são enzimas que agem no processo de emissão de luz na presença de oxigênio, de ATP e de um substrato (luciferina). A luciferase proveniente do vagalume *Photinus pyralis* é uma proteína encontrada na região emissora de luz contida no interior de seu abdômen. Em seu estado natural, após a emissão de um flash de luz, a luminescência rapidamente decai para um nível mais baixo de emissão. No entanto, determinadas alterações na estrutura do cDNA permitiram a expressão deste gene em células eucarióticas,¹⁴ além de resultar em alterações no padrão de emissão de luz desta proteína por períodos mais prolongados.¹⁵ A luciferina proveniente do vagalume é encontrada exclusivamente em ambos os tipos de vagalumes: *Photinus* ou *Luciola pyralis* e possuem a propriedade de necessitar de ATP como cofator para se converter em luciferina ativa com conseqüente emissão de luz.¹⁶ Dessa forma, atualmente esta reação química é bastante utilizada para ensaios de detecção de ATP intracelular utilizando aparelhos sensíveis de fotometria (luminômetros).

O uso de fotoproteínas como luciferase e GFP (*Green Fluorescent Protein*) para a marcação e visualização das células tumorais *in vivo* é um campo bastante promissor.^{17,18} Contag et al.¹⁹ mostraram a utilização de proteínas como a luciferase e GFP para a visualização de tumores e obtenção de informações sobre aspectos celulares e moleculares do tecido neoplásico *in vivo*, entre eles o monitoramento em tempo real do crescimento e regressão de tumores após terapia. Os autores mostraram que esta técnica é sensível o suficiente para a detecção e formação de imagens de pelo menos 1000 células marcadas com luciferase espalhadas pela cavidade peritoneal de camundongos. Os autores relatam também que enquanto o GFP possui alta resolução para análise de tumores *in vivo*, a luciferase possui características específicas para o monitoramento do crescimento tumoral a partir de uma pequena quantidade de células que sofreram metástase. Uma característica importante que difere as técnicas de imagem de fluorescência e de bioluminescência é o fato da última não necessitar de energia luminosa como fonte de excitação. Sendo assim, a técnica de imagem de bioluminescência apresenta a grande vantagem de possuir níveis de sinal de fundo (ruído) extremamente baixos.¹⁶

Rehmtulla et al.¹⁸ compararam a técnica de imagem de bioluminescência e ressonância magnética em gliossarcoma de rato com células 9L^{luc}. Os resultados mostraram alta correlação entre ambas as técnicas ($R = 0,91$), com elevado índice de confiança ($p = 0,951$). Dessa forma, os autores observaram que a detecção de luz para formação de imagens utilizando luciferase poderia ser a modalidade de diagnóstico óptico de escolha para a verificação da distribuição espacial de tumores *in vivo*.

O presente estudo tem como objetivo demonstrar os resultados iniciais da utilização da técnica de imagem de bioluminescência como método de monitoramento da indução de morte celular de células tumorais após a aplicação da terapia fotodinâmica *in vitro* em células de gliossarcoma de rato 9L.

MATERIAIS E MÉTODOS

TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS 9L.

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi o gliossarcoma de rato 9L.²⁰ As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco (Gibco BRL, ON, Canadá) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), penicilina (100 mg/ml) e estreptomicina (100 mg/ml) e mantidas em incubadora em ambiente com 5% CO₂ a 37°C. O plasmídeo contendo o gene modificado da luciferase (pGL3 Enhancer Vector: Promega, WI, EUA) foi co-transfectado em células 9L juntamente com um plasmídeo contendo um gene resistente à neomicina (pCI mammalian expression vector: Promega, WI, EUA) na proporção de 10:1. Durante a primeira seleção após a transfeção, as células foram cultivadas em meio de cultura contendo 700 mg/ml de antibiótico G418 sulfato (Promega, WI, EUA) durante 10 dias. Decorrido esse período, as colônias positivas foram submetidas à um segundo processo de seleção, onde as colônias foram isoladas e selecionadas de acordo com a expressão do gene da luciferase de cada linhagem celular. Para essa segunda seleção foram cultivadas 5000 células de cada colônia em blocos de cultura com 96 poços e após a adição de 100 ml de solução de luciferina (D-Luciferin Potassium Salt: Promega, WI, EUA - 1 mM em solução de fosfato tamponada - PBS), o sinal luminoso foi detectado e mensurado por um período de 1 minuto utilizando um luminômetro automático (modelo LB96V: Berthold, TN, EUA). A linhagem celular utilizada durante este trabalho (daqui em diante denominado de 9L^{luc}) apresentou o maior nível de emissão dentre as demais colônias, com um sinal aproximadamente 4 vezes superior à emissão da segunda melhor colônia. As células

selecionadas foram cultivadas em meio de cultura nas mesmas condições acima mencionadas com exceção da redução da concentração de G418 sulfato (350 µg/ml).

CORRELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE CÉLULAS 9L^{luc} E O SINAL DE BIOLUMINESCÊNCIA:

Para verificação da correlação entre o número de células e o sinal de bioluminescência, células 9L^{luc} foram incubadas em blocos de cultura com 96 poços em diferentes concentrações (5-100 X 10³ células/poço). A indução do sinal de bioluminescência foi realizada pela adição de 100 µl de solução de luciferina (1 mM em PBS) utilizando um período de leitura de 1 segundo através de um sistema de imagem de bioluminescência (IVIS System, Xenogen Corp. CA, EUA).

CORRELAÇÃO ENTRE O SINAL DE BIOLUMINESCÊNCIA E A TÉCNICA DE SULFORODAMINA B:

Para a determinação da correlação entre a técnica de imagem de bioluminescência e a técnica de SRB, células 9L^{luc} foram incubadas em blocos de cultura com 96 poços (5 X 10³ células/poço) em meio de cultura sem SFB e 1 mM de Ácido Aminolevulínico (ALA) durante 4 horas. Decorrido esse período, o meio de cultura contendo ALA foi removido e substituído por meio de cultura completo sem o agente fotossensibilizante. As células foram então imediatamente expostas a radiação luminosa com densidade de energia de 30 J/cm² proveniente de um laser de diodo (Photonics Research Ontario, ON, Canadá) emitindo em 635 nm (14 mW/cm²). O nível de viabilidade celular nas amostras foi mensurado através das técnicas de luminescência decorridos 24 e 48 horas pós-tratamento, utilizando o mesmo protocolo descrito acima e correlacionada com o método colorimétrico com Sulforodamina B (SRB). Para tanto, após a leitura de bioluminescência, as células foram fixadas em 10% ácido tricloroacético (100 µl/poço) e fixadas sob temperatura de 4 °C durante 1 hora. Após o período de fixação, as células foram coradas em solução de 4% de sulforhodamina B (50 µl/poço) durante 30 minutos em temperatura ambiente e enxaguadas com solução de 1% de ácido acético e deixadas para secar durante período de 12 horas. O precipitado resultante foi dissolvido em 100 µl de solução não tamponada de TRIS, 10 mM, com pH de 10,5 (Sigma Aldrich Corp., EUA). A densidade óptica foi determinada utilizando-se um leitor espectrofotômetro automático (modelo MCC/340: MTX Labs, VI, EUA) em 540 nm, utilizando subtração de 690 nm para medição do sinal de ruído.

VIABILIDADE CELULAR APÓS DIFERENTES DOSES DE TFD *IN VITRO*

Para verificar a resposta celular após TFD, 5 X 10⁵ células 9L^{luc} foram semeadas em placas de Petri de 3,5

cm e incubadas por 12 horas. Decorrido esse período, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura sem SFB contendo doses de ALA pré-determinadas (0,1, 0,5, 1 ou 2 mM). As células foram incubadas por 4 horas em estufa humidificada e em ambiente escuro sob temperatura de 37°C. Após o período de incubação o meio de cultura contendo ALA foi removido e as amostras enxaguadas com PBS e 5 ml de meio de cultura completo sem ALA foi adicionado. O processo de irradiação foi realizado utilizando-se um conjunto de lâmpadas halógenas acopladas a um conjunto de filtros fornecendo um total de 14 mW/cm² na região do vermelho ($\lambda > 600$ nm), o qual não resultou em aumento significativo de temperatura nas amostras. Após o início de irradiação, as amostras foram removidas da exposição de luz de acordo com a dose de luz pré-determinada (10, 20 ou 30 J/cm²). O grupo controle de cada grupo não recebeu droga ou luz e todas as células foram manipuladas utilizando a mesma metodologia. A análise das amostras pela técnica de imagem de bioluminescência foi realizada decorridos 24 e 48 horas após a TFD. Para tanto, o meio de cultura das amostras foi removido, enxaguado com PBS e substituído por 2,5 ml de solução de luciferina (1 mM). Imediatamente, as amostras foram colocadas em câmara escura e uma imagem em preto e branco foi obtida como referência utilizando uma câmera CCD ultrasensível (IVIS System, Xenogen Corp, CA, EUA) em ambiente de pouca luz. Posteriormente, em ambiente totalmente escuro, o sinal luminoso foi coletado por período de 1 segundo. As áreas de emissão luminosa foram transformadas em imagens e superimpostas com as imagens em preto e branco previamente obtidas e o sinal luminoso total proveniente de cada amostra foi coletado e quantificado utilizando o programa Living Image® (IVIS System, Xenogen Corp, CA, EUA). Terminado o período de coleta de sinal, a solução de luciferina foi removida e substituída por meio de cultura completo e retornados para incubadora onde permaneceram por posteriores 24 horas para a determinação da viabilidade das células 48 horas após TFD, utilizando o mesmo protocolo descrito acima. Para fins comparativos, a mesma amostra foi analisada 24 e 48 horas após TFD. Todo o processo de substituição de meio de cultura/solução de luciferina foi realizado em ambiente estéril para evitar a possível contaminação das amostras.

RESULTADOS

IMAGEM DE BIOLUMINESCÊNCIA COMO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O sinal de luminescência proveniente de células transfectadas foi facilmente detectado após a exposição

das células transfectadas a solução de luciferina e utilizando uma câmera CCD ultrasensível para o imageamento e quantificação da intensidade luminosa ou um luminômetro para detecção da energia luminosa total. A figura 1 mostra um exemplo de imagem de bioluminescência com diferentes números de células após a adição de 100 μ l de luciferina obtida em bloco de cultura com 96 poços. Observa-se que o sinal luminoso aumenta linearmente de acordo com o número de células (5, 10, 20 e 100 $\times 10^3$ células/poço, $R^2 = 0,996$, Figura 2).

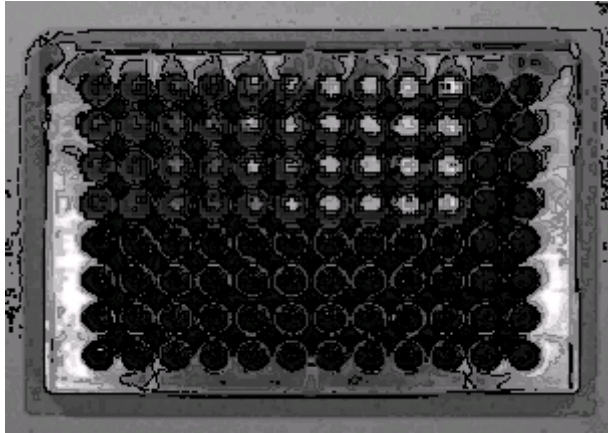


Figura 1 - Exemplo de imagem por bioluminescência de células 9L^{luc} após a adição de 100 μ l/poço de solução de luciferina (1 mM em PBS). O sinal luminoso foi coletado utilizando tempo de exposição de 1 segundo. Cada 2 colunas representa o mesmo número de células (5, 10, 20 e 100 $\times 10^3$ células/poço).

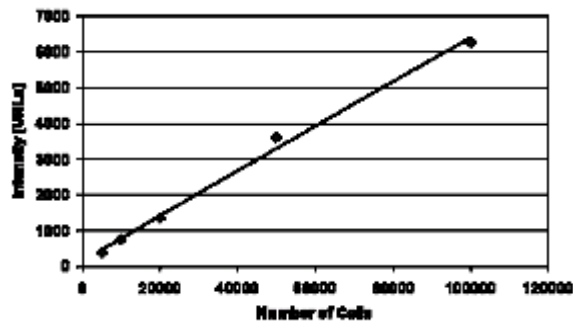


Figura 2 - Correlação entre o sinal bioluminescente e o número de células 9L^{luc} proveniente da Figura 1. Podemos observar a linearidade entre o número de células e o sinal luminoso coletado ($R^2=0,996$).

A Figura 3 mostra a correlação entre o sinal de bioluminescência e a técnica de SRB. Observa-se que a alteração de sinal luminoso corresponde ao decréscimo do número de células metabolicamente ativas decorridos 24 e 48 horas após ALA-TFD utilizando a técnica de SRB ($R^2 = 0,984$). Sendo assim, o sinal luminoso coletado após a TDF seria proporcional ao número de células sobreviventes ao tratamento.

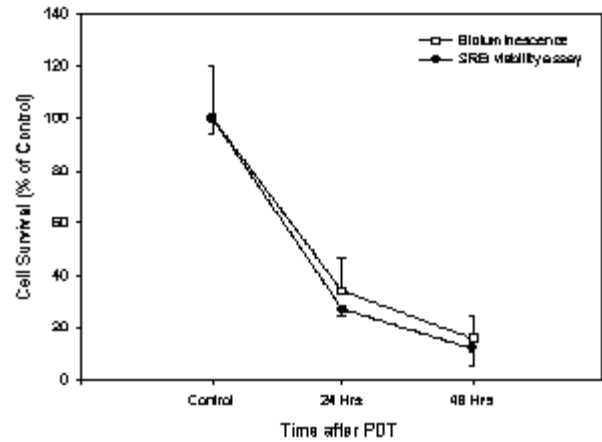


Figura 3 - Comparação da viabilidade celular após tratamento com TFD utilizando bioluminescência (□) e ensaios por SRB (●), 24 e 48 horas após tratamento com ALA-TFD. As células foram expostas à radiação luminosa de 635 nm (14 J/cm²) após período de incubação de 4 horas em meio de cultura contendo 1 mM de ALA. Para detecção do sinal luminoso após a TFD, foi utilizado um luminômetro (modelo LB96V: Berthold, TN, EUA).

RESPOSTA CELULAR APÓS DIFERENTES DOSES DE TFD

A Figura 4 mostra um exemplo de imagem de bioluminescência proveniente de placas de Petri de 3,5 cm de diâmetro, 24 e 48 horas pós-TFD. Podemos observar que a alteração da combinação droga/luz produz diferentes efeitos em células tumorais. As áreas com maior emissão de fótons correspondente ao maior número de células viáveis.

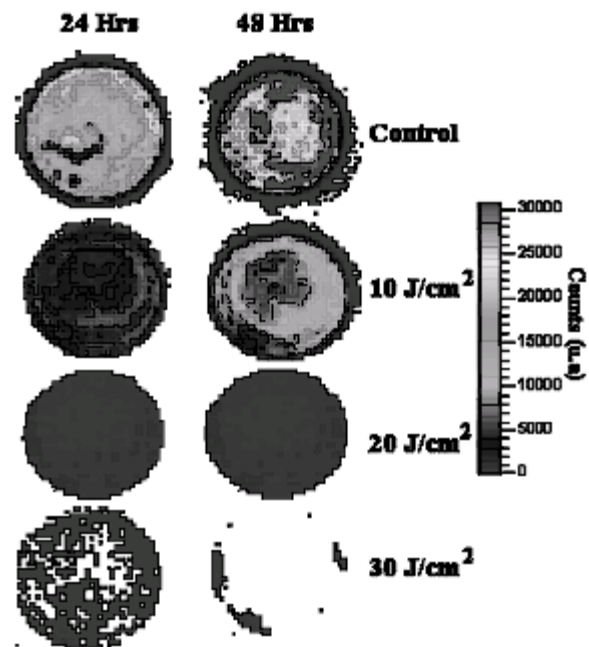


Figura 4 - Exemplo de imagem por bioluminescência (pseudocolor) de placas de Petri de 3,5 cm de diâmetro contendo células 9L^{luc}, 24 e 48 horas após TFD utilizando diferentes doses de luz e 2 mM de ALA. As áreas de coloração mais intensas representam áreas com maior emissão de fótons.

A Figura 5 mostra os valores de bioluminescência, correspondente à variação do número de células viáveis após a aplicação de diferentes doses de droga e de luz provenientes das amostras apresentadas na Figura 4. Podemos observar o decréscimo do número de células 9L^{luc} durante as primeiras 24 horas após tratamento, com índices de morte celular variando de acordo com a dose de TFD aplicada. A utilização de baixas concentrações de fotossensibilizante (0,1 mM), produz efeitos menos evidentes 48 horas após tratamento, observado pelo início do aumento do número de células, mesmo com altas doses de radiação luminosa (Figura 5A). Altas doses de fotossensibilizante associado à altas doses de intensidade luminosa produzem efeitos mais prolongados com alta taxa de indução de morte celular mesmo decorrido período de 48 horas após tratamento (Figuras 5B, 5C e 5D).

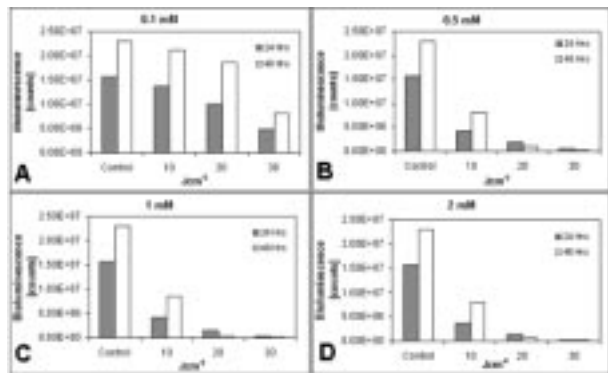


Figura 5 - Gráficos comparativos mostrando os valores médios do sinal de bioluminescência proveniente de células 9L^{luc} 24 e 48 horas após TFD. As amostras foram incubadas em placas de Petri de 3,5 cm de diâmetro contendo meio de cultura sem SFB contendo diferentes concentrações de ALA (0,1; 0,5; 1,0 e 2 mM) por 4 horas e posteriormente expostas à diferentes doses de radiação luminosa (0, 10, 20 e 30 J/cm², λ~ 610 nm) e densidade de energia de 14 mW/cm². As colunas em cinza representam a intensidade de sinal luminoso 24 horas após a TFD e as colunas brancas representam o sinal bioluminescente decorridos 48 horas após a TFD.

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da TFD na viabilidade celular *in vitro* variando a dose de luz e de ácido aminolevulínico em células de gliossarcoma de rato 9L através da técnica de imagem de bioluminescência. Um novo método de imageamento molecular que possibilita a obtenção de informações em tempo real de células tumorais transfectadas com o gene da luciferase (9L^{luc}) metabolicamente ativas baseado na detecção do sinal bioluminescente foi utilizado.

A família das luciferases abrange o grupo de proteínas

capazes de emitir luz na região do espectro visível através da oxidação da luciferina, na presença de oxigênio e adenosina trifosfato (ATP) como cofatores. Neste estudo, foi utilizado o gene modificado da luciferase, o qual foi geneticamente modificado para que fosse possível sua expressão em células eucarióticas.¹⁴

Os resultados apresentados neste trabalho preliminar mostram a alta correlação entre o número de células e o sinal de bioluminescente, assim como mostrado nas Figuras 1 e 2. Porém, os trabalhos *in vitro* não levam em consideração alguns fenômenos importantes de propagação de luz em tecido biológico como absorção e espalhamento inerentes em trabalhos *in vivo*. Além disso, devido ao fato da hemoglobina do sangue absorver fortemente na região do espectro entre o verde e azul, é esperado que a hemoglobina absorva grande parte da luz gerada durante a reação de bioluminescência, mas em menor proporção nas regiões acima de 600 nm.¹⁶ Como o espectro de emissão da reação da luciferase (*Photinus pyralis*) possui pico em 560 nm, mas com grande emissão na região do vermelho, uma fração significativa de luz é transmitida através do tecido e pode ser detectada externamente utilizando sistemas de detecção altamente sensíveis.^{13,17,19}

O ácido aminolevulínico é o precursor da protoporfirina IX (PpIX) o qual é o fotossensibilizante responsável pelos efeitos da TFD em células tumorais neste trabalho.²² O mecanismo de ação da TFD sugere que a geração de ¹O₂ no interior das células seja o principal responsável pelos efeitos da TFD, porém dependendo do agente fotossensibilizante utilizado, a morte celular também poderia ser induzida por ação vasoconstritora, através da redução do fluxo de oxigênio e de nutrientes para as células tumorais e contribuindo dessa forma para destruição do tumor.⁹

Os resultados aqui apresentados mostram a redução do sinal de bioluminescência após a TFD de acordo com a dose de droga e de luz. Essa redução do sinal luminoso proveniente das amostras indica a redução do número de células metabolicamente ativas, confirmada por ensaios SRB de viabilidade celular. Porém, ainda não está claro se a morte das células ocorreu via processo de necrose ou apoptose celular. Em trabalhos anteriores utilizando ALA-TDF em tumores de cérebro, Lilge et al.¹² demonstraram que a morte celular induzida pela TFD poderia ocorrer por ambas as vias de morte celular, dependendo da concentração de luz e de fotossensibilizante.

No presente estudo, foi demonstrado a capacidade de monitoramento dos efeitos da ALA-TFD em cultura de células em função das alterações do sinal luminoso baseado no número de células 9L^{luc}. Uma vez que a quantidade de fótons emitidos é proporcional ao número

de células vivas (Figura 1), a dinâmica do crescimento tumoral e a redução do número de células tumorais após tratamento podem ser monitorados de forma não invasiva e em tempo real via detecção do sinal luminoso. Isto se deve ao fato da reação de bioluminescência necessitar de ATP e nesse caso, somente células viáveis poderiam contribuir para a emissão de fótons, além disso, o decréscimo do sinal de bioluminescência observado quando as células iniciam o processo de morte celular após TFD pode revelar a dinâmica e eficiência do tratamento em função do tempo.

TRABALHOS FUTUROS

Recentemente foram iniciados estudos *in vivo* de imagem de bioluminescência utilizando células 9L^{luc} como forma de monitoramento da resposta tumoral após TFD em tempo real e de forma não invasiva.²² Esses trabalhos podem fornecer maiores detalhes sobre doses de droga/luz necessárias para a otimização dos parâmetros da Terapia Fotodinâmica para tumores de cérebro. Além disso, a combinação desta técnica de imagem com promotores genéticos específicos associados à regulação da morte celular induzida pode fornecer maiores detalhes sobre os mecanismos de morte celular após TFD. Estão também em andamento estudos sobre os mecanismos de morte celular com fotossensibilizantes que atuam em células endoteliais de vasos tumorais, de forma a induzir morte celular por hipóxia.²² Nesse caso, o gene da luciferase está ligado a um promotor genético ativado por hipóxia. Esses estudos podem facilitar a observação da expressão de determinados genes ativados pela TFD.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado em parte pelo Canadian Cancer Society através de projeto do National Cancer Institute of Canada e pelo U.S. National Institutes of Health-NIH (CA43892). O sistema de imagem foi fornecido através de apoio do Canadian Foundation for Innovation. O desenvolvimento técnico deste trabalho foi financiado pelo Canadian Institute for Photonic Innovations. EHM foi parcialmente patrocinado pela Universidade do Vale do Paraíba. Os autores agradecem Anoja Giles e Dr Lothar Lilge pela assistência durante esse trabalho.

REFERÊNCIAS

- Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Edwards BK. Cancer statistics review 1973-1998. Bethesda: National Cancer Institute; 2001.
- Choucair AK, Levin VA, Gutin PH, Davis RL, Silver P, Edwards MS, Wilson CB. Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas. *J Neurosurg.* 1986;65:654-8.
- Hochberg FH, Pruitt A. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology.* 1980;30:172-7.
- Wallner KE, Galicich JH, Krol G, Arbit E, Malkin MG. Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1989;16:1405-9.
- Liang BC, Thornton AF Jr, Sandler HM, Greenberg HS. Malignant astrocytomas: focal tumor recurrence after focal external beam radiation therapy. *J Neurosurg.* 1991;75:559-63.
- World Health Organization. International classification of diseases for oncology. 2nd ed. Geneva: WHO; 1990.
- Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg.* 2002;20:3-7.
- Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.* 1992;55:777-9.
- Fingar VH. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 1996;14:323-8.
- Penning Q, Moan J. Correlation of distribution of sulphonated aluminium phthalocyanines with their photodynamic effect in tumor and skin mice bearing CaD2 mammary carcinoma. *Br J Cancer.* 1995;72:565-74.
- Wyld L, Reed MWR, Brown NJ. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer.* 2001;84:1384-6.
- Lilge L, Wilson BC. Photodynamic therapy of intracranial tissues, a preclinical comparative study of four different photosensitizers. *J Clin Laser Med Surg.* 1998;16:81-91.
- Contag PR, Olomu IN, Stevenson DK, Contag CH. Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat Med.* 1998;4:245-7.
- de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1987;7:725-37.
- Sherf BA, Wood KV. Firefly luciferase engineered for improved genetic reporting. *Promega Notes Mag.* 1994;(49):14.
- Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia.* 2000;2:41-52.
- Zhang L, Hellstrom KE, Chen L. Luciferase activity as a marker of tumor burden and as an indicator of tumor response to antineoplastic therapy in vivo. *Clin Exp Metastasis.* 1994;12:87-92.

18. Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, et al. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia*. 2000;2:491-5.
19. Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia*. 2000;2:41-52.
20. Chopp M, Dereski MO, Madigan L, Jiang L, Logie B. Sensitivity of 9L gliosarcomas to photodynamic therapy. *Radiat Res*. 1996;146:461-5.
21. Kelty CJ, Brown NJ, Reed MW, Ackroyd R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1:158-68.
22. Moriyama EH, Bisland SK, Lilge L, Wilson BC. Bioluminescence imaging of the response of rat gliosarcoma to ALA-PpIX-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2004;80(2):242-9.