

Citotoxicidad inducida en cáncer de mama por terapia fotodinámica con LED's de alta potencia^{*}

J.Castillo-Millan^a, J.De la Rosa^b, J. A.Garduño-Medina^a, E.Moreno-García^b, E. Ramón-Gallegos^{a, †}

a) Lab. de Citopatología Ambiental, Depto. de Morfología, ENCB - Instituto Politécnico Nacional (IPN). Unidad Profesional Adolfo López Mateos; C.P. 07738 México DF; eramong@ipn.mx[†], evaramong@yahoo.com.mx

b) Lab. de Láseres. ESIME Zacatenco- Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. IPN S/N, Lindavista, México, D. F. C. P. 07738.

[†]autor para la correspondencia

Recibido el 25/07/10. Aprobado en versión final el 12/11/10.

Sumario. La terapia fotodinámica (PDT) es una modalidad terapéutica que requiere de luz, un fotosensibilizador y oxígeno. Una limitante para su aplicación en los países subdesarrollados es el costo de los láseres para irradiar, debido a esto, se construyó una fuente de luz basada en LED's que emiten hasta 44 lm alrededor de una longitud de onda de 625 nm y se midió su eficacia para eliminar células de cáncer de mama, este tipo de cáncer es un problema de salud pública en México y el mundo. Se expusieron dos líneas de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF-7) y una no cancerosa (HaCaT) a las concentraciones de 40 y 80 µg/mL de ALA por 24 h para inducir el fotosensibilizador PpIX, y se irradiaron a 120 y 240 J/cm², 24 horas después se determinó la muerte celular por el método de azul Alamar. La PDT, cuando se utilizaron las dosis de luz de 120 y 240 J/cm², indujo una mortalidad del 61 y 71% para MDA-MB-231, 46 y 49.2% para MCF-7 y 87.2 y 94.1% para HaCaT respectivamente. La fuente de luz construida mostró ser eficiente en la eliminación de las células cancerosas.

Abstract. The photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality that requires light, a photosensitizer and oxygen. In poor countries, a problem for his application is the laser cost for irradiate, due to this, a light source was constructed with LED's that emit up to 44 lm around 625 nm and its efficiency to eliminate breast cancer cells was measured. Two lines of breast cancer (MDA-MB-231 and MCF-7) and not cancerous cells (HaCaT) were exposed to 40 and 80 µg/mL of ALA concentrations during 24h to induce the photosensitizer PpIX, and were radiated to 120 and 240 J/cm², 24h, later on the cellular death was measured by Alamar blue method. The PDT elimination efficiency, when were used the doses of light of 120 and 240 J/cm², was 61 and 71 % for MDA, 46 and 49.2 % for MCF-7 and 87.2 and 94.1 % for HaCaT respectively. The constructed light source showed to be efficient in the elimination of the cancerous cells.

Palabras clave. Photodynamic therapy 87.50.wp, Light-emitting diodes 85.60.Jb, Cancer 87.19.Xj

^{*} **Nota editorial:** Aunque este artículo fue presentado originalmente en *Tecnolaser 2009*, no se pudo incluir en el número especial dedicado a la conferencia (vol. 27, 1, 2010). Su arbitraje ha sido exclusiva responsabilidad del Comité Organizador de *Tecnolaser*.

1 Introducción

El cáncer de mama es el tipo de cáncer en mujeres que presenta mayor frecuencia en todo el mundo.

La mortalidad es menor en los países desarrollados debido al acceso que tienen las mujeres a los tratamientos actuales cuya especificidad y efectividad es mayor, esto no es posible en países subdesarrollados lo que lleva a que este tipo de cáncer sea la principal causa de muerte.¹ Las terapias que actualmente se aplican, son poco efectivas (70%) y causan un severo daño a los tejidos sanos.²

La terapia fotodinámica (PDT) es una modalidad terapéutica que requiere luz, un fotosensibilizador (FS) y oxígeno. La activación del fotosensibilizador resulta por absorción de la luz, la cual lleva de un estado básico (¹FS) a un estado excitado eléctricamente. De este estado, el FS excitado puede decaer al estado básico por emisión de fluorescencia, propiedad que puede ser usada clínicamente para diagnóstico o transferir electrones al oxígeno en su estado triplete (Reacción tipo II) o a otras especies químicas (Reacción tipo I).³

Uno de los FS más potentes y específicos es la protoporfirina IX (PpIX), la cual puede ser administrada directamente a las células o ser inducida por el ácido 5-aminolevulínico (ALA) aprovechando que la mayoría de las células cancerosas tienen deficiencia o baja expresión de la enzima ferroquelatasa de la ruta biosintética del grupo hemo principalmente, lo que favorece entonces, la acumulación de la PpIX.⁴

Una limitante para la aplicación de la PDT en los países subdesarrollados, es el costo de los láseres que se utilizan en la irradiación, por lo que estos se están sustituyendo por diodos emisores de luz (LED's), los cuales son más económicos, de menor tamaño, pueden producir luz de energía suficiente y es posible su construcción en numerosas formas.⁵

De acuerdo a la realidad terapéutica y socioeconómica actual, es necesario buscar nuevas terapias con mayor sensibilidad, especificidad, con efectos secundarios mínimos o nulos y además, de gran importancia que sean de bajo costo y así favorecer a personas de escasos recursos económicos.

En este trabajo se determinó la eficiencia de la PDT para inducir la muerte de células de cáncer de mama hormono dependientes (MCF-7) y hormono independientes (MDA-MB-231), además se observó el efecto en la línea celular no cancerosa (HaCaT).

Para aplicar la PDT se desarrolló una fuente de luz basada en LED's de bajo costo, que pueden irradiar hasta 44 lm (200 mW) en una longitud de onda de 625 nm. La fuente utiliza 12 de éstos LED's de tal forma que se pueden irradiar 12 pozos de una microplaca de 96 pozos en una matriz de 3x4 pozos en forma simultánea. La fuente incluye el control de la corriente que excita a los LED's, de tal manera que se puede variar la potencia de irradiación. El equipo cuenta con un indicador digital de la potencia de irradiación y fue construido en el Lab. de Láse-

res de la ESIME en colaboración con el Lab. de Citopatología Ambiental de la ENCB, ambos del Instituto Politécnico Nacional de México.

2 Procedimiento experimental

2.1 Cultivo celular. Se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 (negativa al receptor de estradiol, RE-) hormona dependiente, MCF-7 (positiva al receptor de estradiol, RE+) hormona dependiente, y una línea celular no cancerosa (HaCaT) queratinocitos inmortalizados obtenidos de la American Type Culture Collection (ATCC). Se mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino, antibióticos estreptomycin-penicilina (10,000 U/L) al 1 %, se incubación a 37° C con atmosfera de CO₂ al 5 % y el 95% de aire. Este ultimo proporciona el oxígeno a las células y se mantuvo constante durante el experimento.

2.2 Aplicación de la PDT. Se sembraron 4 placas de 96 pozos con 6,000 células por pozo, de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y HaCaT en los pozos con las siguientes coordenadas 2A, 2D, 2G, 5A, 5D, 5G, 8A, 8D, 8G, 11A, 11D y 11G, se incubaron durante 24 horas de acuerdo a las especificaciones descritas, a las columnas 2 y 5 sólo se les realizó cambio del medio de cultivo, mientras que las columnas 8 y 11 se expusieron a la concentración de 40 µg/mL de ALA para el caso de MDA-MB-231 y 80 µg/mL de ALA en las líneas celulares MCF-7 y HaCaT, por estudios previos en el laboratorio de Citopatología Ambiental estas concentraciones inducen la mayor acumulación de PpIX en este tipo de células. Después de 24 horas se irradió con la fuente de luz desarrollada. Se utilizó una potencia de 50 mW y las densidades de energía de 120 y 240 J/cm² fueron obtenidas variando el tiempo de irradiación para cada caso.

2.3 Determinación de citotoxicidad por el método de azul alamar. Veinticuatro horas después de la irradiación se eliminó el medio de cultivo de los pozos y se agregaron 100 µL de azul Alamar al 10 % en medio de cultivo, se incubaron las placas por 3 horas más a 37° C y pasado este tiempo se leyó en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer modelo LS-55 a la longitud de onda de excitación de 530 nm y emisión de 580 nm.

2.4 Fuente de Iluminación. La construcción de la fuente luminosa se realizó con LED's de la marca Luxeon Star LXHL – ND94 Red Lambertian con las siguientes características: longitud de onda típica 625nm, ancho espectral FWHM de 20nm, emisión máxima de 44 lumens (200 mW). Se distribuyeron 12 LED's conectados en serie en un arreglo matricial 3x4, montados sobre una placa de aluminio que sirve como disipador de calor, de tal forma que se pueden irradiar 12 pozos de una placa de 96 pozos en forma simultánea (figuras 1 y 2). Para excitar a los LED's se utilizó una fuente de corriente variable Lumidrive MLV9-C-35 de hasta 350 mA, 36 VDC máximos y alimentación de 12-24 V AC/DC, en la

que se puede controlar la corriente suministrada a través de un potenciómetro R_c (figura 1).

El equipo cuenta con un indicador digital de potencia óptica (microcontrolador ATmega 8 y LCD 2X16) previamente ajustado con un medidor J54-018 Handheld Laser Power Meter de la firma EO Edmund Optics, Inc., el cual mide con exactitudes de $\pm 5\%$. Entre los LED's y las bases de los pozos se colocó una placa de acero inoxidable con orificios de 6 mm de diámetro centrados en las bases de los doce pozos a irradiar. La distribución de irradiación en el pozo coincide con la parte de máxima irradiación del LED, según se muestra en la figura 3 (-5° a 5°).

3 Resultados y discusión

Se encontró que el ALA, inductor de la PpIX, no tiene actividad citotóxica por sí solo a las concentraciones probadas (40 y 80 $\mu\text{g/mL}$), al contrario de esto, se observó un aumento del 8% en la viabilidad de la línea celular HaCaT y una disminución de la misma del 8 y 10% en las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 respectivamente (figura 4). En todos los casos los valores no fueron significativos estadísticamente. Estos resultados están de acuerdo por lo reportado Ramón y Cols, donde encontraron que el ALA *per se* sólo es tóxico a concentraciones mayores de 100 $\mu\text{g/mL}$ de medio.⁶

La PDT, al utilizar el ALA en la línea celular HaCaT, disminuyó un 87.2% su viabilidad al ser irradiar a 120 J/cm^2 y un 94.1% a 240 J/cm^2 . Estos resultados son congruentes con los observados por Klotz y colaboradores, donde células de la línea HaCaT expuestas solamente al ALA, presentaron una disminución de la viabilidad del 9%, y a la luz sola del 19%, sin embargo al aplicar la PDT obtuvieron una disminución de la viabilidad del 65%.⁸ Así, la PDT en las condiciones probadas en este trabajo mostró mayor eficiencia en la eliminación de células HaCaT.

Para la línea celular MDA-MB-231, se observó que el efecto de la PDT previa exposición al ALA, causó la disminución de la viabilidad en un 61 % para la densidad de energía de 120 J/cm^2 , y disminuyó en un 71 % al irradiar con 240 J/cm^2 . Estos resultados son muy alentadores, ya que los tratamientos que existen para el cáncer de mama negativos al receptor de estradiol (ER-) sólo el 10 % de ellos responden a los tratamientos hormonales como el Tamoxifeno.⁹

Sin embargo, en el caso de la línea celular MCF-7, se obtuvo una disminución del 46 % y del 49.2 % al irradiar a las densidades de energía de 120 y 240 J/cm^2 , respectivamente. Los resultados obtenidos de la PDT con esta línea no mejoraron a los reportados por Wyld y Cols. quienes describieron el haber obtenido en la línea celular MCF-7, 40% de mortalidad al exponer al ALA y luz violeta (350 a 450 nm) a 3 J/cm^2 .^{2,10} Así mismo, Crescenzi y Cols., aplicaron la PDT en la misma línea celular (MCF-7), y usaron como PS el verde de indocianina (ICG) e

irradiaron con un láser de diodos con $\lambda = 805 \text{ nm}$.

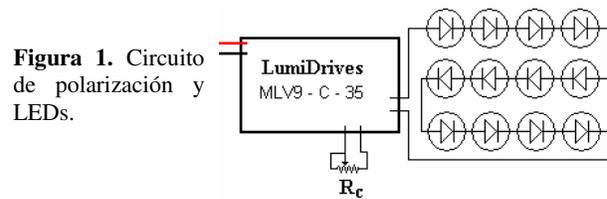


Figura 1. Circuito de polarización y LEDs.

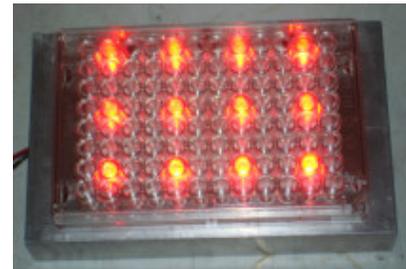


Figura 2. Distribución de LED's para irradiar una microplaca de 96 pozos.

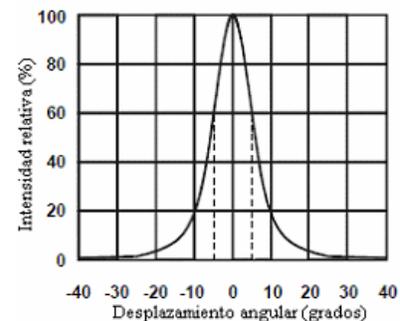


Figura 3. Patrón de radiación típica del LED Luxeon Star LXHL - ND94.

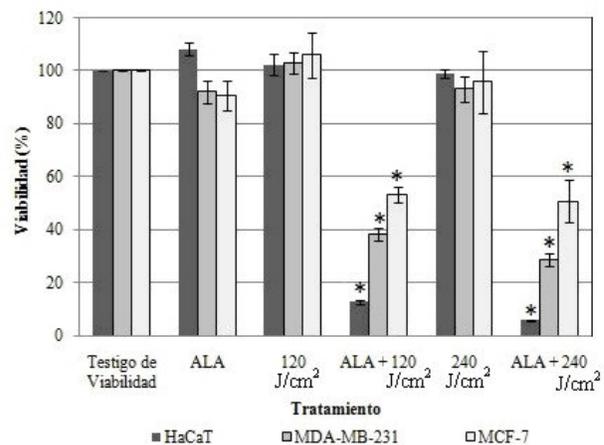


Figura 4. Efecto de la PDT en la viabilidad de las líneas celulares HaCaT, MDA-MB-231 y MCF-7, determinado por el método de azul Alamar. Los resultados representan la media + el error estándar. * $p < 0.05$ con respecto al testigo de viabilidad.

Ellos encontraron cerca del 50% de mortalidad al someterlo a una densidad de energía de 25 J/cm^2 .¹¹ Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en este trabajo tienen la característica de crecer en condiciones hipóxicas¹², sin embargo, pese a que la PDT requiere indispensablemente del oxígeno se ha reportado que ésta es eficiente en tensiones de oxígeno tan bajas como el 1%¹³ quizás a esto se debe la eficiencia de la PDT encontrada

para eliminar células de cáncer de mama en este estudio. Por otro lado, el arreglo de LED's construido permite controlar mejor las condiciones ya que es un sistema pequeño, que no requiere enfriamiento, es de bajo costo y permite irradiar de manera simultánea las células en estudio.

4 Conclusiones

Las concentraciones de ALA y las densidades de energía *per se* utilizadas no resultaron ser tóxicas para las tres líneas celulares.

La PDT es más efectiva en la eliminación de las células independiente de hormonas (MDA-MB-231) que la dependiente de las mismas (MCF-7).

La fuente de luz basada en LED's es útil para ensayos de PDT *in vitro*, permite la irradiación simultánea y el control de la potencia de irradiación para alcanzar la dosis de energía requerida.

Para mejorar la eficiencia de la PDT se recomienda realizar ensayos en los cuales se aumente el número de irradiaciones, esto es, irradiar 2 ó 3 veces cada 24 horas para eliminar las células sobrevivientes de la primera irradiación.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. Carmen Aceves del Lab. de Metabolismo Energético, Instituto de Neurobiología, UNAM-Juriquilla, Querétaro por la donación de la células MDA-MB-231, así mismo, agradecen al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF) de México y a la Secretaria de Investigación y Posgrado del IPN por el soporte económico para la realización del proyecto No 58 (2008-2009). JCM es becario CONACyT y del ICyT-DF, JDR y ERG son becarios COFAA, EDI y SNI.

Referencias

1. Masood S., "Coming together to conquer the fight against breast cancer in countries of limited resources: the challenges and the opportunities," *Breast J.* 13 (3), 223-225 (2007)

2. Mullana B.P. y Millikan C.R., "Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches." *Cell. Mol. Life Sci.* 1-14 (2007)

3. Henderson B.W. and Dougherty T.J., "How does photodynamic therapy work?," *Photochem. Photobiol.* 55, 145-157 (1992)

4. Kennedy J.C., Pottier R.H., Pross D.C. "Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience." *J PhotochemPhotobiol* 6: 143-148 (1990)

5. Triesscheijn M., Baas P., Schellens J.H.M. and Stewart F.A., "Photodynamic therapy in oncology," *Oncologist* 11, 1034-1044 (2006)

6. Ramón G.E., De León R.I., Martínez G.L., Pérez Z.A. "In Vitro study of biosynthesis of protoporphyrin IX induced by δ -Aminolevulinic acid in normal and cancerous cells of the human cervix." *Arch. Med. Res.* 30, 163-170 (1999)

7. Klotz L.O., Fritsch C., Briviba K., Tsacmacidis N., Schliess F., Sies H. "Activation of JNK and p38 but not ERK MAP kinases in human skin cells by 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy." *Cancer Res.* 1; 58(19):4297-300. (1998)

8. Maenpaa J., Wiebe V., Koester S., Wurz G., Emshoff V., Seymour R., Sipila P., DeGregorio M. "Tamoxifen stimulates in vivo growth of drug-resistant estrogen receptor-negative breast cancer." *Cancer ChemotherPharmacol.* 32(5):396-8 (1993)

9. Crescenzi E., Varriale L., Lovino M., Chiaviello A., Veneziani B.M., Palumbo G. "Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells." *Molecular Cancer Therapeutics.* 3(5):537-44. (2004)

10. Wyld L., Tomlinson M., Reed M.W., Brown N.J. "Aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy: cellular responses to glucose starvation." *Br J Cancer.* 22;86(8):1343-7 (2002).

11. Crescenzi, Varriale L., Iovino M, Chiaviello A., Veneziani B.A., Palumbo G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther;*3(5):537 – 44(2004).

12. Erler J.T., Jeffrey S.S., Giaccia A.J. Hypoxia promotes invasion and metastasis of breast cancer cells by increasing lysyl oxidase expression *Breast Cancer Research,* 7(Suppl 2):P5.05(2005).

13. Dougherty T.J., Yearly review. Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumors. *PhotochemPhotobiol.* 45:879-889(1987).