

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Ação fotodinâmica da C-Ficocianina, pigmento extraído da *Spirulina platensis*, nas linhagens tumorais humanas K562 (não MDR) e K562 – Lucena 1 (MDR)

Biol. Thaís Martins Lopes

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Orientadora: Dra. Gilma Santos Trindade

RIO GRANDE, FEVEREIRO DE 2006.

Agradecimentos

À minha orientadora Gilma Santos Trindade pela confiança, dedicação e amizade;

À Ana Paula de Souza Votto, minha amiga e braço direito, pela contribuição, dedicação e disponibilidade;

À Daza Filgueira, pela ajuda e amizade.

À equipe do Laboratório de microbiologia do Departamento de Química pela ajuda e colaboração;

Aos professores do DCF pela ajuda, incentivo e ensinamentos;

Aos funcionários do DCF pela ajuda disponibilidade;

Aos amigos do DCF, especialmente do Laboratório de Cultura Celular, pela ajuda, incentivo, companheirismo e amizade;

Ao Alex pelo incentivo, carinho e principalmente paciência;

À minha família, pela compreensão, paciência, incentivo, carinho e amor incondicionais;

À todos que de alguma maneira colaboraram na elaboração, desenvolvimento e conclusão desta tese;

À Deus, por tudo.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumo Geral | 4 |
| Introdução Geral | 7 |
| Objetivos..... | 14 |
| Objetivo Geral | 14 |
| Objetivos Específicos | 14 |
| Referências bibliográficas | 15 |
| Photodynamic action of pigment C-Phycocyanin of <i>Spirulina platensis</i> : cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines | 21 |
| Abstract..... | 22 |
| 1. Introduction | 22 |
| 2. Materials and Methods | 23 |
| 2.1. Chemicals and cell culture..... | 23 |
| 2.2. Cell viability assay..... | 24 |
| 2.3. ROS assay..... | 24 |
| 2.4. LPO measurement | 25 |
| 2.5 Role of Pgp in the resistance of Lucena cells to photodynamic action of C-PC | 25 |
| 2.6. Detection of apoptosis | 25 |
| 2.7 Statistical analysis..... | 26 |
| 3. Results | 26 |
| 3.1. PDA of C-PC induces cellular toxicity in K562 and Lucena cells..... | 26 |
| 3.2. ROS and LPO production..... | 27 |
| 3.3. No function of Lucena cells Pgp to resistance of PDA of C-PC | 28 |
| 3.4 Detection of apoptosis/necrosis by Annexin-V/PI staining..... | 29 |
| 4. Discussion..... | 30 |
| Conclusões Gerais | 36 |

Resumo Geral

A C-ficocianina (C-FC), um pigmento comum nas cianobactérias e um dos mais abundantes constituintes da *Spirulina platensis*, vem sendo estudada por possuir várias propriedades como antioxidante, hepatoprotetora, antiinflamatória e inibidora da enzima COX-2. Alguns autores atribuem também a C-FC um efeito oxidante quando ela é o agente fotossensibilizante utilizado na terapia fotodinâmica (TFD), podendo ser um importante agente no tratamento do câncer. Entretanto ainda pouco se sabe sobre a ação da C-FC, como substância fotosensibilizante, no tratamento de ação fotodinâmica (AFD) em modelos biológicos. A AFD provoca a fotooxidação de substratos biológicos através da geração de espécies reativas de oxigênio produzidas pela associação entre um determinado comprimento de onda, uma substância fotosensível e oxigênio. Existem dois caminhos que levam a morte celular pelo processo de fotooxidação conhecidos como mecanismo do tipo I e tipo II. No mecanismo tipo I são gerados radicais como o radical ânion superóxido e radical hidroxila, enquanto no mecanismo do tipo II a espécie reativa de oxigênio gerada é o oxigênio singlete (1O_2). A TFD da C-PC possui muitas vantagens em relação ao uso das hematoporfirinas e seus derivados, como rápida preparação e fácil purificação, ampla faixa de absorção do UV e visível, nenhum efeito local, e significativa redução da fotosensibilidade em tecidos normais por ter uma rápida metabolização em vivo. As pesquisas que avaliam os possíveis efeitos celulares da AFD têm sido também estendidas para as células tumorais que adquirem fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR). A MDR é um fenômeno no qual células tumorais, selecionadas resistentes a um agente quimioterápico, adquirem resistência a outras drogas,

aparentemente não relacionadas. O fenótipo MDR é multifatorial, mas o mecanismo melhor estudado é a super expressão da glicoproteína-P, que é uma proteína de membrana capaz de fazer a extrusão de quimioterápicos para fora de célula. Com isso o objetivo deste estudo é avaliar a sensibilidade das linhagens celulares que expressem (Lucena) ou não (K562) o fenótipo MDR à AFD do pigmento C-FC, extraído da cianobactéria *S. platensis*, e propor um possível mecanismo de ação. A extração da C-PC foi feita no Laboratório de Microbiologia e Engenharia de Bioprocessos (FURG). Diferentes concentrações de C-PC (0.025, 0.05, 0.10, 0.20 e 0.40 mg/ml para os testes de PDA da C-PC e 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 e 0.60 mg/ml para os testes no escuro) foram usadas. O número de células viáveis foi avaliada imediatamente, 24 h e 48 h após o tratamento com C-PC ou PDA da C-PC através de exclusão por azul de trypan. A concentração de 0.05 mg/ml foi utilizada para determinar o possível papel da Pgp na resposta da linhagem Lucena e a concentração de 0.10 mg/ml foi utilizada nos testes de peroxidação lipídica (LPO), de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e quantificação de apoptose/necrose. A PDA da C-PC causou uma diminuição no número de células viáveis em ambas linhagens K562 (não MDR) e Lucena (MDR), sendo que a linhagem MDR foi menos sensível que a não MDR. Já nos testes realizados no escuro, nenhuma toxicidade foi encontrada para as duas linhagens. Nenhuma alteração na resistência da linhagem Lucena foi encontrada quando o modulador verapamil foi colocado durante o tratamento de APD com C-PC e até às 48h de acompanhamento após o tratamento. Também não foi encontrada diferença significativa de lipoperoxidação (LPO) mas houve uma tendência de aumento na produção de ROS, que foi mais evidente na linhagem K562. Além disso a

linhagem Lucena apresentou uma produção basal de ROS significativamente maior que a K562. Nos testes de apoptose/necrose nenhuma diferença foi encontrada entre as células controle e tratadas em ambas linhagens. Os resultados encontrados neste estudo sugerem que a C-PC possa ser um potente agente fotosensibilizante, tanto para linhagens não MDR quanto para linhagens MDR e também que o mecanismo tipo II esteja envolvido em maior parte no efeito observado na PDA da C-PC, mas uma menor participação do mecanismo tipo I não pode ser descartada.

Introdução Geral

A C-ficocianina (C-FC), um pigmento comum nas cianobactérias e um dos mais abundantes constituintes da *Spirulina platensis*, vem sendo estudada por possuir várias propriedades como antioxidante, hepatoprotetora, antiinflamatória e inibidora da enzima COX-2 (Piñero Estrada L. E. *et al.* 2001, Vadiraja B. B. *et al.* 1998; 2000, Romay C. *et al.* 2000). Madhava Reddy *et al.* (2000) verificaram que a C-FC, uma das ficobiliproteínas da *S. platensis*, é um inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (COX-2). O COX-2 é uma enzima que cataliza a conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas (PG). As PGs são mediadores lipídicos de importância em muitos processos patológicos como inflamação, trombose e câncer, e o aumento da expressão de COX-2 foi recentemente associado com o aumento nos níveis de PG em vários cânceres. Outro efeito protetor da C-FC é a sua capacidade de captar radicais livres. Vadiraja *et al.* (2001) observaram que a C-FC e seu cromóforo ficocianobilina foram capazes de captar peroxinitrito (ONOO⁻) e proteger contra danos oxidativos no DNA de maneira dose dependente. Piñero Estrada *et al.* (2001) estudaram o efeito antioxidante de diferentes frações obtidas durante o processo de purificação da C-FC através da atividade de captação do radical hidroxila. Estes autores verificaram uma relação entre o aumento de C-FC e o aumento na atividade antioxidante, nas diferentes frações do extrato da *S. platensis*.

Alguns autores atribuem também a C-FC um efeito oxidante quando ela é o agente fotossensibilizante utilizado na terapia de ação fotodinâmica (AFD), podendo ser um importante agente no tratamento do câncer. Entretanto ainda

pouco se sabe sobre a ação da C-FC, como substância fotosensibilizante, no tratamento de ação fotodinâmica em modelos biológicos.

A ação fotodinâmica (AFD) provoca a fotooxidação de substratos biológicos através da geração de espécies reativas de oxigênio produzidas pela associação entre a presença de um determinado comprimento de onda, uma substância fotossensível e oxigênio. Existem dois caminhos que levam a morte celular pelo processo de fotooxidação conhecidos como mecanismo do tipo I e tipo II. No mecanismo tipo I a substância fotosensibilizante ativada pela luz interage com alvos biológicos e em combinação com o O_2 do meio, gera radicais como o radical ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila ($\cdot OH$). No mecanismo do tipo II ocorre transferência de energia do fotosensibilizante ativado pela radiação para o O_2 no estado triplete (3O_2), gerando uma espécie extremamente reativa, o oxigênio singleto (1O_2), que, por sua vez, irá atuar nos alvos biológicos. O mecanismo do tipo II destrói muitos compostos fora e dentro da célula enquanto que o tipo I necessita da penetração do fotosensibilizador no invólucro celular (Foote, 1991; Henderson e Dougherty, 1992).

Morcos *et al.* (1988) e Zheng *et al.* (1994) têm demonstrado que as ficobiliproteínas exercem uma forte AFD em células tumorais quando comparada com as hematoporfirinas (HPD) e seus derivados. Além disso, a terapia de ação fotodinâmica da C-PC possui muitas vantagens em relação ao uso das HPD, como rápida preparação e fácil purificação, ampla faixa de absorção do UV e visível, nenhum efeito local, e significativa redução da fotosensibilidade em tecidos normais por ter uma rápida metabolização em vivo (Zheng S. *et al.* 1994). Estudando a AFD da C-FC, Jin-An He *et al.* (1997)

verificaram a geração de espécies reativas de oxigênio em uma solução contendo três ficobiliproteínas (R-ficoeritrina, C-ficocianina e aloficocianina). Eles verificaram que após irradiação de uma solução aquosa saturada de oxigênio com luz visível, ocorreu a formação do O_2^- e do $\cdot OH$. Utilizando catalase observaram uma inibição na formação de $\cdot OH$, indicando que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também é gerado, atuando como suprimento para a formação de $\cdot OH$. Foi verificado também que a fotooxidação da C-FC observada pela perda de sua coloração, pode ser significativamente inibido pela histidina e NaN_3 , que são inibidores específicos de 1O_2 , sugerindo que o 1O_2 também é gerado no processo de fotossensibilização. Zhang *et al.* (1999) iluminando uma solução saturada de oxigênio contendo C-FC e 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) verificaram a formação de $\cdot OH$ através da formação de adutos de DMPO-OH utilizando um espectro por ressonância de elétron spin (ESR), e adicionando um conhecido captador de $\cdot OH$ foi observado por eles uma redução na formação destes adutos. Estes autores testaram ainda a participação de outras fontes de suprimento para a formação do aduto, que não o $\cdot OH$, e verificaram que o O_2^- , o H_2O_2 e 1O_2 também são formados pela iluminação da C-FC contribuindo para a geração de adutos de DMPO-OH.

Estudando microorganismos, Pádula *et al.* (1996) testaram a AFD de um extrato de C-FC, também extraída da cianobactéria *S. platensis*, em linhagens de *Escherichia coli*, *Stafilococcus epidermidis* e DNA plasmidial pBR322. A linhagem gran negativa *E. coli* foi resistente ao tratamento enquanto que a gran positiva *Stafilococcus epidermidis* e o plasmídeo pBR322 foram sensíveis a AFD da C-FC. Estes autores observaram que a inativação das células e do DNA plasmidial foi dependente da concentração do corante, do tempo de

incubação e da temperatura. Utilizaram ainda a proteína formamidopirimidina – DNA – glicosilase (Fpg), que tem um importante papel no reparo de danos no DNA por agentes fotooxidantes, e verificaram que a sobrevivência foi maior quando o plasmídeo pBR322 foi pré tratado com a proteína Fpg. Esta alta sobrevivência do plasmídeo pré-tratado com Fpg foi atribuída pelos autores como um completo reparo no DNA. Estes autores sugeriram então que a AFD da C-FC induz foto oxidação do DNA, mas não descartam que danos em outros alvos como, por exemplo, na membrana celular, podem estar envolvidos na letalidade da AFD da C-FC principalmente em células de mamíferos, como foi visto por Santus e Reyftmann (1986) e Moreno *et al.* (1987).

Vários autores vem estudando a possibilidade da AFD ser considerada uma técnica terapêutica para o tratamento do câncer (Ochsner, 1997; Orth *et al.*, 1995, 1998, Dellinger *et al.* 1992). Outros estudos “in vitro” têm focado o possível mecanismo celular que leva a morte de células tumorais através da AFD.

Hadjur e colaboradores (1995) testaram a fototoxicidade do corante hipericina em fibroblastos humanos MRC5. Eles encontraram em seus estudos que baixas concentrações do corante não possuem toxicidade no escuro e ao mesmo tempo são suficientes para causar fototoxicidade. Além disso, a fototoxicidade foi dependente da concentração do corante e da dose de luz. Utilizando extintores de $^1\text{O}_2$, como 1,4 – diazabicyclo [2,2,2] octano (DABCO) e histidina, e inibidores de espécies reativas de oxigênio geradas pelo mecanismo tipo I, como superóxido dismutase e catalase, foi verificado por estes autores que a fototoxicidade do corante hipericina é causada, em maior parte, pelo mecanismo tipo II, mas que o mecanismo tipo I também está

envolvido. Sharma *et al.* (1997) estudando o efeito da ação fotodinâmica da merocianina 540 (MC540) em células de glioblastoma, verificaram alterações na membrana plasmática. Utilizando métodos de fluorescência foi detectado por eles um aumento na fluidez da membrana e uma diminuição na mobilidade das proteínas de membrana, sugerido por eles como resultado de mudanças na interação lipídeos - proteínas da membrana.

As pesquisas que avaliam os possíveis efeitos celulares da AFD têm sido também estendidas para as células tumorais que adquirem fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR).

A MDR é um fenômeno pelo qual, tumores que inicialmente respondiam a determinados quimioterápicos, adquirem resistência não apenas às drogas utilizadas no tratamento, mas também a um número de outras drogas que não apresentam uma estrutura comum as primeiras, nem mesmo possuem um mesmo alvo intracelular (Gottesman M. M. & Pastan L. 1993). Este fenômeno possui características que ainda não se encontram bem definidas e tem sido sugerido como a maior causa de falta de êxito na quimioterapia de diversos tipos de câncer (Gottesman M. M. & Pastan L. 1993).

O gene *mdr1* codifica a gpP, proteína de cerca de 170 KDa, da família das ATPases (super família ABC), que expressa na membrana celular, é responsável por um mecanismo de efluxo, dependente de energia, capaz de bombear agentes quimioterápicos para fora da célula (Uchiumi T. *et. al.* 1993). A presença desta proteína, na membrana celular, confere à célula um fenótipo MDR.

Uma linhagem celular dita MDR apresenta características que a definem como tal: resistência a drogas não relacionadas (Tiirikainen M. L. & Krusius T.

1991, Kartner N. & Ling V. 1989), expressão de glicoproteína P (gpP) na superfície da membrana (Gottesman M. M. & Pastan L. 1993), extrusão do corante rodamina (Neyfakh A. A. 1988) e reversão da resistência pelos agentes reversores trifluoperazina, verapamil e ciclosporina A (Ford J. M. & Hait W. N. 1990, Sikic B. 1993).

Rumjanek *et al.* (1994; 2001) estabeleceram um modelo *in vitro* utilizando vincristina para induzir uma linhagem eritroleucêmica resistente e, com isso, permitir um estudo experimental de células MDR. A essa linhagem MDR foi dado o nome K562-Lucena1 (Lucena) para distinguir de sua linhagem parental K562. Maia *et al.* (1996a), Marques-Silva (1996), Maia *et al.* (1996b), e Orind *et al.* (1997), demonstraram para a linhagem celular Lucena as mesmas características de células MDR, descritas acima.

Um achado comum entre os pesquisadores que estudam células com o fenótipo MDR é a resistência a agentes oxidantes. Em geral, tem-se mostrado que células MDR apresentam menor peroxidação lipídica que suas células parentais. No entanto, apesar de ser um fenômeno comum à maioria das células MDR estudadas, a razão dessa resistência varia consideravelmente entre as linhagens celulares, podendo estar relacionada a um aumento da expressão de enzimas antioxidantes (Benchekroun *et al.* 1990, Trindade *et al.* 1999), a um aumento da quantidade de alfa-tocoferol na membrana celular (Mazzanti R. *et al.* 1995), ou a outras razões ainda não compreendidas.

Keppler (1999) em seu artigo de revisão sugere que a glutatona conjugada, com uma toxina, por exemplo, é exportada por bombeamento protéico para o meio extracelular. Este autor apresenta as proteínas da família MRP (ATPases de transporte) como indispensáveis para transportar estes

conjugados e as coloca tendo um papel decisivo na detoxificação e defesa contra estresse oxidativo. A toxina aflatoxina B1 é sugerida como exemplo de conjugado com a glutathione, agindo como substrato de alta afinidade com a proteína MRP1 (Keppler D. 1999, Loe D. W. *et al.* 1997). Entretanto Votto (2004) testando a toxina microcistina em linhagens celulares tumorais sanguíneas humanas K562 (não MDR) e Lucena (MDR) verificaram que não houve aumento na atividade da GST na linhagem Lucena indicando que a microcistina não foi exportada das células através da Pgp conjugada com GSH.

Trindade *et al.* (1999) estudaram a AFD do azul de metileno (AM) em cinco linhagens tumorais que expressavam ou não o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR). Eles observaram que o AM foi capaz de reverter o fenótipo MDR e que tanto as linhagens MDR como as não MDR foram sensíveis a AFD do AM e com isso sugeriram que o AM pode ser usado simultaneamente como um reversor da MDR e como um agente fotodinâmico.

O nosso interesse neste estudo é avaliar a sensibilidade das linhagens celulares que expressem (Lucena) ou não (K562) o fenótipo MDR à ação fotodinâmica do pigmento C-FC, extraído da cianobactéria *S. platensis*, e propor um possível mecanismo de ação.

Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da ação fotodinâmica do pigmento C-FC, extraído da cianobactéria *S. platensis*, nas linhagens K562 (não MDR) e Lucena (MDR), propondo um possível mecanismo de ação.

Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade das linhagens celulares expostas à ação fotodinâmica da C-FC em diferentes concentrações, a fim de construir uma curva dose-resposta.
- Demonstrar a formação de espécies reativas de oxigênio nas linhagens celulares expostas a AFD da C-FC.
- Avaliar danos oxidativos (peroxidação lipídica) nas linhagens celulares expostas a AFD da C-FC.
- Estudar a participação da Pgp na resposta ao tratamento de AFD da C-FC na linhagem MDR.
- Quantificar a capacidade da AFD da C-FC em provocar apoptose e necrose nas linhagens celulares.

Referências bibliográficas

- Benchekroun M.N., Catroux P., Montaudon D. & Robert J., Development of mechanisms of protection against oxidative stress in doxorubicin-resistant rat tumoral cells in culture. *Free Radic Res Commun* 11 (1990) 137-144.
- Dellinger M., Moreno G., Salet C., Tapiero H., Lampidis T.J., Cytotoxic and photodynamic effects of Photofrin on sensitive and multi-drug-resistant Friend leukaemia cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 62 (1992) 735-741.
- Foote C.S., *Photochem. Photobiol.*, 54 (1991) 659.
- Ford. J.M & Hait W.N., Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol. Rev.* 42 (1990) 155-199.
- Gottesman M.M. & Pastan I., Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 385-427.
- Hadjur C., Richard M.J., Parat M.O., Favier A., Jardon P., Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cell line MRC5. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 27 (1995) 139-146.
- He J.A., Hu Y.Z., Jiang L.J., Photodynamic action of phycobiliproteins: in situ generation of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1320 (1997) 165-174.
- Henderson B.W. and Dougherty T.J., How does photodynamic therapy work?, *Photochem. Photobiol.*, 1 (1992) 145-157.

Kartner N. & Ling V., Multidrug resistance in cancer. *Scientific American*, March: (1989) 26-33.

Keppler D., Export pumps for glutathione s-conjugates. *Free Radical Biology & Medicine* 27 (1999) 985-991.

Loe D.W., Stewart R.K., Massey T.E., Deeley R.G., Cole S.P., ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Molecular Pharmacology* 51 (1997) 1034-1041.

Madhava Reddy C.; Vadiraja B.B.; Kiranmai G.; Narsa Reddy M. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoerythrin, a biliprotein from *Spirulina platensis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 599-603.

Maia R.C., Silva E.A.C., Harab R.C., Lucena M., Pires V., Rumjanek V.M., Sensitivity of vincristine-sensitive K562 and vincristine-resistant K562-Lucena 1 cells to anthracyclines and reversal of multidrug resistance. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 4 (1996a) 467-472.

Maia R.C., Wagner K., Cabral R.H., Rumjanek V.M., Heparin reverses Rhodamine 123 extrusion by multidrug resistant cells. *Cancer Letters* 106 (1996b) 101-108.

Marques-Silva V.M., Efeito de Moduladores da Diferenciação Celular no Processo de Resistência à Múltiplas Drogas. Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil (1996).

- Mazzanti R., Fantappiè O., Fabrizio P. & Relli P., Susceptibility to lipid peroxidation of human hepatocellular carcinoma cell lines with different levels of multiple drug-resistant phenotype. *Lab Inv* 73 (1995) 419-423.
- Morcos N.C., Berns M., Henry W.L., *Lasers Suirg. Med.* 8 (1988) 10-17.
- Moreno G., Atlante A., Salet C., Santus R. and Vinzens F., Photosensitivity of DNA replication and respiration to hematoporphyrin derivative (photofrin II) in mammalian CV-1 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 52 (1987) 213-222.
- Neyfakh A.A., Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Exp. Cell Res.* 174 (1988) 168-176.
- Ochsner M., Photophysical and Phobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, *J. Photochem. Photobiol.* 39 (1997) 1-18.
- Orind M., Wagner-Souza K., Maia R.C., Rumjanek V.M., Modulation of P-glycoprotein on tumour cells. In: Sotelo JR & Benech JC (Ed.): *Calcium and cellular metabolism: transport and regulation.* New York: Plenum Press (1997) 117-124.
- Orth K., Ruck A., Beck G., Stanescu A., Beger H.G., Photodynamic therapy of small adenocarcinomas with methylene blue, *Chirurg* 66(1995) 1254-1257.
- Orth K., Russ D., Beck G., Ruck A., Beger H.G., Photochemotherapy of experimental colonic tumours with intra-tumorally applied methylene blue, *Langenbeck's Arch Surg.* 383 (1998) 276-281.

- Pádula M., Boiteux S., Felzenszwalb L., Menezes S., Photodynamic action of phycocyanin: damage and repair, *Photochemistry and Photobiology B: Biology* 32 (1996) 19-26.
- Piñero Estrada L.E., Bermejo Bescós P., Villar Del Fresno A.M., Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract, *IL Farmaco*. 56 (2001) 497-500.
- Romay C., Ledon N., Gonzalez R., Effects of phycocyanin extract on prostaglandin E₂ levels in mouse ear inflammation test, *Arzneimittelforschung* 50 (2000) 1106-1109.
- Rumjanek V.M., Lucena M., Campos M.M, Marques-silva V.M., Maia R.C., Multidrug resistance in leukemias: the problem and some approaches to its circumvention. *Ciência e Cultura (J. Brazilian Association for the Advancement of Science)* 46 (1/2) (1994) 63-69.
- Rumjanek V.M., Trindade G.S., Wagner-Souza K., Meletti-de-Oliveira M.C., Marques-Santos L.F., Maia R.C. & Capella M.A.M., Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Academia Brasileira de Ciências* 73(1) (2001) 57-69.
- Santus R. and Reyftmann J.P., Photosensitization of membrane components. *Biochimie*, 68 (1986) 843-848.
- Sharma M., Joshi P. G., Joshi N. B., Alterations in plasma membrane of glioblastoma cells by photodynamic action of merocyanine 540. *Biochimica et Biophysica Acta* 1323 (1997) 272-280.

- Sikic B., Modulation of multidrug resistance: at the threshold. *J. Clin. Oncol.* 11 (1993) 1629-1635.
- Tiirikainen M.I., Krusius T., Multidrug resistance. *Ann. Med.* 23 (1991) 509-520.
- Trindade G.S., Capella M.A.M., Capella L.S., Affonso-Mitidier O.R., Rumjanek V.M., Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochemistry and Photobiology* 69(6), (1999) 694-699.
- Trindade G.S., Farias S.L.A., Rumjanek V.M., Capella M.A.M., Methylene blue reverts multidrug resistance: Sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. *Cancer Letters* 151 (2000) 161-167.
- Uchiumi T., Kohno K., Tanimura H., Matsuo K., Sato S., Uchida Y., Kuwano M., Enhanced Expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth & Differentiation*, 4 (1993) 147-157.
- Vadiraja B.B. & Madyastha K.M. 2001. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 262-266.
- Vadiraja B.B., Gaikwad N.W., Madyastha K.M., Hepatoprotective effect of C-Phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone mediated hepatotoxicity in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (1998) 428-431.

Vadiraja B.B., Madyastha K.M., C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (2000) 20-25.

Votto A.P.S., 2004. Toxicidade da microcistina em duas linhagens celulares tumorais humanas (MDR e não MDR). Tese de mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, p. 1-63.

Zhang S.P., Xie J., Zhang J.P., Zhao J.Q., Jiang L.J., Electron spin resonance studies on photosensitized formation of hydroxyl radical by C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426 (1999) 205-211.

Zheng S., Chai X.H., He L.M., Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1, 091, 976; Chem. Abstr. 1995 122 (1994) 182179h.

Photodynamic action of pigment C-Phycocyanin of *Spirulina platensis* :
cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines

Thaís Martins Lopes^{a,b}, Ana Maria Barral Martinez^d, Adriana Lima Vallochi^d, Suzana
Juliano Kalil^c, Daza de Moraes Vaz Batista Filgueira^{ab}, Ana Paula de Souza Votto^{ab}, Gilma
Santos Trindade^{ab*}

^a Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande
(FURG), Rio Grande, (96201-900), BRASIL.

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada
(FURG).

^c Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG),
Rio Grande, (96201-900), BRASIL.

^d Departamento de Patologia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG),
Rio Grande, (96200-190), BRASIL.

*Corresponding author: Phone/Fax: +55 53 32336855 / +55 53 32336850

E-mail address: gilma@octopus.furg.br (G. S. Trindade)

Abstract

C-Phycocyanin (C-PC), the major light harvesting biliprotein from *Spirulina platensis* is of greater importance because of its various biological and pharmacological properties. It is a water soluble, non-toxic fluorescent protein pigment with potent anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer properties. In the present study the photodynamic action of C-PC was investigated. K562, a leukemia cell line and Lucena, a vincristine-resistant derivative of K562 that overexpress P-glycoprotein (Pgp) and displays several multidrug resistance (MDR) were both sensible to PDA of C-PC, moreover MDR line presented a low sensitivity toward the non-MDR line, suggesting that the C-PC can be a powerful photosensitivity agent.

Keywords: Multidrug resistance, C-Phycocyanin, Photodynamic action

1. Introduction

The photodynamic action (PDA) is the photo oxidation of biological molecules that take the production oxygen reactive species across of combination of light, a substance photo sensible and oxygen. There are two principal mechanisms that lead to cell death for photo oxidation: type I and II mechanisms. In the type I mechanism, the light-activated photosensitive substance interacts with biologics target and with oxygen and produces superoxide anion and hydroxyl radicals. On the other hand, in the type II mechanism upon light absorption by photosensitizer in its triplet state occurs energy transference to triplet state oxygen ($^3\text{O}_2$), producing singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), a potent oxidizer, that will interact with biologics target [1,2].

Morcos *et al.* [3] and Zheng *et al.* [4] have demonstrated that phycobiliproteins exerts much stronger photodynamic action on tumor cells compared with hematoporphyrin (HPD) and their derivatives. C-Phycocyanin (C-PC), a common pigment in the cyanobacterias and one of the major constituent of *Spirulina platensis*, is a phycobiliproteins that exhibits several advantages over the presently used HPD, i.e., ready preparation and easy purification, high

molar extinction coefficients, wide UV-visible absorption, no side effects and significantly reduction of normal tissue photosensitivity because of its fast metabolism in vivo.

C-PC is shown to be hepatoprotective, anti-oxidant, anti-inflammatory and COX-2 inhibitor [5,6,7,8]. One of mechanism involved in the PDA of C-PC is DNA photo-oxidation across singlet oxygen production [9]. Furthermore, others mechanism are suggested to be involved in the phototoxicity of the C-PC since the PDA of this substance also generates reactive species as the hydroxyl radical, hydrogen peroxide and superoxide radical anion [10,11]. Based on these ideas, Zhang *et al.* [11] estimated that type I and type II mechanisms for C-PC sensitization play a 30 and 70% part, respectively, in buffer aqueous solution.

It is consensus that resistance to oxidants agents is involved on multidrug resistance (MDR) phenotype of the cells. However, although it is a common phenomenon in MDR cells lines, this resistance varies between the cellular lines. One are related to an increase of the antioxidant enzymes expression [12,13], or an increase of the amount of alpha-tocopherol in the cellular membrane [14], or are not investigated.

Trindade et al. [15] studied the PDA of methylene blue (MB) in five tumoral cell lines expressing or not the MDR phenotype. These authors observed that MB was capable to revert this phenotype, and that all cell lines were sensible the PDA of the MB, suggesting that the MB can to be used simultaneously as MDR reverser and as photodynamic agent.

The objective of this study was evaluate the sensitivity of cell lines that express or not MDR phenotype to photodynamic action of pigment C-PC, extracted of cyanobacterium *Spirulina platensis*, suggesting a possible action mechanism.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and cell culture

C-Phycocyanin (C-PC) isolated from *Spirulina platensis* as described previously [16] was dissolved in distilled water and diluted in PBS for use.

K562 (human leukemia cell line) and Lucena (a K562/VCR resistant cell line with MDR characteristics) [13] were cultivated at 37 °C in RPMI 1640 (Life Tech. Inc., Rockville, MD) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Life Technologies Inc., USA), 2mM L-glutamine, 25mM HEPES, 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin (Life Technologies Inc.), and 0.25 g/ml antimycotic (SIGMA, St. Louis, USA). Lucena was maintained in the presence of 60 nM vincristine (SIGMA).

2.2. Cell viability assay

In order to investigate the intrinsic cellular dark toxicity of C-PC, the cells (4×10^5 cells/ml) were suspended in medium without β -mercaptoethanol, treated with different concentrations of C-PC (0.05, 0.10, 0.20, 0.40 and 0.60 mg/ml) and incubated at 37°C for 48 h. Viable cell number was assessed by trypan blue exclusion after 0 h, 24 h and 48 h of incubation.

Photodynamic action of C-PC was evaluated as described previously [15]. Briefly, cells (4×10^5 cells/ml) in PBS were illuminated with visible light for 5 minute (1 J/cm^2) with different concentrations of C-PC (0.025; 0.05; 0.10; 0.20 and 0.40 mg/ml). The light source was a Halopar 38 E 26 (90W), Halogen Osram lamp, with an emission spectrum almost totally in the visible region and an emission peak in 590 nm. After removal of C-PC by centrifugation, the cells were resuspended in fresh medium without β -mercaptoethanol and incubated at 37°C for until 48h. Photodynamic action (PDA) of the drug were analyzed immediately (0 h) and 24 and 48 h after the treatment.

2.3. ROS assay

For this experiment the cells were incubated at 37°C with C-PC for 24 h. After incubation the cells were washed with PBS for removal of C-PC, suspended in PBS and illuminated.

After treatment, the cells were twice washed with PBS and incubated for 30 min at 37°C with the fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) at a final concentration of 40 μ M, according to previously described [17]. H₂DCF-DA passively diffuses through cellular membranes and, once inside, the acetates are cleaved by intracellular esterases.

Thereafter, the non-fluorescent compound H₂DCF is oxidized by ROS to the fluorescent compound DCF. After the loading with H₂DCF-DA, two washes with PBS were performed and suspended in fresh PBS. Each treatment was performed in quadruplicate. Aliquots of 160 μ l of each sample (five replicate) were placed into an ELISA plate and the fluorescence intensity determined during 90 min at 37°C, using a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer), with an excitation and emission wavelength of 485 and 520 nm, respectively. ROS levels were expressed in terms of fluorescence area, after fitting fluorescence data to a second order polynomial and integrating between 0 and 90 min in order to obtain its area.

2.4. LPO measurement

The cells received even treatment report in ROS. LPO was determined according to Hermes-Lima et al. [18]. Samples were homogenized (10% W/V) in 100% cold (4°C) methanol. The homogenate was then centrifuged at 1,000 x g, for 10 min at 4°C. The supernatant was used for LPO determinations (580 nm). Cumene hydroperoxide (CHP; Sigma) was employed as standard. Each treatment (control cells and cells treated) was performed in quadruplicate.

2.5 Role of Pgp in the resistance of Lucena cells to photodynamic action of C-PC

To assess the role of Pgp in the resistance of Lucena cells was used the concentration of 0.05 mg/ml, because to this concentration the cell lines showed different sensibility. It was applied a Pgp modulator, the verapamil (Sigma) at concentrations known to reverse the MDR phenotype of Lucena cells (5 μ M). This drug was present during the treatment and during the incubation period following treatment.

2.6. Detection of apoptosis

Apoptosis was evaluated by Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI) stained. The cells treatment was the same described to ROS detection assay. Cells were twice washed with PBS, suspended in 100 μ l (1x10⁵ cell/ml) of binding buffer diluted 10x (0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) plus 5 μ l of Annexin V-FITC solution, then incubated for 20 min in dark. PI (5 μ l) plus binding buffer (400 μ l) were added and the cells acquisition was

detected using flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA). Data acquisition and analysis were controlled by CellQuest Pro software.

2.7 Statistical analysis

In all cases, three independent experiments were done using least triplicates in each experiment. Data are expressed as mean \pm standard error and analyzed with ANOVA followed by Tukey's multiple range test. ANOVA assumptions (data normality and homogeneity of variances) were previously checked. Significance level was fixed in 0.05.

3. Results

3.1. PDA of C-PC induces cellular toxicity in K562 and Lucena cells

In the dark, there is not cellular toxicity in both cell lines analyzed, K562 (non MDR) and Lucena (MDR), in the tested concentration (Fig. 1A e 1B, respectively). These results encouraged the use of same concentrations for the tests of PDA of C-PC, since one of greater preoccupation in the photodynamic action therapy (PDT) is the photosensible substance toxicity. By the other hand, PDA of C-PC induces cytotoxicity of K562 cells in a dose-dependent manner. It was observed for K562 cell line there was a strong decrease in the viable cells number in 24h, maintained until 48h, compared with the control, from concentration of 0.05 mg/ml (fig. 2A). The Lucena cell line (fig. 2B), also was sensible to PDA of C-PC, but showed more resistance than K562 cells for some concentrations. Lucena cells presented a decrease in the viable cell number from concentration of 0.10 mg/ml in 24 h, when compared with control. Also was observed a proliferation significantly decreased in 48h in the smaller concentration when compared with control. These cell lines presented a concentration-dependent sensibility, that was higher in the K562 cell line.

At 0.05 mg/ml C-PC, K562 cells were more sensible than Lucena cells in PDA tests. However, no significant effects were observed on this concentration to the others tests, and then 0.10 mg/ml C-PC was employed for detection of ROS, LPO, and apoptosis.

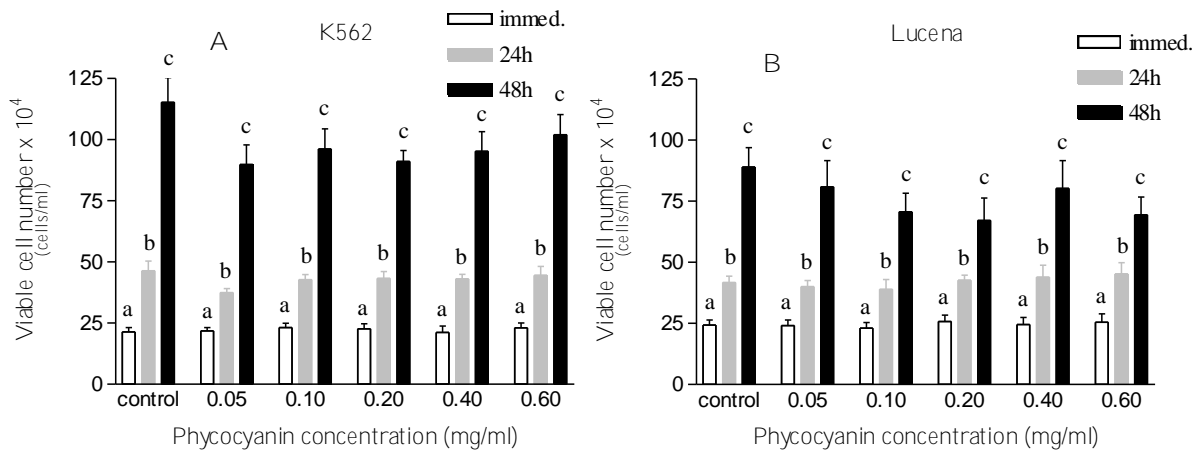


Fig. 1: Viable cell number of (A) K562 (non MDR phenotype) and (B) Lucena (MDR phenotype) cells exposed to different concentrations of C-PC in the dark for the times Immed – when C-PC was placed in the samples, 24h – after 24 h incubation and 48h – after 48 h incubation. Data are expressed as mean \pm SE. Similar letters indicate absence of significant differences ($p > 0.05$).

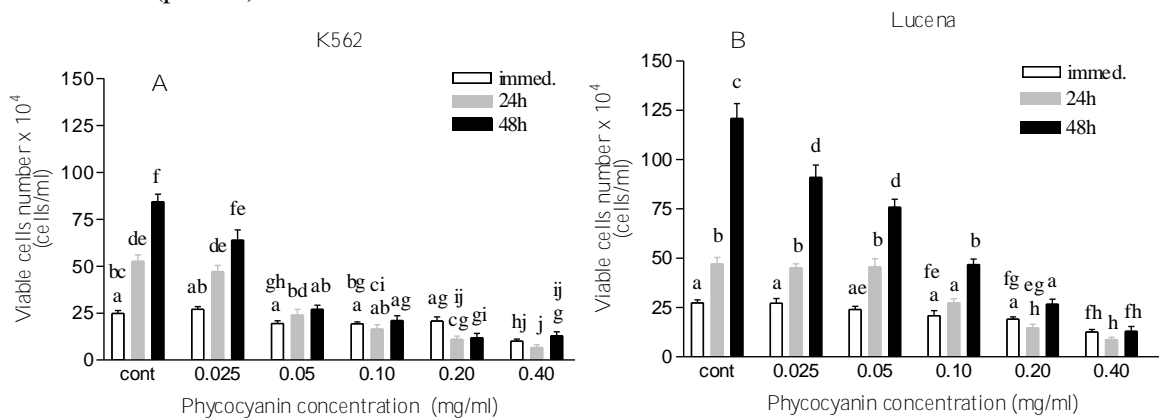


Fig. 2: Viable cell number of (A) K562 (non MDR phenotype) and (B) Lucena (MDR phenotype) exposed to PDA treatment with different concentrations of C-PC after irradiation with C-PC (Immed), after 24 h irradiation (24h) and after 48 h irradiation (48h). Data are expressed as mean \pm SE. Similar letters indicate absence of significant differences ($p > 0.05$).

3.2. ROS and LPO production

Such as observed in the figure 3, there was a significant difference ($p < 0.05$) in the ROS production between K562 and Lucena control cells (24 h post-treatment with C-PC), but there

was no significant difference among control cells and treated cells with C-PC for both tested cell lines and neither among the treatment in the two cell lines. Despite this, was observed a tendency of increase in ROS production by the treatments, when compared with its respective controls, and this tendency was more evident in K562 cell line.

The capacity of LPO induction by PDA of C-PC was investigated 24h post-treatment. Neither significant difference in the LPO induction was verified in the treated cells with 0.10mg/ml of C-PC (K562 28.03 ± 3.40 and Lucena 30.66 ± 2.38 nmol CHP/mg) when compared with its control (K562 34.51 ± 8.89 and Lucena 32.02 ± 6.57 nmol CHP/mg) and also there no was difference ($p>0.05$) among the cell lines.

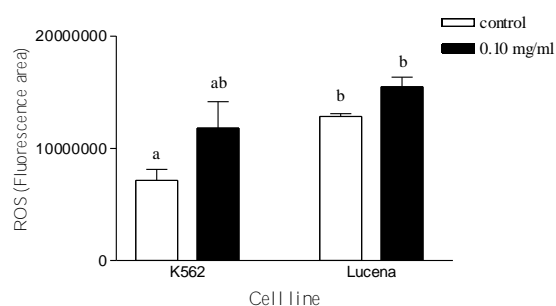


Fig 3: Quantification of ROS production (fluorescence area) in K562 (non MDR phenotype) and Lucena (MDR phenotype) cell lines immediately after treatment to PDA of C-PC with 0.10 mg/ml (treated cell). Data are expressed as mean \pm SE. Similar letters indicate absence of significant differences ($p>0.05$).

3.3. No function of Lucena cells Pgp to resistance of PDA of C-PC

For verify the role of Pgp in the larger resistance of Lucena cells, they were incubated with 5 μ M of VP modulator during, and until 48h post-treatment of PDA of C-PC. In this test was utilized the VCR drug associated with VP as positive control. In the fig. 4 may to note that VP modulator non significantly altered the Lucena resistance.

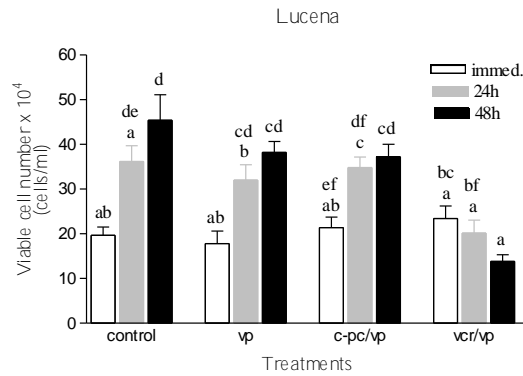


Fig. 4: Viable cell number of Lucena cells treated with 5µM of VP after irradiation with 0.05 mg/ml of C-PC (Immed), after 24 h irradiation (24h) and 48 h (48h) and after treatment of PDA of C-PC. Data are expressed as mean ± SE. Similar letters indicate absence of significant differences ($p>0.05$). VP – verapamil, VCR – vincristine and C-PC – phycocyanin.

3.4 Detection of apoptosis/necrosis by Annexin-V/PI staining

In the K562 cells was verified more apoptosis than necrosis in all treatments, and no difference was observed among the treatments and its respective controls for apoptosis (dark control: 41,05; dark treated with C-PC: 32,69; light control: 39,3; light plus C-PC: 42,08) and necrosis (dark control: 5,67; dark treated with C-PC: 3,63; light control: 2,66; light plus C-PC: 5,35) (Fig. 5A). Lucena cells also was verified more apoptosis than necrosis in all treatments, and no difference was observed among the treatments and its respective controls for apoptosis (dark control: 36,08; dark treated with C-PC: 32,7; light control: 50,96; light plus C-PC: 56,93) and necrosis (dark control: 11,33; dark treated with C-PC: 14,36; light control: 14,58; light plus C-PC: 15,12), but there was a increase of apoptosis in cells illuminated with regard to dark (Fig. 5B).

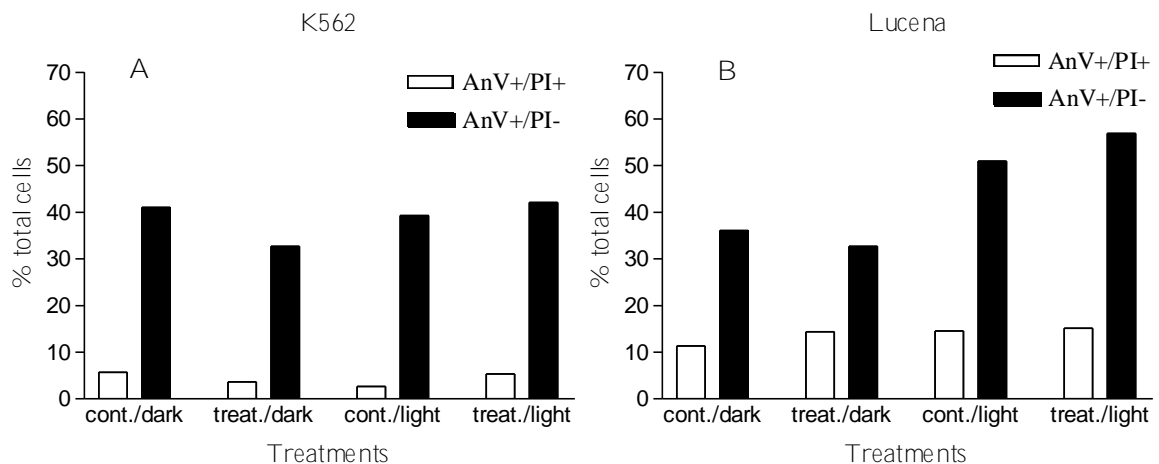


Fig. 5: Analysis of apoptosis (AnV+/PI-) and later apoptosis/necrosis (AnV+/PI+) upon treated with PDA of C-PC or only C-PC in 24h with 0.10 mg/ml. Data were expressed by total cells percentage comparing the control cells.

4. Discussion

The results show that the PDA of C-PC causes a decrease in the viable cells number in K562 (non MDR) and Lucena (MDR), being that MDR cells was less sensible than non MDR cell line. This minor sensibility may to be attributed to characteristics expresses in cell lines with MDR phenotype, as superexpression of P-glicoprotein (Pgp) [19], cytoskeleton alterations as increase of tubulin monomers [20], greater activity of antioxidant enzymes [13] between others factors, that confer to this type of cell a larger resistance. However in the tests realized in dark, no toxicity was verified in both MDR and non MDR cell lines. The same was observed in the study of PDA of C-PC in bacterium realized by Pádula et al. [9]. These authors also found sensibility differences to PDA of C-PC, being sensible the gran positive and resistant the gran negatives bacterium. But no found neither sensibility to the treatment with C-PC in dark for both bacterium lines. The results verified for C-PC, in the tests of dark toxicity, were different of that of the majority of substances. Tests of dark toxicity with methylene blue, in the K562 and Lucena cell lines, showed a toxic effect of this substance without significant difference among the cell lines [15]. The same was found for the hypericin dye tested in the human fibroblast cell line MRC5 [21]. Based in these finding may suggest that the use of C-PC in the PDA treatment was more advantageous, since in the tested concentrations in this work, it present strong toxicity, but no presented neither toxic effect in the dark.

To verify if the greater resistance presented by Lucena cells was related with Pgp superexpression, tests were realized with the verapamil modulator to this protein. How showed in these results neither alteration in Lucena cells was observed when the verapamil was placed during the APD of C-PC nor during the 48h post-treatment. Based in these results is suggested that the Lucena cells resistance is not involved with the exportation of the C-PC for out of cell

through of the Pgp, since it remained its resistance when the verapamil is present. Other possible suggestion is that the C-PC present more affinity by Pgp than the verapamil. Trindade et al. [13] tested if the resistance to UVA radiation effects presented by Lucena cells, will be reverted by verapamil and ciclosporina A modulators, and demonstrated that either no provoked reversion of this resistance. These authors utilized still the rhodamine 123 (Rho 123) dye, which measures the Pgp activity, and verified that the Pgp activity was altered when the Lucena cells were irradiated with UVA, increasing the Rho 123 accumulation in the cells interior. Herewith no may discarded the Pgp participation in the greater Lucena cells resistance to PDA of C-PC, and more studies are required to assess the Pgp role in this resistance.

Previous reports had demonstrated that the PDA of C-PC is able of generate ROS [10,11]. However, neither significant difference of LPO induction in this study was observed. Then tests were realized for verify the ROS production by PDA of C-PC. It was observed a tendency in ROS production increased, which was more evident in K562 cells, suggesting that oxygen species highly reactive and with short time life (1O_2 and $^{\bullet}OH$) are formed difficult the quantification of ROS production by method utilized. However for Lucena cells this tendency of increased ROS production was minor among control and treated cells. This result concords with that already described in literature for MDR phenotype cells, which suggest that this type of cell is more resistant to oxidative stress [14,22,23]. Despite this the Lucena cells presented a ROS basal production significantly higher than K562 cells. This result leaves to believe that greater antioxidant enzymes activity [13] in the Lucena cells may be related with the greater ROS basal production. The fact of there was not significant difference in the LPO production for both cell lines may be related with the type of generated ROS in PDA of C-PC. Since already was observed by Zhang et al. [11] that the type II mechanism is 70% involved in photosensibilization of C-PC, is possibly that the 1O_2 be the specie more produced by this treatment. Herewith other damage type, that not LPO, may be involved. In fact already was observed that 1O_2 production may induced DNA damage [24,25]. The results cited above suggests that the possible mechanism of the PDA of C-PC involved the formation of 1O_2 , but the involvement of type I mechanisms no may be discarded.

In preliminary tests to verify if the toxicity caused by PDA of C-PC occurs for apoptosis or necrosis, neither difference was observed among the control and treated cells in both cell lines. Maybe this fact can be related with the high percentage of apoptosis/necrosis found in the control cells.

Finally, the results found in this study suggest that the C-PC can be a potential photosensibilizer agent, depending of the concentration utilized, as much for non MDR as for MDR cell lines. Also can be suggested that the type II mechanism is more involved in observed effects in PDA of C-PC, but a participation of type I mechanism can't be discarded. This suggestion is based in previous studies that suggest the greater involvement of type II mechanism in the ROS production for PDA of C-PC [11].

Acknowledgements

This work was supported by PRONEX (Process N° E 26-171.217-2003 – APQ 1). Thaís Martins Lopes received a graduate fellowship from Brazilian CAPES. We are thankful to Dr. Jorge Alberto Vieira Costa for culture of *Spirulina Platensis* and to Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek for internship in her laboratory.

References

- [1] C.S. Foote, *Photochem. Photobiol.*, 54 (1991) 659.
- [2] B.W. Henderson and T.J. Dougherty, How does photodynamic therapy work?, *Photochem. Photobiol.*, 1 (1992) 145-157.
- [3] N.C. Morcos, M. Berns, W.L. Henry, *Lasers Suirg. Med.* 8 (1988) 10-17.
- [4] S. Zheng, X.H. Chai, L.M. He, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1, 091, 976*; *Chem. Abstr.* 1995 122 (1994) 182179h
- [5] L.E. Piñero Estrada, P. Bermejo Bescós, A.M. Villar Del Fresno, Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract, *IL Farmaco.* 56 (2001) 497-500.
- [6] B.B. Vadiraja, N.W. Gaikwad, K.M. Madyastha, Hepatoprotective effect of C-Phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone mediated hepatotoxicity in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (1998) 428-431.
- [7] B.B. Vadiraja, K.M. Madyastha, C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (2000) 20-25.
- [8] C. Romay, N. Ledon, R. Gonzalez, Effects of phycocyanin extract on prostaglandin E₂ levels in mouse ear inflammation test, *Arzneimittelforschung* 50 (2000) 1106-1109.
- [9] M. Pádula, S. Boiteux, L. Felzenszwalb, S. Menezes, Photodynamic action of phycocyanin: damage and repair, *Photochemistry and Photobiology B: Biology* 32 (1996) 19-26.
- [10] J.A. He, Y.Z. Hu, L.J. Jiang, Photodynamic action of phycobiliproteins: in situ generation of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1320 (1997) 165-174.
- [11] S.P. Zhang, J. Xie, J.P. Zhang, J.Q. Zhao, L.J. Jiang, Electron spin resonance studies on photosensitized formation of hydroxyl radical by C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426 (1999) 205-211.
- [12] M.N. Benchekroun, P. Catroux, D. Montaudon & J. Robert, Development of mechanisms of protection against oxidative stress in doxorubicin-resistant rat tumoral cells in culture. *Free Radic Res Commun* 11 (1990) 137-144.

- [13] G.S. Trindade, M.A.M. Capella, L.S. Capella, O.R. Affonso-Mitidier, V.M. Rumjanek, Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochemistry and Photobiology* 69(6), (1999) 694-699.
- [14] R. Mazzanti, O. Fantappiè, P. Fabrizio & P. Relli, Susceptibility to lipid peroxidation of human hepatocellular carcinoma cell lines with different levels of multiple drug-resistant phenotype. *Lab Inv* 73 (1995) 419-423.
- [15] G.S. Trindade, S.L.A. Farias, V.M. Rumjanek, M.A.M. Capella, Methylene blue reverts multidrug resistance: Sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. *Cancer Letters* 151 (2000) 161-167.
- [16] S.T. Silvana; L.A. Silva.; J.F.M. Burkert; S.J. Kalil; J.A.V. Costa 2004. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis*. *International Symposium: CSSD "Cyanobacteria for health, science and development"*.
- [17] O. Myhre, F. Fonnum (2001). The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria and phospholipase A. *Biochemical Pharmacology* 62: 119-128.
- [18] Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xilenol orange complex formation. *Free Radical Biology & Medicine* 19:271-280.
- [19] M.M. Gottesman & I. Pastan, Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993) 385-427.
- [20] Trindade, G.S. 1999. Estudo da sensibilidade ao tratamento por radiação ultravioleta e a outros agentes oxidantes de uma linhagem celular resistente a múltiplas drogas. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p 1-81.
- [21] C. Hadjur, M.J. Richard, M.O. Parat, A. Favier, P. Jardon, Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cell line MRC5. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 27 (1995) 139-146.

- [22] P.F. Lenehan, P.L. Gutierrez, J.L. Wagner, N. Milak, G.R. Fisher and d.d. Ross, Resistance to oxidants associated with elevated catalase activity in HL-60 leukemia cells that overexpress multidrug-resistance protein does not contribute to the resistance to daunorubicin manifested by these cells. *Cancer chemother. Pharmacol.* 35 (1995) 377-386.
- [23] A.P.S. Votto, 2004. Toxicidade da microcistina em duas linhagens celulares tumorais humanas (MDR e não MDR). Tese de mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, p. 1-63.
- [24] E. Muller, S. Boiteux, R.P. Cunningham and B. Epe, Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 5969-5973.
- [25] B. Epe, M. Pflaum and S. Boiteux, DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems, *Mutat. Res.* 29 (1993) 135-145.

Conclusões Gerais

A C-PC não apresentou citotoxicidade no escuro para as linhagens K562 (não MDR) e Lucena (MDR).

A AFD da C-PC foi citotóxica para as duas linhagens testadas, embora a linhagem MDR tenha sido menos sensível.

Não houve reversão da resistência da linhagem Lucena tratada com AFD da C-PC associada com o modulador Verapamil.

A C-PC não foi capaz de produzir diferença significativa na indução de LPO para ambas linhagens testadas.

Foi observada uma tendência de aumento na produção de ROS nas duas linhagens tratadas com AFD da C-PC, sendo que esta tendência foi maior para a linhagem não MDR.

Nenhuma diferença na porcentagem de morte por apoptose/necrose foi encontrada tanto para a linhagem MDR quanto para a linhagem não MDR tratadas com AFD da C-PC.