

## VARIAÇÃO DOS ÍNDICES DE ATP APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA

**Graziela de Sousa<sup>1</sup>, Maíra Maftoum Costa<sup>1</sup>, Newton Soares da Silva<sup>1</sup>,  
Cristina Pacheco -Soares<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova - São José dos Campos/SP - CEP: 12.244-000  
cpsouares@univap.br

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica, Cultura de Células, ATP, Apoptose

**Área do Conhecimento:** III Engenharias

**Resumo-** A Terapia Fotodinâmica (TFD) é fundamentada no acúmulo preferencial de fotossensibilizante no tecido neoplásico, depois excitado por luz de comprimento de onda 630 a 700 nm, ocasionando morte do tecido tumoral. O presente trabalho buscou verificar os níveis de ATP em células HEP-2, 04 e 24 horas após a Terapia Fotodinâmica e possível inicialização de apoptose. Foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/ml em placas NUNC de 24 poços contendo lamínulas. Estas foram incubadas com  $10\mu\text{M}$  AIPcS<sub>4</sub> em meio de cultura sem soro, por 60 minutos. Então, foram irradiadas no escuro com um aparelho clínico portátil de laser semiconductor (Thera Lase-DMC) com meio ativo de InGaAIP, operando com onda contínua em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 670 nm, com uma potência de 30 mW, a uma densidade de energia de  $4,5 \text{ J/cm}^2$ . Após a irradiação foram feitas marcações fluorescentes específicas nas células para a detecção de ATP. Tal marcação foi realizada em grupos celulares 04 e 24 horas após o tratamento fotodinâmico. Pôde-se então inferir que a Terapia Fotodinâmica pode vir à causar um processo de inicialização de morte celular por apoptose em células Hep-2.

### Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade que envolve a irradiação de tumores com um comprimento de onda apropriado de luz, após a captação de um fotossensibilizador pelo tecido tumoral [1]. A TFD é fundamentada no acúmulo preferencial do fotossensibilizante no tecido neoplásico, depois excitado por luz de comprimento de onda 630 a 700 nm, ocasionando necrose tumoral. O mecanismo pelo qual a TFD destrói os tecidos ainda é investigado [2].

Um dos critérios básicos na escolha de um agente a ser utilizado em TFD, é que o mesmo apresente uma absorção espectral acima de 600nm, a chamada janela óptica onde os componentes endógenos do tecido biológico são transparentes à radiação incidente [3, 4, 5, 6], além do que tais agentes deverão apresentar retenção seletiva aos tecidos neoplásicos em relação aos tecidos saudáveis.

A descoberta de que a TFD pode levar a uma resposta apoptótica em células malignas forneceu justificativa para a extensa eficácia observada. Embora a apoptose fosse descrita primeiramente em 1972 por Kerr e outros, ela não foi usada até 1991, quando Agarwal e outros relataram ocorrência de resposta apoptótica à TFD. Relatos de que a TFD pode induzir apoptose rapidamente, tanto *in vitro* [7, 8] quanto *in vivo* [9, 10], estabeleceram a noção da natureza da destruição (morte) fotoinduzida.

Este trabalho teve por objetivo verificar a variação dos níveis de ATP em células HEP-2, 04 horas e 24 horas após a Terapia Fotodinâmica e possível inicialização de apoptose.

### Materiais e Métodos

As células foram plaqueadas a um número de  $5 \times 10^4$  células/ml em placas NUNC de 24 poços contendo lamínulas e deixadas 24 horas para adesão. Foram utilizados 04 grupos de células para o estudo, um grupo controle cujas células não receberam nenhum tipo de tratamento, um segundo grupo, que continham células tratadas somente com a droga Cloro Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada -AIPcS<sub>4</sub> ( $10\mu\text{M}$  por 60 minutos), um terceiro grupo que foi tratado somente com a luz laser e um quarto grupo o qual sofreu Terapia Fotodinâmica.

A preparação celular para a Terapia Fotodinâmica se deu da seguinte forma, as células foram incubadas com AIPcS<sub>4</sub> a uma concentração de  $10\mu\text{M}$  em meio de cultura sem soro, por 60 minutos.

Passado o tempo de incubação as células foram lavadas 3 vezes com PBS e mantidas com  $500\mu\text{l}$  deste para a irradiação. Então, foram irradiadas no escuro com um aparelho clínico portátil de laser semiconductor (Thera Lase-DMC) com meio ativo de InGaAIP, operando com onda contínua em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 670 nm, com uma potência de 30 mW, a uma densidade de energia de  $4,5 \text{ J/cm}^2$ .

Após a irradiação foram feitas marcações fluorescentes específicas nas células para a detecção de ATP. Tal marcação foi realizada em grupos celulares 04 e 24 horas após o tratamento fotodinâmico. Foi utilizado o marcador Luciferin-Luciferase, o qual foi incubado com as células por 20 minutos no escuro; após as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 5 minutos. As células foram então analisadas e fotografadas em microscópio de Epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

## Resultados

*Foram verificados os níveis de ATP 4 horas após a Terapia Fotodinâmica:*

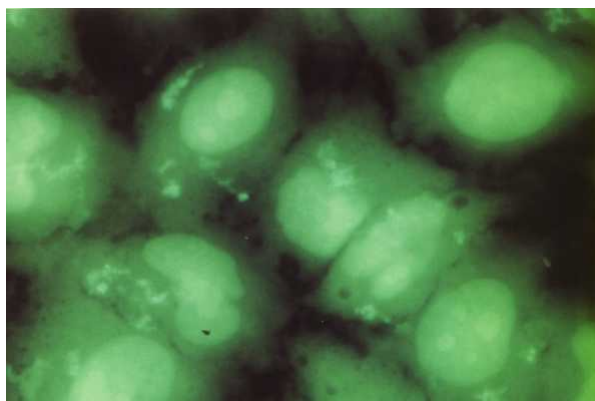


Figura 1A: células controle, sem nenhum tipo de tratamento, após 04 horas, X2500.

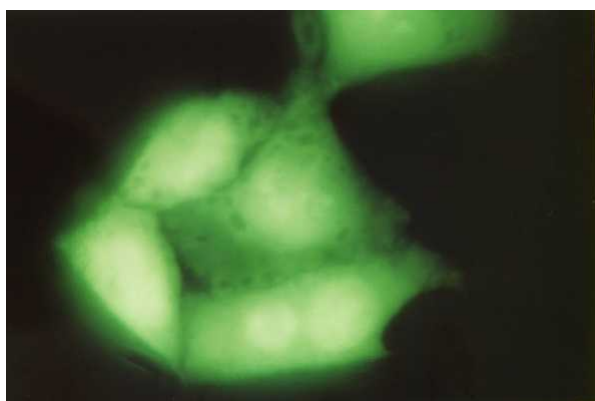


Figura 1B: células incubadas somente com a droga ALPcS<sub>4</sub>, após 04 horas, X2500.

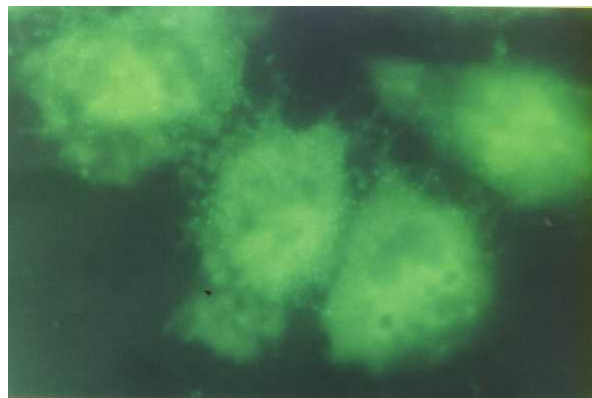


Figura 1C: células tratadas somente com o laser, após 04 horas, X2500.

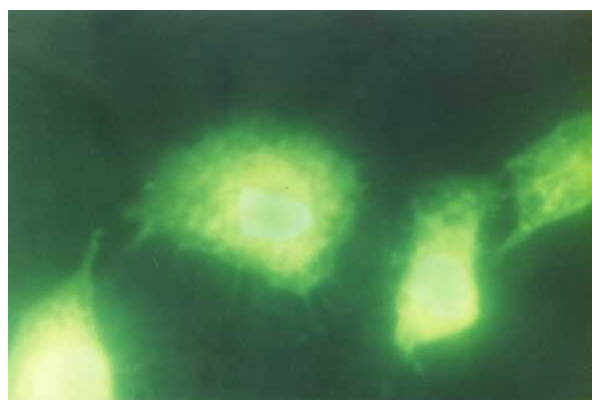


Figura 1D: células que sofreram Terapia Fotodinâmica, após 04 horas, X2500.

*Foram verificados os níveis de ATP 24 horas após a Terapia Fotodinâmica;*

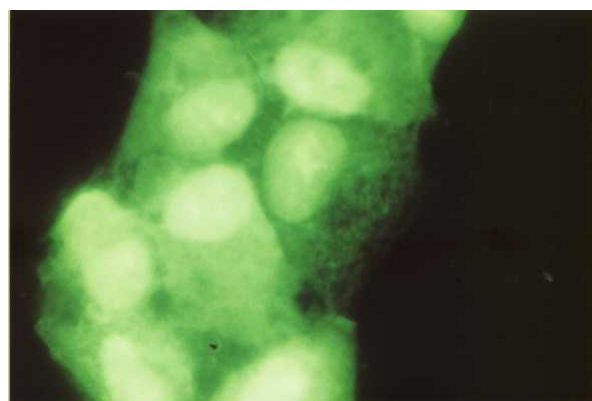


Figura 2A: células controle, sem nenhum tipo de tratamento, após 24 horas, X2500.

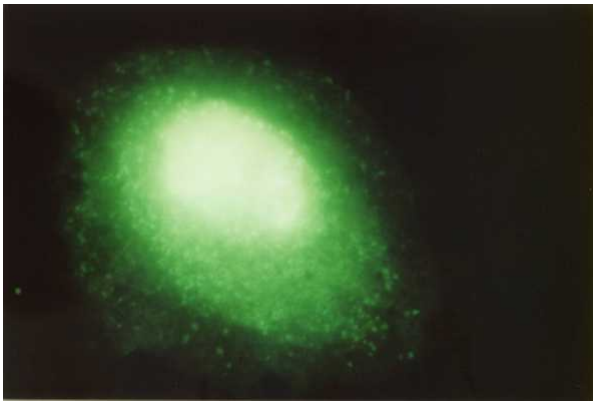


Figura 2B: células incubadas somente com a droga AIPcS<sub>4</sub>, após 24 horas, X2500.

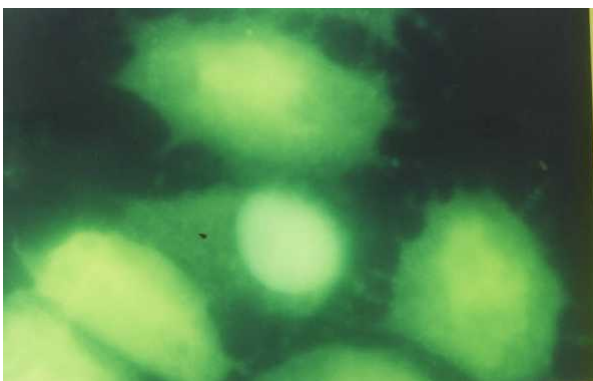


Figura 2C: células tratadas somente com o laser, após 24 horas, X2500.

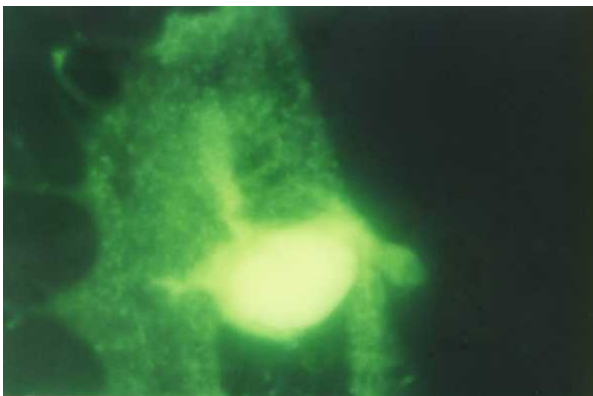


Figura 2D: células que sofreram Terapia Fotodinâmica, após 24 horas, X2500.

## Discussão

Oleinick, 1998 [11], discutiu o possível mecanismo de morte celular decorrente de TFD, concluindo que há evidências de apoptose e necrose após a terapia. O tempo necessário para iniciação da apoptose é bem variável. A maior parte das células, em resposta a agentes indutores, experimenta um período de latência, cuja duração é indeterminada *a priori*, resultando

usualmente na morte de mais de 80% da população celular em intervalo de tempo compreendido entre 1 e 3 dias [12, 13, 14]. Sabe-se então que a quebra do período de latência pode ser determinado pelo aumento da produção de ATP celular, já que o estado de latência é aquele no qual a célula está em um estado de baixo metabolismo. Sendo assim, pode ser observado que a Terapia Fotodinâmica pode vir a induzir às células à morte por apoptose pois, como mostram as figuras 1D e 2D, as células que sofreram Terapia Fotodinâmica apresentaram um aumento significativo na produção de ATP, o que é evidenciado pelo aparecimento da coloração amarelada nas figuras referentes ao tratamento com TFD, diferentemente das células dos outros grupos estudados, como o grupo das células controle (figuras 1A e 2A), como o segundo grupo das células somente incubadas com a droga (figuras 1B e 2B) e como o terceiro grupo das células somente irradiadas com o laser (figuras 1C e 2C) os quais não apresentaram níveis alterados de produção de ATP, o que é apresentado pela coloração esverdeada, já que a alta concentração de ATP se caracteriza pelo aparecimento de coloração amarelada no material.

## Conclusão

Pode-se inferir que a Terapia Fotodinâmica pode vir a causar um processo de inicialização de morte celular por apoptose em células Hep-2, devido ao aumento dos níveis de ATP nas células após o tratamento.

## Referências

- [1] DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 58, 895-900, 1993.
- [2] HENDERSON, B. AND DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55, 145, 1992.
- [3] DOLPHIN, D. *Cancer Journal Chemical* 72, 1005-1013, 1994.
- [4] RICCHELLI, F., JORI, G., GOBBO, S. & TROCHIN, M. *Biophys. Acta.* 1065, 42-48, 1991.
- [5] BIOLO, R., JORI, G., SONCIN, M., PRATASI, R., VANNI, U., RICHTER, B., KENNEY, M. & RODARES, M. *Photochem. Photobiol.* 59, 362-365, 1994.
- [6] GROSS, E., EHREMBERG, B. and JOHNSON, F. M. Singlet oxygen generation by porphyrins and the kinetics of 9,10-dimethylanthracene photosensitization in liposomes. *Photochem. Photobiol.* 57, 808-813, 1993.

- [7] AGARWAL, R.; ATHAR, M.; URBAN, S.A.; BICKERS, D.R. and MUKHTAR, H. Involvement of singlet oxygen in chloroaluminum phthalocyanine tetrasulphonated-mediated photoenhancement of lipid peroxidation in rat epidermal microsomes. *Cancer Letters*. n. 56, p.125-129, 1991.
- [8] HE X.Y.; SIKES R.A.; THOMSEN S.; CHUNG L.W.; JACQUES, S.L. Photodynamic therapy with Photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochemistry and Photobiology*. n. 59, p. 468-473. 1994.
- [9] ZAIDI, SAI ET AL. Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice: electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence. *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 58, n. 6, p. 771-776, 1993.
- [10] WEBBER, J.; LUO, Y.; CRILLY, R.; FROMM, D. AND KESSEL, D. An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B*. **35**, 209-211; 1996.
- [11] OLEINICK, N.L. Apoptosis in response to photodynamic therapy. *Photod. News*, 1: 6-9, 1998.
- [12] KESSEL, D.; LUO, Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J. Photochem. Photobiol B. Biol*. **42**: 89-95; 1998.
- [13] KESSEL, D.; LUO, Y. Photodynamic therapy : A mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ*. **6**: 28-35; 1999
- [14] LUO, Y., CHANG, C.K. AND KESSEL, D. Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol*. **63**, 528-534, 1996.

**Apoio:**

