

# ANÁLISE DO CITOESQUELETO DE CÉLULAS HEP-2 APÓS TFD COM LUZ NÃO COERENTE

**Mariana I.B.P. Martins<sup>1,2</sup>, Aline H.A. Machado<sup>3</sup>, Maíra M. Costa<sup>2</sup>, Renata A. Nicolau<sup>4</sup>, Renato A. Zângaro<sup>5</sup>, Newton S. da-Silva<sup>3</sup>, Cristina Pacheco Soares<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduação em Engenharia Biomédica. IP&D - UNIVAP. E-mail: mariana@univap.br

<sup>2</sup>Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares. IP&D - UNIVAP. E-mail: cpsoares@univap.br

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Celular & Tecidual. IP&D - UNIVAP. E-mail: nsoares@univap.br

<sup>4</sup>Laboratório de Biomodulação Tecidual. IP&D - UNIVAP. E-mail: rani@univap.br

<sup>5</sup>Laboratório de Óptica Biomédica. IP&D - UNIVAP. E-mail: [zangaro@univap.br](mailto:zangaro@univap.br)

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Brasil, 12244-000

Fone: +55 12 3947 9999, Fax: +55 12 3947 9999

**Resumo:** No tratamento de lesões malignas e de determinadas condições benignas, geralmente caracterizadas pelo elevado índice de multiplicação celular, a Terapia Fotodinâmica (TFD) vêm sendo comumente utilizada. O princípio da TFD está baseado na retenção de uma substância fotossensibilizante em células malignas e pré-malignas, seguida da reação entre esta molécula e a luz na qual o tecido é exposto. O objetivo do presente estudo foi analisar possíveis alterações do citoesqueleto produzidas em cultura de células HEP-2 após Terapia Fotodinâmica com luz não-coerente. O LED é uma fonte de luz que vêm sendo empregada para esta função. As células HEP-2 foram incubadas com a AIPcS<sub>4</sub> na concentração 10 µM por 1 hora, irradiadas com LED (640nm +/- 20nm, 4,5J/cm<sup>2</sup>, 70mW, 128 segundos) e re-incubadas em meio mínimo essencial por 24, 48 e 72 horas. Após cada período, as células foram analisadas através da técnica de Microscopia de Fluorescência utilizando-se um marcador específico para o citoesqueleto. As fotomicrografias demonstraram que 24, 48 e 72 horas após TFD, o citoesqueleto de células HEP-2 apresentou desorganização completa dos filamentos de actina, fato não observado nos demais grupos (Controle, LED e fotossensibilizante).

**Palavras-chave:** TFD, Câncer de laringe, Cultura de Células, LED.

**Área do Conhecimento:** Engenharia Biomédica

## Introdução

Aproximadamente 6.600 novos casos de câncer da laringe são registrados por ano no Brasil, representando algo em torno de 5% de todos os novos casos de câncer, com exceção do câncer de pele. O câncer de laringe é primariamente uma doença da meia idade, com picos de incidência na quinta e sexta década. Nas últimas décadas têm se observado um aumento da incidência no sexo feminino, provavelmente devido a mudanças na exposição ao tabaco (BRASIL et al., 2001). Para o tratamento de lesões malignas e de determinadas condições benignas, geralmente caracterizadas pelo elevado índice de multiplicação celular, a Terapia Fotodinâmica (TFD) vêm sendo comumente utilizada (MENEZES et al., 2002). 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 à qual o tecido é exposto, favorecendo a formação de espécies reativas de oxigênio (TEITEN et al., 2003; MOOR, 2000).

Diversas organelas celulares podem ser postuladas como alvos para TFD com diferentes fotossensibilizantes, como: membrana plasmática, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, lisossomos e estruturas citoesqueléticas (DOUGHERTY et al. 1998; FERREIRA et al. 2004, KOLAROVÁ et al., 2005).

A fonte de luz deve emitir radiação com comprimento de onda coincidente com a faixa espectral de absorção do fotosensibilizador e ter energia suficiente para ativá-lo (KOMERIK, 2002). A radiação emitida por um LED apresenta característica não-coerente, com vantagens de apresentar largura espectral próxima da banda de absorção de drogas fotossensíveis, aumentando assim a eficiência da fotossensibilização da droga.

O objetivo do presente estudo foi analisar possíveis alterações do citoesqueleto produzidas em cultura de células HEP-2 após Terapia Fotodinâmica com luz não-coerente.

## Materiais e Métodos

*Cultura de células:* Carcinoma de Laringe Humana (HEP-2, Associação Técnico Científica

Paul Ehrlich – URFJ – RJ). As células HEp-2 foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial (MEM, Gibco-BRL, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific) (MARTINES et al., 2007).

**Fotosensibilizante:** Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada – AlPcS<sub>4</sub> (Porphyrin Products, INC). A solução estoque foi diluída a uma concentração final de 1mM em PBS estéril, esterilizada por filtração através de membrana Filtro Millipore (0.22 µM - Millipore, Bedford, MA, USA) e armazenada no escuro a 4°C (PAZOS et al., 2003).

**Grupos experimentais:** As células HEp-2 foram divididas em 4 grupos: Controle (somente células), Fotosensibilizante (células incubadas com AlPcS<sub>4</sub>), LED (células somente irradiadas) e TFD (células incubadas com AlPcS<sub>4</sub> e irradiadas).

**Incubação e Irradiação:** As células HEp-2 foram trypsinizadas e plaqueadas (1x10<sup>5</sup> células/mL) em placas de 24 poços (TPP) contendo lamínulas estéreis, com meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB e cultivadas "overnight" à 37°C em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período de adesão, as células foram incubadas com a AlPcS<sub>4</sub> (diluída em PBS) na concentração 10 µM e incubadas em condições de crescimento por 1 hora. Após o período de incubação as células foram irradiadas em ambiente protegido à luz, utilizando um Diodo emissor de luz, cujos parâmetros de irradiação foram: Comprimento de onda de 640nm; potência de 70mW; tempo de 128 segundos; densidade de energia de 4,5 J/cm<sup>2</sup> e área: 2 cm<sup>2</sup> (área coincidente com área da placa de cultura). Após irradiação, as células receberam novamente o meio de cultura MEM suplementado com 10% SFB e foram mantidas em condições de crescimento à 37°C em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> por 24, 48 e 72 horas.

**Microscopia de Fluorescência - Marcação para Citoesqueleto:** Após os procedimentos previamente descritos, as células foram fixadas em Paraformaldeído 4% e Triton X-100 (1:100), após fixação, lavou-se as células com tampão PHEM. Estas foram então incubadas com Rodamina-faloidina (1:100 PHEM) por 1 hora em ambiente com ausência de luz, após incubação as células foram lavadas com tampão PHEM novamente. Após a marcação, as lamínulas foram montadas em lâminas contendo N-propil galato. Foram registradas fotomicrografias do material em um microscópio de epifluorescência Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30 .

## Resultados

Os resultados obtidos através de análise das fotomicrografias de Microscopia de Fluorescência,

demonstraram que nos grupos: Controle (Figuras 1A, 2A e 3A), Fotosensibilizante (Figuras 1B, 2B e 3B) e LED (Figuras 1C, 2C e 3C) demonstraram a distribuição homogênea dos filamentos de actina intacto para todos os tempos. O grupo TFD, quando analisado, permitiu a observação de completa desorganização dos filamentos de actina (Figuras 1D, 2D, 3D) ocorrendo a presença da forma despolimerizada chamada globular (G-actina). Importante ressaltar que nos períodos de 48 e 72 horas tal processo é mais evidente, sendo quase nula a fluorescência.

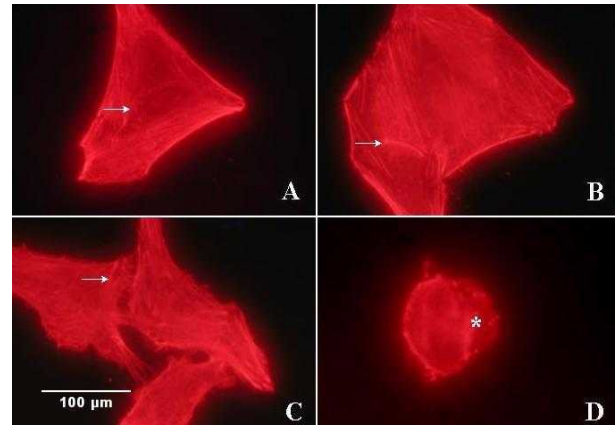


Figura 01: Citoesqueleto de células HEp-2 24 horas após TFD com LED. A) Grupo Controle; B) Grupo Fotosensibilizante; c) Grupo LED; d) Grupo TFD (seta: F-actina; asterisco: G-actina).

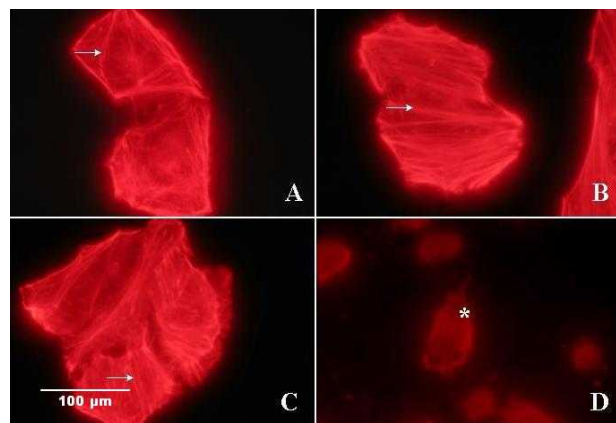


Figura 02: Citoesqueleto de células HEp-2 48 horas após TFD com LED. A) Grupo Controle; B) Grupo Fotosensibilizante; c) Grupo LED; d) Grupo TFD.

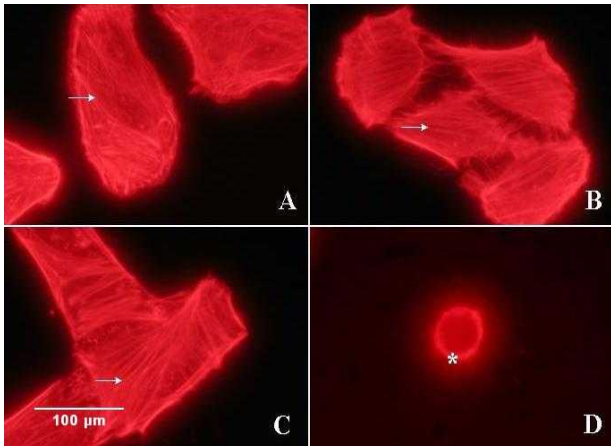


Figura 03: Citoesqueleto de células HEP-2 72 horas após TFD com LED. A) Grupo Controle; B) Grupo Fotossensibilizante; c) Grupo LED; d) Grupo TFD.

## Discussão

A TFD, tendo como fonte luminosa o laser, tem como alvo várias estruturas celulares dentre elas membrana plasmática e endomembranas, entretanto tem se verificado que os danos ocasionados nestas estruturas são refletidos na organização do citoesqueleto, em especial os filamentos de actina (FERREIRA et al., 2004). Nossos resultados demonstram uma maior despolimerização dos filamentos quando comparados ao de CARNEVALLI et al 2003. Notou-se que a despolimerização dos filamentos intermediários do citoesqueleto em culturas irradiadas com laser são observadas em 48h após o início dos experimentos, empregando marcador específico para citoesqueleto - rodamina faloidina.

A utilização de LED como fonte de luz para TFD, foi avaliada, objetivando verificar se o comportamento deste tipo de luz assemelha-se ao laser no que diz respeito a actina. A análise dos resultados permitiu verificar que mais de 90% das células submetidas a TFD tiveram a F-actina despolimerizada para G-actina, demonstrando desorganização e redução na presença destes filamentos. As células submetidas ao tratamento com o fotossensibilizante e com o LED isoladamente, apresentaram a disposição dos filamentos de actina igual ao das células sem nenhum tratamento, o que vem confirmar o efeito danoso da associação do fotossensibilizante+LED. Este fato indica ação mais evidente do LED 24 horas após TFD em comparação com experimentos previamente desenvolvidos empregando o laser (TAMIETTI et al., 2007b), sugerindo uma potencialização do fotossensibilizante quando combinado com LED.

Após a análise dos resultados foi possível dizer que TFD com LED possui vantagens em relação a TFD com LASER, pois além de potencializar o efeito fotodinâmico, o LED possui fácil manipulação e baixo custo, tornando assim, o tratamento mais viável.

A despolimerização ou quebra da actina, citoqueratina, laminina e outras proteínas do citoesqueleto estão envolvidos na preparação celular para divisão celular (mitose), bem como nos passos de execução do processo de morte celular por apoptose. (BURSCH et al., 2000). Como trabalhos futuros, esta ausência e modificação morfológica poderiam ser estudadas na avaliação da atividade mitocondrial para a comprovação da não efetividade do LED, empregado na ausência do fotossensibilizante, sobre divisão celular e concentração de canais de cálcio intactos nos parâmetros testados, como estudados por NICOLAU et. al., 2004 (a, b).

## Conclusão

A TFD utilizando o LED promove danos ao citoesqueleto de células HEP-2 culminando em desorganização completa dos filamentos de actina, o que não ocorre nos demais grupos.

## Agradecimentos

IP&D -Univap, FAPESP, CNPq, CAPES.

## Referências

- BRASIL O. C.MANRIQUE D.EINSTEIN. 2004; 2(3):222. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Globocan 2000. Version 1.0 IARC CancerBase, 5. Lyon:IARC Press; 2001.
- BURSCH, W.; ELLINGER, A.; GERNER, C.H.; FRÖHWEIN, U.; Schulte-Hermann, R. Programmed cell death (PCD): apoptosis, autophagic PCD or others? In: Mechanisms Cell Death. Annals of the New York Academy of Sciences. v.926, p.1-12, 2000.
- CARNEVALLI M. M.C., SOARES P. C., ZÂNGARO R.A.,PINHEIRO B.L.A.,SILVA S.N Laser Light Prevents Apoptosis on Cho K-1 Cell Line v. 21, n.4, pg. 193-196,2003.
- DOUGHERTY, T.J; GOMER, C.J; HENDERSON, B.W; JORI, G; KESSEL, D; KORBELIK, M; MOAN, J; PENG, Q. Review: Photodynamic Therapy. J. Nat. Cancer Inst. V.90, p.889-905, 1998.

- FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C.; SOUSA, G.; ZÂNGARO, R.A.; SILVA, N.S.; PACHECO, M.T.T.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS4. *Lasers Med. Sci.* v.18, p.207-212, 2004.
- KOLAROVÁ, H.; MACECEK, J.; NEVRELOVA, P.; HUF, M.; TOMECKA, M.; MOSINGER, J.; STRNAD, M. Photodynamic therapy with zinc-tetra (ñ-sulfophenyl) porphyrin bound to cyclodextrin induces single strand breaks of cellular DNA in G361 melanoma cells. *Toxicol. In Vitro.* V.19, p.971-974, 2005.
- KOMERIK, N. A novel approach to cancer treatment: Photodynamic therapy. *Turkish J. cancer.* v.32, n.3, p.33-41, 2002.
- MARTINES N. S., MACHADO H. A, DA SILVA N. A, TEDESCO A. C., ZÂNGARO R. A., SOARES C. P. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica.; *Arquivos Catarinenses de Medicina* Vol. 36, no. 1, p. 59-64, 2007.
- PAZOS M. C., SOARES C. P., DA –SILVA N., DAMATTA R. A., PACHECO M. T. T., BIOCELL, Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation 2003, 27(3): 301-309.
- MENEZES, A.M.E. et. al Atributed risk to smoking for lung câncer, laryngeal cancer and esophageal cancer. *Rev. Saúde Pública.* v.36, n.2, 2002.
- MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.* v.57, p. 1-13, 2000.
- NICOLAU, R. A.; MARTINEZ, M. S.; RIGAU, J.; TOMAS, J. Effect of low power 655 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. *Lasers Surg. Med.* v.34, n.3, p.277-84, 2004a.
- NICOLAU, R. A. MARTINEZ, M. S.; RIGAU, J.; TOMAS, J. Neurotransmitter release changes induced by low power 830 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse. *Lasers Surg. Med.* v.35 n.3, p.236-41, 2004b.
- TAMIETI B. P.; DAMATTA R. A.; COGO J. C. ; DA SILVA N. S.; MITTMANN J. ; PACHECO-SOARES C. J. Venom. *Anim. Toxins incl. Trop. Dis. Cytoskeleton, endoplasmic reticulum and nucleus alterations in CHO-K1 Cell Line after Crotalus durissus terrificus (South American Rattlesnake) Venom Treatment.* V..13, n.1, p.56-68, 2007.a
- TAMIETTI, B.F.P.; MACHADO, AHA; MAFTOUM-COSTA, M; DA-SILVA, NS; TEDESCO, AC; PACHECO-SOARES, C. Analysis of Mitochondrial Activity related to cell death after PDT with AIPcS4. *Photomedicine and Laser Surgery* v 25, n.3, 2007.b. In press.
- TEITEN, M.H.; MARCHAL, S.; D-HALLEWIN, M.A.; GUILLEMIN, F.; BEZDETAYAY, L. Primary photodamage sites and a mitochondrial events after Foscan® photosensitization of MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Photochem. Photobiol.* v. 78, n.1, p.9-14, 2003.