

## AVALIAÇÃO DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO DE CÉLULAS HEP-2 APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA COM A ZINCO FTALOCIANINA OCTA-BROMADA

**Aline Helena Araujo Machado<sup>1</sup>, Cristina Pacheco Soares<sup>2</sup>, Milton Beltrame Júnior<sup>3</sup>,  
Newton Soares da Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>IP&D-UNIVAP / Laboratório de Biologia Celular & Tecidual, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos-SP, alineh@univap.br

<sup>2</sup>IP&D-UNIVAP / Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Intracelulares, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos-SP, cpsoares@univap.br

<sup>3</sup>IP&D-UNIVAP / Laboratório de Síntese Orgânica, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos-SP, beltrame@univap.br

**Resumo-** Terapia Fotodinâmica é uma técnica utilizada atualmente para o tratamento do câncer que envolve a administração de um agente fotossensibilizante seguida por iluminação local do tumor com luz de um apropriado comprimento de onda para ativar uma droga específica. Diversas organelas celulares vêm sendo postuladas como alvo no processo de Terapia Fotodinâmica, dentre elas podemos citar o retículo endoplasmático. O objetivo do presente estudo é avaliar os danos ocasionados ao retículo endoplasmático de células HEP-2 após Terapia Fotodinâmica com a Zinco Ftalocianina Octa-bromada. Células HEP-2 foram cultivadas como de rotina, incubadas com ZnPcBr<sub>8</sub> (1µM) por 1 hora, irradiadas com um laser semicondutor de diodo (660nm, 30mW, 4.5J/cm<sup>2</sup>), incubadas em meio MEM por 1 ou 24 horas. A análise dos resultados foi através de Microscopia de fluorescência utilizando-se o DiOC6(3). Através dos resultados obtidos pode-se observar que a TFD com ZnPcBr<sub>8</sub> ocasionou danos irreversíveis ao retículo endoplasmático de células HEP-2.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica, câncer, ftalocianina, laser.

**Área do Conhecimento:** Engenharia Biomédica.

### Introdução

Terapias contra o câncer geralmente se baseiam no uso de agentes quimioterapêuticos que eliminam eficientemente células cancerígenas em divisão. Porém, em muitos casos, a quimioterapia falha na erradicação do tumor, e mesmo quando a quimioterapia é aplicada com sucesso, a citotoxicidade sistêmica geralmente resulta em efeitos secundários danosos. Para superar estas limitações, estratégias inovativas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de se aumentar a seletividade do tratamento (DYBA; TARASOVA; MICHEJDA, 2004; AMESSOU et al., 2008).

Dentre essas técnicas, podemos citar a Terapia Fotodinâmica, que envolve a administração de um agente fotossensibilizante seguida por iluminação local do tumor com luz de um apropriado comprimento de onda para ativar uma droga específica (TRIESSCHEIJN et al., 2006). Na presença de oxigênio molecular, a iluminação por luz do fotossensibilizante pode ocasionar uma série de reações fotoquímicas e, conseqüentemente, gerar uma variedade de espécies citotóxicas (QIANG et al., 2006). O fotossensibilizante excitado, seletivamente

acumulado no tumor, ativa a geração de espécies reativas de oxigênio, os quais irão causar a morte da célula cancerígena via necrose e/ou apoptose [ZAWACKA-PANKAU et al., 2007]. Este tipo de tratamento apresenta diversas vantagens, incluindo sua natureza minimamente invasiva, tolerância de doses repetidas e alta especificidade, a qual pode ser obtida através de uma aplicação precisa da luz [BROWN; BROWN; WALKER, 2004; LIU et al., 2008].

Uma das fontes de luz mais utilizada no processo de TFD é o laser. O laser produz luz monocromática de alta energia de um específico comprimento de onda com uma estreita largura de faixa para um fotossensibilizante específico (PERVAIZ; OLIVO, 2006). Dentre as vantagens dos lasers podemos citar, habilidades de se acoplar à fibra óptica para acessar tumores internos, de selecionar um comprimento de onda específico, maximizando assim a profundidade de penetração e de se alcançar irradiâncias maiores, diminuindo assim o tempo de exposição (ALEXIADES-ARMENAKAS, 2006).

O objetivo do presente projeto é avaliar os danos ocasionados ao retículo endoplasmático de células HEP-2 após Terapia Fotodinâmica com a Zinco Ftalocianina Octa-bromada.

## Metodologia

**Cultura de células:** A linhagem utilizada foi a Hep-2 (Carcinoma de Laringe Humana). As células Hep-2 foram cultivadas como de rotina em garrafas de 25cm<sup>2</sup> com Meio Mínimo Essencial suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

**Fotossensibilizante:** Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr<sub>8</sub>) foi preparada a uma concentração estoque de 1mM em Dimetil Sulfoxido estéril, esterilizada por filtração através de membrana Millipore (0.22µm) e estocada no escuro a 4°C.

**Incubação com o fotossensibilizante:** As células Hep-2 foram plaqueadas (densidade de 1x10<sup>5</sup> células/mL) em placas de 24 poços contendo lamínulas. Após 24 horas de cultura, as células foram incubadas com ZnPcBr<sub>8</sub> (diluído em Tampão Fosfato Salino) na concentração 1µM por 1 hora em estufa a 37°C.

**Grupos de experimento:** As células HEp-2 foram divididas em 4 grupos, Controle (somente células), Fotossensibilizante (células somente incubadas com ZnPcBr<sub>8</sub>), Laser (células somente irradiadas) e TFD (células incubadas com ZnPcBr<sub>8</sub> e irradiadas com Laser).

**Tratamento fotodinâmico:** Após incubação, as células foram lavadas com PBS e 200µL de PBS fresco foi adicionado para irradiação, que foi realizada no escuro com um laser semiconductor de diodo (Unidade Laser Bio Wave LLLT Dual - Kondortech Equipamentos Odontológicos Ltda, São Carlos, Brazil), cujos parâmetros foram (tabela 1):

Tabela 1 - Parâmetros de irradiação Laser.

Parâmetros	Valores
Comprimento de onda	660nm
Potência	30mW
Densidade de energia	4.5J/cm <sup>2</sup>
Tempo	5 minutos
Área	2cm <sup>2</sup>

Após irradiação, o PBS foi removido e o Meio MEM com 10% de SFB foi adicionado às células por 1 e 24 horas de cultura em estufa a 37°C.

**Microscopia de Fluorescência:** Após cada período as células foram marcadas com DiOC<sub>6</sub>(3) (10µg/mL - Molecular Probes) por 15 minutos, lavadas com Tampão Fosfato Salino, fixadas com Paraformaldeído 4% por 10 minutos. As lamínulas foram montadas em lâminas com n-propil galato. As fotomicrografias foram realizadas em um Microscópio Leica DMLB.

## Resultados

Para a visualização das estruturas do retículo endoplasmático, células foram incubadas com o marcador fluorescente catiônico DiOC<sub>6</sub>(3).

Através das fotomicrografias pode-se observar alterações dos elementos tubulares formados em numerosos locais ao longo do citoplasma após TFD com a Zinco Ftalocianina Octa-bromada em ambos os tempos, 1 (Figura 1D) e 24 horas (Figura 2D). Tais características não foram observadas nos demais grupos (controle, fotossensibilizante e laser), os quais apresentaram morfologia normal em ambos os tempos, 1 e 24 horas (Figuras 1A, 1B, 1C, 2A, 2B e 2C, respectivamente).

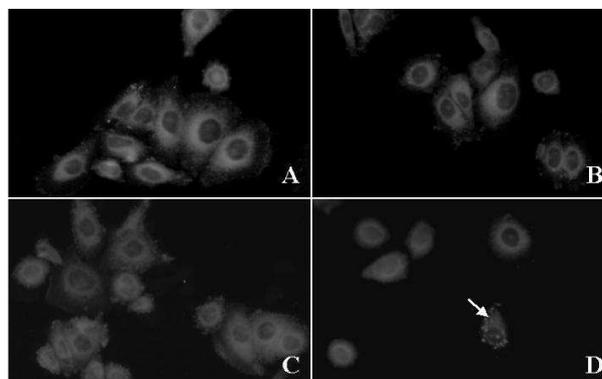


Figura 1 - Retículo endoplasmático de células HEp-2 após 1 hora do tratamento. A) Controle; B) Fotossensibilizante; C) Laser; D) TFD. Seta: alterações na rede tubular do retículo endoplasmático. Aumento: 400x.

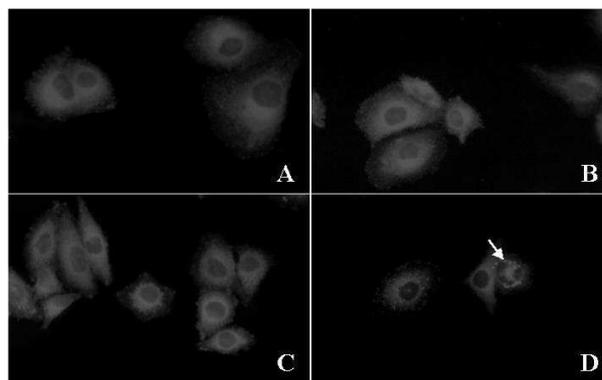


Figura 2 - Retículo endoplasmático de células HEp-2 após 24 horas do tratamento. A) Controle; B) Fotossensibilizante; C) Laser; D) TFD. Seta: alterações na rede tubular do retículo endoplasmático. Aumento: 400x.

## Discussão

As membranas celulares vêm sendo identificadas como importantes alvos intracelulares no processo da Terapia Fotodinâmica, dentre elas podemos citar as membranas do retículo endoplasmático distribuídas através do citoplasma (FERREIRA et al., 2004; MAFTOUM-COSTA et al., 2008).

O retículo endoplasmático é o primeiro compartimento do caminho secretório que apresenta regiões especializadas com ligação de ribossomos no compartimento dedicado à síntese protéica, nessas áreas, domínios lisos tubulares estendidos, os elementos transicionais, participam do transporte medicado pela vesícula (GRIFFITHS, 2001).

Vêm sendo sugerido que o retículo endoplasmático age como um ponto de controle crítico em diversos paradigmas apoptóticos induzidos por sinais celulares que causam sobrecarga ou perturbação de cálcio na homeostase de  $Ca_2^+$  (DEMAUREX; DISTELHORST, 2003).

Após 1 e 24 horas da Terapia Fotodinâmica utilizando-se a Zinco Ftalocianina Octa-bromada em cultura de células Hep-2 foi possível observar alterações nos elementos tubulares formados em numerosos locais ao longo do citoplasma, sendo importante salientar que este fato não aconteceu nos demais grupos, controle, fotossensibilizante e laser.

Tais alterações morfológicas ocasionadas ao retículo endoplasmático foram previamente observadas por Ferreira et al., (2004) e Maftoum-Costa et al., (2008), após TFD em cultura de células de Carcinoma Humano (HeLa), utilizando-se o agente fotossensibilizante Cloro-alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>) (FERREIRA et al., 2004; MAFTOUM-COSTA et al., 2008).

## Conclusão

A Terapia Fotodinâmica com a Zinco Ftalocianina Octa-bromada ocasionou danos irreversíveis ao retículo endoplasmático de células HEp-2.

**Agradecimentos:** IP&D/UNIVAP, FAPESP e CAPES.

## Referências

- ALEXIADES-ARMENAKAS, M. Laser-mediated photodynamic therapy. **Clin. Dermatol.** v.24, p.16-25, 2006.

- AMESSOU, M.; CARREZ, D.; PATIN, D.; SARR, M.; GRIERSON, D.S.; CROISY, A.; TEDESCO, A.C.; MAILLARD, P.; JOHANNES, L. Retrograde Delivery of Photosensitizer (TPPp-O-β-GluOH)<sub>3</sub> Selectively Potentiates Its Photodynamic Activity. **Bioconjug. Chem.** v.19, p.532-538, 2008.

- BROWN, S.B.; BROWN E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncol.** v.5, n.8, p.497-508, 2004.

- DEMAUREX, N.; DISTELHORST, C. Cell Biology: Apoptosis - the calcium connection. **Sci.** v.300, p.65-67, 2003.

- DYBA, M.; TARASOVA, N.I.; MICHEJDA, C.J. Small molecule toxins targeting tumor receptors. **Curr. Pharm. Des.** v.10, p.2311-2334, 2004.

- FERREIRA, S.D.R.M.; TEDESCO, A.C.; SOUSA, G.; ZÂNGARO, R.A.; DA-SILVA, N. S.; PACHECO, M.T.T.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmatic reticule and actin filaments after PDT with AIPcS<sub>4</sub>. **Lasers Med. Sci.** v.18, p.207-212, 2004.

- GRIFFITHS, E.J. Mitochondria—potential role in cell life and death. **Cardiovasc. Res.** v.46, p.24-27, 2000.

- LIU, Y.Y.; XIA, S.Q.; ZENG, Z.H.; QIAO, R.; WANG, X.S.; ZHANG, B.W. Synthesis of a hypocrellin B-polyamide conjugate as DNA-targeting photosensitizer. **Chin. Chem. Let.** v.19, p.157-160, 2008.

- MAFTOUM-COSTA, M.; NAVES, K.T.; OLIVEIRA, A.L.; TEDESCO, A.C.; DA-SILVA N.S.; PACHECO-SOARES, C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. **Cell Biol. Inter.** In press, 2008. doi: 10.1016/j.cellbi.2008.04.005.

- PERVAIZ, S.; OLIVO, M. Frontiers in Research Review: Cutting-Edge Molecular Approaches to Therapeutics Art and Science of Photodynamic Therapy. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v.33, p.551-556, 2006.

- QIANG, Y.G.; ZHANG, X.P.; LI, J.; HUANG, Z. Medical progress Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. **Chin. Med. J.** v.119, n.10, p.845-857, 2006.

- TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENSA, J.H.M.; STEWARTA, F.A. Photodynamic Therapy in Oncology. **The Oncol.** v.11, p.1034-1044, 2006.

- ZAWACKA-PANKAU, J.; ISSAEVA, N.; HOSSAIN, S.; PRAMANIK, A.; SELIVANOVA, G.; PODHAJSKA, A.J. Protoporphyrin IX Interacts with Wild-type p53 Protein in Vitro and Induces Cell Death of Human Colon Cancer Cells in a p53-dependent and -independent Manner. **J. Biol. Chem.** v.282, n.4, p.2466-2472, 2007.