

---

**ARTIGO ORIGINAL**

---

***Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica*****Nilcéneia S. Martines<sup>1</sup>, Aline H. A. Machado<sup>2</sup>, Newton Soares da Silva<sup>3</sup>, Antônio Cláudio Tedesco<sup>4</sup>, Renato Amaro Zângaro<sup>5</sup>, Cristina Pacheco-Soares<sup>6</sup>****Resumo**

Terapia fotodinâmica (TFD) vem sendo considerada um moderno tratamento para o câncer e severas outras condições médicas. O presente estudo tem por objetivo analisar as alterações morfológicas e ultraestruturais de células neoplásicas Hep-2 submetidas a TFD utilizando a Zinco Ftalocianina. Células Hep-2 foram cultivadas de maneira padrão com meio MEM, incubadas com a ZnPc na concentração 9mM por 1 hora, irradiadas com um laser de diodo, analisadas através de técnicas de Microscopia de Fluorescência utilizando marcadores específicos (DAPI e JC-1) e Microscopia Eletrônica de Transmissão. As células neoplásicas Hep-2 submetidas a TFD mostraram-se fotodanificadas morfológica e ultraestruturalmente, sendo possível observar algumas alterações nas organelas celulares. Portanto, pode-se concluir que após TFD utilizando a ZnPc estas células sofreram morte por apoptose.

**Descritores:** 1. Câncer;  
2. Terapia fotodinâmica;  
3. Apoptose.

**Abstract**

Photodynamic Therapy (PDT) have been considered a modern treatment for cancer and several others medical conditions. The present study has for objective to analyze the morphological and ultrastructural alterations of Hep-2 neoplastic cells submitting to PDT using a Zinc Phthalocyanine. Hep-2 cells were cultivated of standard form with MEM medium, incubated with the ZnPc at 9mM concentration for 1 hour, irradiated with a diode laser, analyzed through of technique of Fluorescence Microcopy using specific staining (DAPI and JC-1) and Transmission Electronic Microscopy. The Hep-2 neoplastic cells submitted to PDT presented photodamaged morphological and ultrastructurally, have been possible to observe some alterations in the cell organelles. Therefore, we can conclude that after PDT using the ZnPc these cells suffer death for apoptosis.

**Keywords:** 1. Cancer;  
2. Photodynamic therapy;  
3. Apoptosis.

---

<sup>1</sup> Mestre em Engenharia Biomédica. Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Universidade do Vale do Paraíba.

<sup>2</sup> Mestranda em Engenharia Biomédica. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Universidade do Vale do Paraíba.

<sup>3</sup> Doutor em Biociências e Biotecnologia. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Universidade do Vale do Paraíba.

<sup>4</sup> Livre Docente. Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

<sup>5</sup> Doutor em Engenharia. Laboratório de Fluorescência. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Universidade do Vale do Paraíba.

Auxílio financeiro – FAPESP

## Introdução

Um tumor caracteriza-se por um crescimento anormal de tecido vivo, podendo ser considerado como benigno ou maligno (o câncer) <sup>(1)</sup>. Diante dos graves efeitos colaterais e da eficiência limitada das terapias tradicionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia) outras alternativas estão sendo constantemente propostas na área de oncologia, <sup>(2)</sup> como é o caso da terapia fotodinâmica (TFD), que vem sendo considerada um moderno tratamento para o câncer <sup>3</sup> e severas outras condições médicas <sup>(4)</sup>. O princípio básico deste tratamento é uma reação fotoquímica não térmica, a qual requer a presença simultânea de uma droga fotossensibilizante, oxigênio e luz visível <sup>(4,5,6,7,8,9)</sup>. O fotossensibilizante excitado por um fóton inicia uma cascata de reações químicas formando tanto o produto oxidativo (reação tipo I) quanto oxigênio singlete (reação tipo II), levando a uma citotoxicidade direta ou dano vascular, e subsequentemente, a uma regressão tumoral <sup>(10)</sup>. As ftalocianinas constituem uma extensa classe de componentes com alto coeficiente de excitação na região vermelha do espectro (630-750 nm), apresentando excelentes propriedades de localização tumoral e alta eficiência fotossensibilizante <sup>(5,11)</sup>. A terapia fotodinâmica pode produzir apoptose ou necrose, ou uma combinação dos dois mecanismos <sup>(12)</sup>. Apoptose é uma forma regulada de morte celular fisiológica que é dependente da expressão de suicídio maquinário intrínseco celular, no qual uma cascata da caspases é induzida <sup>(13)</sup>. Morfológicamente, os elementos cruciais do processo são condensação da cromatina, encolhimento celular e produção de corpos apoptóticos os quais são engolfados por células circunvizinhas e então fagocitados <sup>(14,15)</sup>. O presente estudo teve por objetivo analisar as alterações morfológicas e ultraestruturais de células neoplásicas Hep-2 submetidas a TFD utilizando a Zinco Ftalocianina (ZnPc).

## Métodos

### Fotossensibilizante

O agente fotossensibilizante utilizado foi a Zinco Ftalocianina (ZnPc). A solução estoque foi diluída em DMSO (Dimetil Sulfoxido) estéril a uma concentração final de 1mM, sendo então esterilizado por filtração através de um filtro de membrana Millipore (0.22µm - Millipore, Bedford, MA, USA) e estocado no escuro a 4°C até o momento de sua utilização.

### Cultura Celular

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a Hep-

2 (carcinoma de traquéia humano- ATCC). As células foram cultivadas em meio de cultura MEM (Meio Mínimo Essencial – Gibco BRL, ON, Canadá) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% antibiótico/antimicótico - penicilina (100 mg/ml) e estreptomicina (100 mg/ml), mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### Teste de Citotoxicidade

As células Hep-2 foram plaqueadas (5x10<sup>4</sup> células/mL) em microplacas de 96 poços, com meio de cultura MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para adesão das células em estufa de CO<sub>2</sub> 5% e temperatura 37 °C incubadas *overnight*. Após este período as células foram lavadas com PBS para remoção do meio com SFB pois e incubadas com ZnPc e DMSO nas concentrações de 1, 2, 4, 9, 11 e 22 ml de ZnPc e as porcentagens de DMSO que corresponderam a este volume de droga: 0,1; 0,2; 0,4; 0,9; 1,8; 2,2; e 4,4 % em seus respectivos poços para o teste. O tempo de incubação das células com o fotossensibilizantes e DMSO foi de 1 hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, ao término deste período, as células foram lavadas com PBS reincubadas com meio MEM contendo 10% de SFB por 24h. Após o período de incubação as células foram submetidas ao tratamento de MTT(3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolom bromide) onde adicionou-se 50µL, uma concentração final de 0,5 mg/mL e incubadas por 4h a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a seguir adicionou-se 200µL DMSO (Dimetil sulfoxido) em cada poço. A placa foi mantida em um agitação para a solubilização dos cristais de formazana por 10 minutos. A leitura foi realizada em l= 570nm em espectrofotômetro Spectra Count-Packard.

### Tratamento Fotodinâmico

Para ambas as técnicas foram utilizados 4 grupos: controle (somente células), fotossensibilizante (células somente incubadas com ZnPc), laser (células somente irradiadas) e TFD (células incubadas com ZnPc e irradiadas). As células Hep-2 foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 1x10<sup>5</sup> células/mL em cada poço de uma placa de 24 poços (Nunc, Denmark) contendo lamínulas estéreis para a Microscopia de Fluorescência e uma densidade de 1,5x10<sup>6</sup> células/mL em placas de Petri de 10 mm (Nunc, Denmark) para a Microscopia Eletrônica. Após plaqueamento, adicionou-se meio MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina e deixou-as *overnight* para adesão a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após adesão, as células do grupo fotossensibilizante e TFD foram

incubadas por 1 hora com a ZnPc na concentração 9mM. Após incubação, as células do grupo Laser e TFD foram então irradiadas no escuro com um laser diodo semiconductor operando a 670 nm em modo de onda contínua. Um tempo de irradiação de 144 segundos para Microscopia de Fluorescência e 28 minutos para Microscopia Eletrônica foram utilizados para entregar 4,5 J/cm<sup>2</sup> (Potência = 25 mW). Após irradiação, as células foram cultivadas em condições de crescimento por 30 minutos.

#### Microscopia de Fluorescência

Para marcação do núcleo foi utilizado o marcador específico DAPI (4', 6' - diamidino, 2' phenylindole - Invitrogen), na concentração 0,03 mM/mL. As células Hep-2 foram fixadas com paraformaldeído a 4% (diluído em tampão fosfato 0.1M) por 10 minutos, lavadas em PBS e incubadas com DAPI por 10 minutos. Para marcação de mitocôndrias foi utilizado o marcador específico JC-1 (5,5',6,6', -tetrachloro -1,1'3,3', tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide - Invitrogen), na concentração 10mM/mL. As células foram incubadas com JC-1 por 10 minutos, lavadas em PBS e fixadas em paraformaldeído a 4% (diluído em tampão fosfato 0.1M) por 10 minutos. Após as marcações, todas as lamínulas foram lavadas em PBS e montadas em lâminas contendo N-propil-galato, sendo então analisadas e fotografadas utilizando um Fotomicroscópio Leica (DMLB) equipado com lâmpada de mercúrio HBO 100W e os filtros correspondentes para microscopia de fluorescência: UV, azul e verde.

#### Microscopia Eletrônica

Após os procedimentos previamente descritos, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com glutaraldeído a 2.5%, paraformaldeído a 4% e tampão fosfato 0.1M (pH 7.2) por 2 horas a 4°C. As células foram raspadas da placa de Petri com um "cellscraper", centrifugando-se 3 vezes (1500g, 10 minutos) com tampão fosfato 0.1M e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% (diluído em tampão fosfato) por 30 minutos. As células foram lavadas novamente, desidratadas em acetona e embebidas em Epon. Após as secções, as células foram contrastadas com acetato de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos. As grades contendo as células foram analisadas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM10.

## **Resultados**

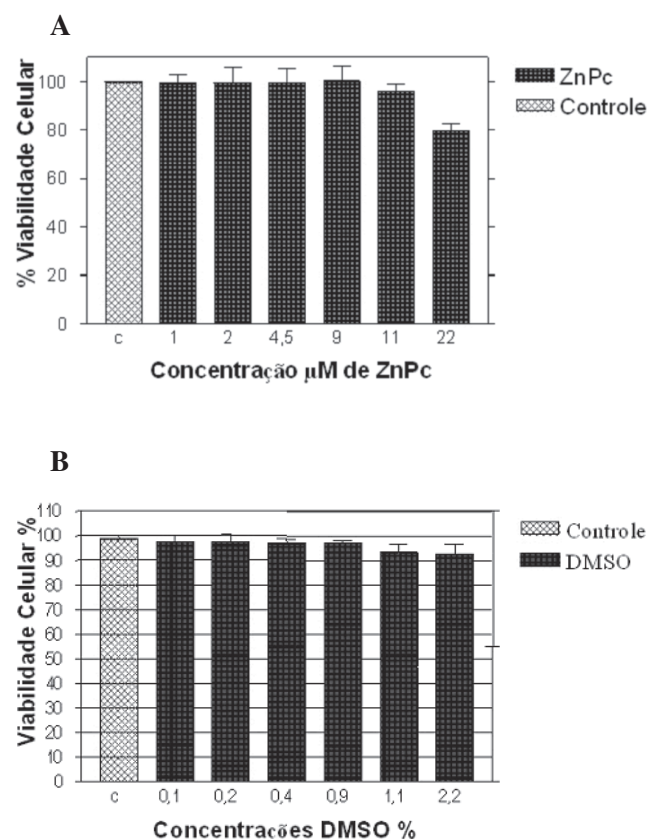
### Citotoxicidade

O teste de MTT foi aplicado para analisar a

citotoxicidade do fotossensibilizador ZnPc nas diferentes concentrações (1, 2, 4,5, 9, 11 e 22 mM) frente a linhagem Hep-2. Objetivando ainda encontrar a máxima concentração de ZnPc na qual a linhagem Hep-2 demonstrasse uma alta percentagem de sobrevivência celular na ausência de luz.

Os resultados demonstraram uma queda na percentagem de sobrevivência em aproximadamente 95 e 80%, somente nas maiores concentrações 11µM e 22µM respectivamente (figura 1a). Afirmando assim que ZnPc apresenta baixa toxicidade, característica esta necessária para os fotossensibilizadores. Com estes dados determinamos as condições de tratamento para PDT utilizando as concentrações de 4,5 e 9mM.

**Figura 1: (a) Viabilidade de Células Hep-2 após 24h do tratamento com fotossensibilizador Zinco ftalocianina (ZnPc), média e desvio padrão de 6 experimentos. (b) Viabilidade de Células Hep-2 após 24h de incubação com DMSO variando as concentrações.**



Baseado no mesmo objetivo que a citotoxicidade da ZnPc, este teste foi aplicado também ao seu veículo DMSO procurando encontrar a máxima concentração

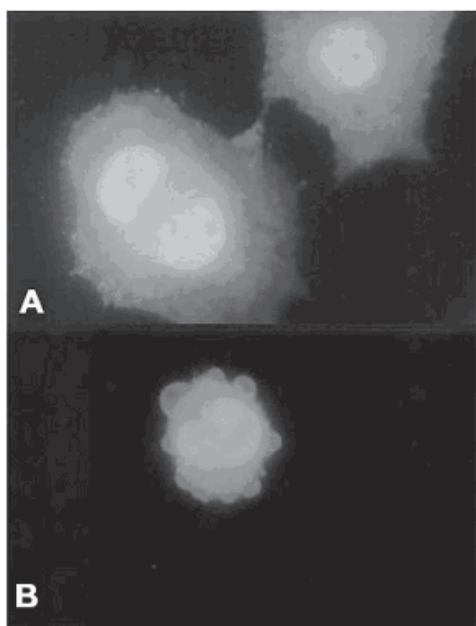
para o qual a linhagem Hep-2, demonstrasse uma alta percentagem de sobrevivência celular na ausência de luz. A incubação foi realizada por 60 minutos.

Para as células tratadas somente com o DMSO, observou-se uma queda em 11mM e 22mM, mantendo a porcentagem de células vivas na faixa de 93% e 92% respectivamente (figura 1b). O veículo DMSO não se mostrou tóxico nas concentrações utilizadas permanecendo o número de células viáveis acima de 90%.

#### Microscopia de Fluorescência

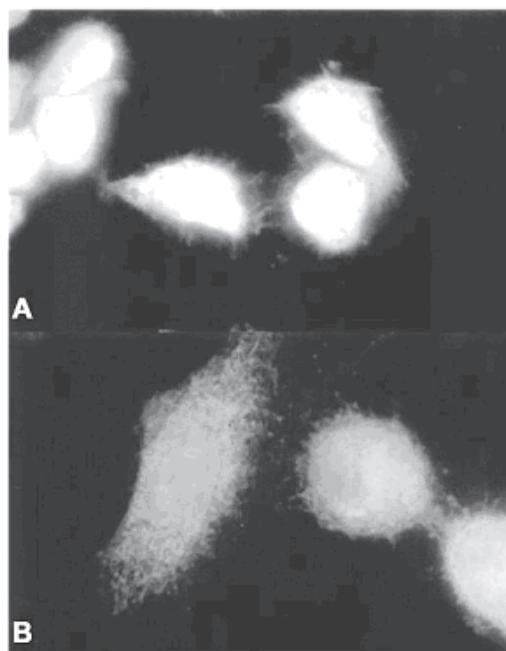
A visualização das células marcadas com DAPI (DAPI - 4', 6' - diamidino, 2' phenylindole- 5 ìM ), possibilitaram observações sobre o núcleo. As células Hep-2 do grupo controle (figura 2a) apresentaram núcleo preservado e cromatina intacta. Nas células Hep-2 do grupo TFD (figura 2b) pode-se observar a presença de morfologias, como perda da integridade nuclear.

**Figura 2: Células Hep-2 marcadas com DAPI. a) Grupo controle (Nota-se núcleo preservado, cromatina e membrana nuclear intacta); b) Grupo TFD, nota-se perda da integridade nuclear (cabeça de seta). 2500x**



O potencial de membrana mitocondrial após a TFD foi avaliado através do marcador fluorescente específico JC-1. No grupo controle (figura 3a) as células Hep-2 apresentaram mitocôndrias com aspecto filamentososo e um baixo potencial de membrana. No grupo TFD (figura 3b) as células apresentaram mitocôndrias com baixo potencial de membrana, pequenas concentrações granulares, ficando bem clara a redução deste potencial em relação ao controle.

**Figura 3: Células Hep-2 marcadas com JC-1. a) Grupo controle (nota-se mitocôndrias distribuídas em todo citoplasma apresentando baixo potencial de membrana e aspecto filamentososo); b) Grupo TFD, Mitocôndrias com baixo potencial de membrana, pequenas concentrações granulares. 2500x**

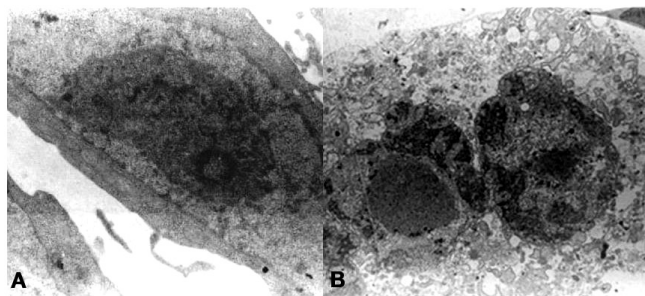


#### Microscopia Eletrônica

A Microscopia Eletrônica de Transmissão nos permitiu analisar ultraestruturalmente as alterações ocasionadas às células Hep-2 devido a TFD, bem como compará-las com os demais grupos. Pode-se observar que as células do grupo controle (figura 4a), com distribuição normal das organelas, apresentando citoplasma e mitocôndria intactos e cromatina homogeneamente dispersa no núcleo. No grupo TFD (figura 3b) as células Hep-2 apresentaram alterações ultraestruturais, bem como invaginação inicial da membrana nuclear e a presença de vacúolos.

**Figura 4: Células Hep-2 analisadas através de Microscopia Eletrônica de Transmissão. a) Grupo controle (Microscopia Eletrônica apresentando mitocôndrias (M), membrana plasmática (MP) e nuclear preservadas e núcleo intacto (N) – aumento de 3.270x); b) Grupo TFD (Nota-se cromatina condensada na periferia (cabeça de seta), início de invaginação da membrana nuclear (seta) e a presença de vacúolos (V) – aumento de 1.450x).**





### Discussão

Através da utilização do marcador fluorescente específico DAPI, foi possível observar que as células Hep-2 apresentam características morfológicas normais em relação ao núcleo, nos grupos controle, fotossensibilizante e laser, sendo possível observar uma distribuição normal da cromatina e membrana nuclear intacta. Porém, após a Terapia Fotodinâmica pode-se notar a presença de algumas alterações morfológicas, como por exemplo, a perda da integridade da membrana nuclear. Quando o marcador fluorescente específico JC-1 foi utilizado, foi possível observar que as células Hep-2 do grupo controle e as células tratadas somente com o fotossensibilizante (ZnPc) apresentaram distribuição mitocondrial normal, com aspecto filamentososo e baixo potencial de membrana. Já o grupo de células tratadas somente com irradiação apresentou uma fluorescência mais intensa indicando um alto potencial de membrana, resultado previsto, uma vez que a fonte de luz utilizada é um Laser de Baixa Potência, ocorrendo um efeito bioestimulatório, fato este descrito por Bortoletto et al. 2004,<sup>(16)</sup> quando observou que a intensidade de fluorescência dos grupos de células Hep-2 irradiadas foi maior do que as dos grupos não-irradiados, indicando um aumento da síntese de ATP. Outros pesquisadores também já descreveram resultados semelhantes<sup>(17, 18, 19)</sup>.

Já no grupo TFD, pode-se observar que as células Hep-2 apresentaram mitocôndrias com baixo potencial de membrana, pequenas concentrações granulares, ficando bem clara a redução deste potencial em relação ao controle. A análise ultraestrutural pela Microscopia Eletrônica de Transmissão confirma os resultados previamente descritos, ressaltando que a Terapia Fotodinâmica causa alterações nas organelas celulares, bem como invaginação inicial da membrana nuclear e a presença de vacúolos, tais características não tinham sido observadas nos demais grupos.

Células que sofrem apoptose apresentam mudanças morfológicas típicas, incluindo deformação do núcleo,

condensação da cromatina, formação de protuberância na membrana plasmática e fragmentação de DNA<sup>(20)</sup>. Tais mudanças foram constatadas em nosso estudo após TFD utilizando o agente fotossensibilizante ZnPc, sendo observadas em ambas as técnicas, Microscopia de Fluorescência e Microscopia Eletrônica de Transmissão, portanto é consistente a hipótese de que a linhagem Hep-2 após tratamento fotodinâmico com ZnPc sofre morte celular por apoptose.

### Agradecimentos

Ao Prof. Dr Pedro Duarte Novaes – FOP/UNICAMP – pela utilização do Microscópio Eletrônico ZEISS – EM 010; Capes pela bolsa de mestrado e UNIVAP pelo apoio.

### Referências Bibliográficas:

1. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. 2000; 23(2): 237-243.
2. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. Quim. Nova. 2002; 25(5): 801-807.
3. Chiu SM, Xue LY, Azizuddin K, Oleinick NL. Photodynamic therapy-induced death of HCT 116 cells: Apoptosis with or without Bax expression. Apoptosis. 2005; 10(6): 1357-1368.
4. Cauchon N, Tian H, Langlois R, La-Madeleine C, Martin S, Ali H, Hunting D, Lier JE. Structure-Photodynamic Activity Relationships of Substituted Zinc Trisulfophthalocyanines. Bioconjugate Chem. 2005; 16:80-89.
5. Ferreira SDRM, Tedesco AC, Sousa G, Zângaro RA, Silva NS, Pacheco MTT, Pacheco-Soares C. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AlPcS4. Lasers in Medical Science. 2004; 18:207-212.
6. Babilas P, Karrer S, Sidoroff A, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic therapy in dermatology .an update. Photodermatology Photoimmunology Photomedicine 2005; 21:142-149.
7. Kubler AC. Photodynamic therapy. Medical Laser Application. 2005; 20:37-45.
8. Ohmori S, Masuda K, Yoshida M, Arai T, Nakajima S. The study of the characteristic of photocytotoxicity under high peak power pulsed irradiation with ATX-S10Na(II) in vitro. Lasers in

- Medical Science. 2005; 20:54-61.
9. Zhu TC, Finlay JC, Hahn SM. Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexa .n lutetium-mediated photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005; 79: 231-241.
  10. Wang HW, Zhu TC, Putt ME, Solonenko M, Metz J, Dimofte A, Miles J, Fraker DL, Glatstein E, Hahn SM, Yodh AG. Broadband reflectance measurements of light penetration, blood oxygenation, hemoglobin concentration, and drug concentration in human intraperitoneal tissues before and after photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics*. 2005; 10(1): 014004-1 - 014004-13.
  11. Sibata MN, Tedesco AC, Marchetti JM. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004; 23:131-138.
  12. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemistry and Photobiology Science*. 2002; 1: 1-21.
  13. Wising C, Azem J, Zetterberg M, Svensson LA, Ahlman K, Lagergard T. Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin. *Toxicon*. 2005; 45: 767-776.
  14. Pazos MC, Pacheco-Soares C, Silva NS, Damatta RA, Pacheco MTT. Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. *Biocell*. 2003; 27(3):301-309.
  15. Nowis D, Makowski M, Stoklosa T, Legat M, Issat T, Golab J. Direct tumor damage mech of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Polonica*. 2005; 52 (2): 339-352.
  16. Bortoletto R, Silva NS, Zângaro RA, Pacheco MTT, Da-Matta RA, Pacheco-Soares C. Mitochondrial membrane potential after low-power laser irradiation. *Lasers in Medical Science*. 2004; 18:204-206.
  17. Karu T, Pyatibrat TP, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J.Photochem. Photobiol. B: Biol.* v.27, p.219-223, 1995.
  18. Karu TI. Primary and secondary mechanisms of activation of visible to near-IR radiation on cells. *J.Photochem. Photobiol. B: Biol.* v.49, p. 1-17, 1999.
  19. Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol.* v. 66, n. 6, p. 866-871, 1997.
  20. ZHOU, C., *et al.* Apoptosis of mouse MS-2 fibrosarcoma cells induced by Zn-(II)-phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B: Bio l.* V.33 p. 219-223. 1996.

#### Endereço para correspondência:

Prof. Dra. Cristina Pacheco Soares  
 Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Universidade do Vale do Paraíba – Avenida Shishima Hifumi 2911, CEP: 12244-000 São José dos Campos, SP, Brasil  
 E-mail: cpsoares@univap.br