

# LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA ZnPcBr<sub>8</sub> EM CULTURA DE CÉLULAS L929

**Aline H. Araujo Machado<sup>1</sup>, Fernanda M. Prado Braga<sup>2</sup>, Bianca F. Perrin Tamietti<sup>2</sup>,  
Marcelo M. M. Pelisson<sup>3</sup>, Milton Beltrame Jr<sup>3</sup>,  
Cristina Pacheco Soares<sup>2</sup>, Newton Soares da Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>IP&D-UNIVAP/Laboratório de Biologia Celular e Tecidual. E-mail: nsoares@univap.br

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

<sup>3</sup>IP&D-UNIVAP /Laboratório de Síntese Orgânica. E-mail: beltrame@univap.br

**Resumo-** Terapia Fotodinâmica requer a presença de um agente fotossensibilizante, uma fonte de luz e oxigênio molecular. O fotossensibilizante absorve energia da luz e induz a produção de espécies reativas de oxigênio entre a natureza tumoral, gerando uma cascata de eventos que mata a célula tumoral. As células L929 foram cultivadas como de rotina e incubadas com a Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr<sub>8</sub>), uma nova ftalocianina hidrofílica, por 1 hora nas concentrações 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 ou 10µM. Após incubação, as células foram analisadas através da técnica de Microscopia de Fluorescência. Os resultados demonstram que ZnPcBr<sub>8</sub> está localizada na região perinuclear após incubação de 1 hora em cultura de células L929.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica, Microscopia de Fluorescência, Ftalocianina.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas.

## Introdução

Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento alternativo para o câncer e outras condições médicas (CAUCHON et al., 2005), a qual requer a presença de um agente fotossensibilizante, uma fonte de luz e oxigênio molecular (FERREIRA et al., 2004; ZHU et al., 2005).

Novos fotossensibilizantes de segunda geração vêm sendo testados (SCHASTAK et al., 2005). Entre eles, as ftalocianinas são as mais promissoras, demonstrando excelente localização tumoral e alta eficiência fotodinâmica (FERREIRA et al., 2004; CEBURKOV; GOLLNICK, 2000). Estes fotossensibilizantes reúnem uma vasta classe de componentes com alto coeficiente de excitação, geralmente na região vermelha do espectro (630-750nm) (ALLISON et al., 2004).

O mecanismo de citotoxicidade da TFD depende fortemente do tipo celular, do fotossensibilizante empregado e de sua localização subcelular (GREBENOVA et al., 2003). Várias organelas celulares podem ser postuladas como alvo para a TFD, entre elas, a membrana plasmática, núcleo, mitocôndria, golgi, retículo endoplasmático, lisossomos e estrutura citoesquelética. Estas são as organelas mais susceptíveis para o processo de oxidação foto-induzida (FERREIRA et al., 2004), junto com a vasculatura tumoral (DOUGHERTY et al., 1998, KOLÁROVÁ et al., 2003, KOLÁROVÁ et al., 2005, FERREIRA et al., 2004).

O objetivo do presente trabalho foi investigar a localização subcelular da ZnPcBr<sub>8</sub> em cultura de células L929.

## Materiais e Métodos

**Fotossensibilizante:** Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr<sub>8</sub>) foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica – IP&D – UNIVAP. A solução estoque foi diluída a uma concentração final de 1mM em DMSO estéril (dimetil sulfoxido), esterilizada por filtração através de membrana Millipore (0.22µm - Millipore, Bedford, MA, USA) e estocada no escuro a 4°C.

**Cultura de células:** Tecido conjuntivo de rato (Clone L929) (ATCC CCL-1 NCTC) (adquiridas do Laboratório de Cultura de Células - Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, SP, Brasil). Estas células foram cultivadas como de rotina em garrafas de 25cm<sup>2</sup> (Nunc) com 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>.

**Microscopia de Fluorescência:** As células L929 (5x10<sup>5</sup> células/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços (Nunc, Denmark), contendo lamínulas estéreis, com meio MEM suplementado com 10% de SFB por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera umidificada (5% CO<sub>2</sub>). Após a adesão, as células foram incubadas com a ZnPcBr<sub>8</sub> diluída em DMSO nas seguintes concentrações, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 ou 10µM e incubadas em condições de crescimento por 1 hora. Após incubação, as células foram cuidadosamente lavadas com PBS e fixadas por 10 minutos com Paraformaldeído 4% (diluído em tampão PHEM). As lamínulas foram lavadas com tampão PHEM e montadas em lâminas contendo n-propil galato. Observações e fotomicrografias foram realizadas utilizando um fotomicroscópio Leica (DMLB).

## Resultados

As fotomicrografias demonstram que a fluorescência da ZnPcBr<sub>8</sub> está localizada na região perinuclear, quando as células foram incubadas por 1 hora nas concentrações 1μM (figura C), 2.5μM (figura D) 5μM (figura E) e 10μM (figura F). Porém, em menores concentrações como 0.25μM (figura A) e 0.5μM (figura B) a visualização de alguma fluorescência que demonstrasse a localização subcelular da ZnPcBr<sub>8</sub> foi imperceptível.

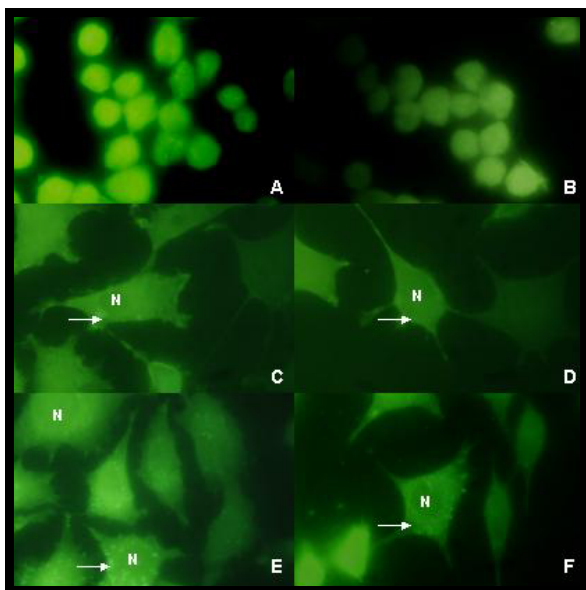


Figura 1 - Células L929 incubadas com a ZnPcBr<sub>8</sub> por 1 hora em diferentes concentrações. A) 0.25μM; B) 0.5μM; C) 1μM; D) 2.5μM; E) 5μM; F) 10μM. (N: núcleo; seta: fluorescência) 1000x.

## Discussão

O mecanismo de citotoxicidade depende fortemente do tipo celular, do fotossensibilizante empregado e de sua localização subcelular (GREBENOVA et al., 2003). De acordo com tais requisitos, foi estudado a localização subcelular da ZnPcBr<sub>8</sub>.

Para este experimento foi utilizado células do tecido conjuntivo de rato (Clone L929) (ATCC CCL-1 NCTC), as quais são recomendadas pela ISO 10993-5, que se refere aos testes para citotoxicidade *in vitro*.

As células L929 foram incubadas com ZnPcBr<sub>8</sub> por 1 hora em diferentes concentrações, este período de incubação está de acordo com experimentos previamente desenvolvidos, como por exemplo, os estudos de Pazos et al. (2003), que utilizou o mesmo tempo de incubação para a AIPc e a AIPcS<sub>4</sub> e o de Ferreira et al. (2004) que utilizou a AIPcS<sub>4</sub>.

Os resultados da Microscopia de Fluorescência demonstraram que a ZnPcBr<sub>8</sub>, uma ftalocianina hidrofílica, localiza-se na região perinuclear, quando analisada após 1 hora de incubação em cultura de células L929. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Machado et al. (2005), quando incubou as células CHO-K1 por 1 hora com a ZnPcBr<sub>8</sub>, bem como os estudos de Pazos et al. (2003), o qual descreveu que a AIPcS<sub>4</sub>, um fotossensibilizante solúvel em água como a ZnPcBr<sub>8</sub>, está localizada em endossomos e lisossomos.

## Conclusão

A Zinco Ftalocianina Octa-bromada localiza-se na região perinuclear após 1 hora de incubação em cultura de células L929.

## Agradecimentos

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

## Referências

- ALI, S.M; OLIVO, M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. **Int. J. Oncol.** V.21, p. 531-540, 2002.
- ALLISON, R.R; DOWNIE, G.H; CUENCA, R; HU, X.H; CHILDS, C.J.H; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiag. Photodynamic Therapy.** V.1, p.27-42, 2004.
- AMARANTE-MENDES, G.P; GREEN, D.R; The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.** V.32, p.1053-1061, 1999.
- BERG, K; SELBO, P.K; WEYERANG, A; DIETZE, A; PRASMICKAITE, L; BONSTED, A; ENGESAETER, B.O; ANGELL-PETERSEN, E; WARLOE, T; FRANDSEN, N; HOGSET, A. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. **J. Microsc.** V.218, p.133-147, 2005.
- CAUCHON, N; TIAN, H; LANGLOIS, R; MADELEINE, C; MARTIN, S; ALI, H; HUNTING, D; VAN-LIER, J.E. Structure - Photodynamic Activity Relationships of Substituted Zinc Trisulfophthalocyanines. **Bioconjugate Chem.** V.16, p.80-89, 2005.
- CEBURKOV, O; GOLLNICK, H. Photodynamic therapy in dermatology. **European J. Dermatol.** V.10, n.7, p.568-576, 2000.

- 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.
- EDINGER, A.L; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opin. Cell Biol.** V.16, p.663-669, 2004.
- FABRIS, C; VALDUGA, G; MIOTTO, G; BORSETTO, L; JORI, G; GARBISA, S; REDDI, E. Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. **Cancer Research.** V.61, p.7495-7500, 2001.
- 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.
- GREBENOVA, D; KUZELOVA, K; SMETANA, K; PLUSKALOVA, M; CAJTHAMLOVA, H; MARINOV, I; FUCHS, O; SOUCEK, J; JAROLÝM, P; HRKAL, Z. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **J. Photochem. Photobiol B: Biol.** V.69, p.71-85, 2003.
- KARMAKOVA, T; FEOFANOV, A; PANKRATOV, A; KAZACHKINA, N; NAZAROVA, A; YAKUBOVSKAYA, R; LEBEDEVA, V; RUZIYEV, R; MIRONOV, A; MAURIZOT, J.C; VIGNY, P. Tissue distribution and in vivo photosensitizing activity of 13,15-[N-(3-hydroxypropyl)]cycloimide chlorin p6 and 13,15-(N-methoxy)cycloimide chlorin p6 methyl ester. **J. Photochem. Photobiol B: Biol.** V.82, p.28-36, 2006.
- KOLÁROVÁ, H; MACECEK, J; NEVRELOVA, P; HUF, M; TOMECKA, M; MOSINGER, J; STRNAD, M. Photodynamic therapy with zinc-tetra (p-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.
- KOLÁROVÁ, H; MOSINGER, J; LENOBEL, R; KEJLOVÁ, K; JÍROVÁ, D; STRNAD, M. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. **Toxicol. In Vitro.** V.17, p.775-778, 2003.
- MACDONALD, I.J; DOUGHERTY, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **J. Porphyrins Phthalocyanines.** V.5, p.105-129, 2001.
- MACHADO, A.H.A; TAMIETTI, B.F.P; PACHECO-SOARES, C; BELTRAME-JR, M; PELISSON, M.M.M; SILVA, N.S. Subcellular localization of Octal-Bromide Zinc Phthalocyanine in CHO-K1 cells culture. **Braz. J. Morpholog. Sci.** Supplement, p.145, 2005.
- PAZOS, M.C; PACHECO-SOARES, C; SILVA, N.S; DAMATTA, R.A; PACHECO, M.T.T. Ultrastructural effects of two Phthalocyanines in L929 and HeLa cells after laser irradiation. **Biocell.** V.27, p.301-309, 2003.
- SCHASTAK, S; JEAN, B; HANDZEL, R; KOSTENICH, G; HERMANN, R; SACK, U; ORENSTEIN, A; WANG, Y; WIEDEMANN, P. Improved pharmacokinetics, biodistribution and necrosis in vivo using a new near infra-red photosensitizer: tetrahydroporphyrin tetratosylat. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** V.78, p.203-213, 2005.
- SIBATA, C.H; COLUSSI, V.C; OLEINICK, N.L; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.** V.33, p.869-880, 2000.
- SIBATA, C.H; COLUSSI, V.C; OLEINICK, N.L; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy in oncology. **Expert Opinion Pharmacotherapy.** V.2 n.6, p.917-927, 2001.
- WISING, C; AZEM, J; ZETTERBERG, M; SVENSSON, L.A; AHLMAN, K; LAGERGARD, T. Induction of apoptosis/necrosis in various human cell lineages by Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin. **Toxicol.** V.45, p.767-776, 2005.
- ZHU, T.C; FINLAY, J.C; HAHN, S.M. Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** V.79, p.231-241, 2005.
- International Standard - ISO 10993-5, second edition 1999-05-15. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

