

# LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA ZINCO FTALOCIANINA CONJUGADA A ALBUMINA E SUA PRECURSORA EM CULTURA DE CÉLULAS HeLa

*Carolina de Siqueira Gonçalves<sup>1,2</sup> (PG), Maria Angélica G. Cardoso<sup>2</sup> (PQ), Milton Beltrame Jr<sup>1</sup> (PQ), Aline Helena Araujo Machado<sup>3</sup> (MSc), Cristina Pacheco Soares<sup>3</sup> (PQ)*

1. Universidade do Vale do Paraíba /Laboratório de Síntese Orgânica - Av: Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP: 12.244-000, SJC, SP. [carols.g@directnet.com.br](mailto:carols.g@directnet.com.br), [beltrame@univap.br](mailto:beltrame@univap.br)
2. Universidade do Vale do Paraíba /Laboratório de Imunologia - Av: Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP: 12.244-000, SJC, SP. [magcard@univap.br](mailto:magcard@univap.br)
3. Universidade do Vale do Paraíba /Laboratório de Cultura de células - Av: Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP: 12.244-000, SJC, SP. [cpsoares@univap.br](mailto:cpsoares@univap.br)

**Resumo** - Na terapia fotodinâmica (TFD) uma droga fotossensibilizante, luz e oxigênio são usados para induzir a morte da célula tumoral por apoptose ou por necrose. O uso de drogas mais específicas para alvos celulares, como os tumores, tem sido objeto de estudo em alguns trabalhos onde demonstram que as drogas ligadas covalentemente a ligantes de específico reconhecimento podem aumentar sua eficiência. Exemplos desses ligantes incluem anticorpos monoclonais, hormônios, lipoproteínas entre outros. Nesta pesquisa foi analisado a localização subcelular da zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina e da zinco ftalocianina conjugada a albumina em culturas de células HeLa.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica, receptor de superfície, ftalocianina, localização subcelular.

## Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um processo fotoquímico que mostra interações complexas entre a luz, a concentração do fotossensibilizante e a concentração de oxigênio (LANGMACK et al., 2001). A ativação do fotossensibilizante pela luz favorece a formação de espécies radicais derivadas do oxigênio molecular, dando início a uma cascata de reações bioquímicas. Essas reações resultam em danos microvasculares, morte da célula tumoral e indução de uma resposta imune inflamatória seguida, eventualmente, por necrose, apoptose ou regressão do tumor (BRASSEUR et al., 1999).

As ftalocianinas são fotossensibilizantes promissores para o uso na TFD, devido a sua alta absorção de luz na região do infravermelho (650-750 nm) produzindo altos rendimentos de oxigênio singleto. Essas características são importantes, porque a luz vermelha penetra mais profundamente no tecido do que a luz visível, produzindo grandes quantidades de oxigênio singleto, induzindo a morte da célula (SUTTON et al., 2002).

A eficácia das características biológicas dos fotossensibilizantes é frequentemente determinada pela distribuição subcelular entre as células neoplásicas, a qual depende de características estruturais e propriedades físico-químicas do fotossensibilizante. Dependendo da natureza dos substituintes periféricos, do íon metal central, das

mudanças moleculares, as ftalocianinas podem ser localizadas entre certos compartimentos celulares, tais como: lisossomas, mitocôndria, retículo endoplasmático ou complexo de golgi.

Uma significativa desvantagem da ftalocianinas é a forte tendência de agregação em soluções, principalmente em água e solventes polares. A agregação das ftalocianinas não somente reduz sua solubilidade em soluções aquosas, mas também diminui sua fluorescência, diminuindo conseqüentemente a formação de oxigênio singleto, prejudicando a sua atividade de fotossensibilizante (SUTTON et al., 2002).

Vários sistemas têm sido explorados, na intenção de melhorar a absorção dessas ftalocianinas usando proteínas de importância biológica tais como albumina bovina, anticorpos monoclonais e lipoproteínas (SHARMAN et al., 2004).

A geração desses sistemas de carreamento pode aumentar a ação fotodinâmica, aumentando a acumulação intracelular dos fotossensibilizantes mediado por receptores de superfície e endocitose (SHARMAN et al., 2004).

Nosso interesse pela albumina é devido a sua grande capacidade de se ligar reversivelmente a uma ampla diversidade de ligantes com alta afinidade (SHARMAN et al., 2004).

O objetivo deste estudo é localizar a zinco ftalocianina conjugada a albumina e sua precursora em culturas de células HeLa e avaliar a internalização de ambas.

## Materiais e Métodos

**Fotossensibilizadores:** A zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina (Pc-iso) foi preparada em três etapas usando como material de partida o composto 4-nitro-ftalonitrila (Acros Organics). A reação da Pc-iso com BSA em uma solução de DMSO e tampão carbonato pH=9,2 resultou na formação zinco ftalocianina conjugada a albumina (Pc-BSA). A caracterização das ftalocianinas Pc-iso e Pc-BSA foi feita por espectroscopia no infravermelho e ultravioleta.

Para a realização dos experimentos de localização foram feitas soluções estoque: (I) Pc-iso (0,8 mg/mL) e (II) Pc-BSA (1,6 mg/mL), diluídas em DMSO e PBS respectivamente.

**Cultura de células:** As células HeLa e os meios de cultura foram fornecidos pelo laboratório de culturas de células – IP&D/ UNIVAP, sendo o processo desenvolvido no laboratório de Imunologia - IP&D/ UNIVAP. As células foram mantidas à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Foi utilizado meio MEM, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. As células foram plaqueadas ( $5 \times 10^5$  céls/mL) em placas de 24 poços, contendo lamínulas estéreis, e foram deixadas em condições de crescimento durante toda a noite (“overnight”) para permitir sua aderência.

No dia seguinte as células foram lavadas com PBS e expostas a Pc-iso e Pc-BSA respectivamente nas concentrações finais de 0,8µg/mL e 4,8µg/mL para Pc-iso e 1,6µg/mL e 8µg/mL para Pc-BSA. As células foram incubadas por 1 hora em seguida lavadas com PBS e incubadas com meio MEM completo por 1, 6, 12 e 24 horas. No final de cada período de incubação as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% no escuro.

**Microscopia de Fluorescência:** Ao término dos períodos de incubação, as lâminas contendo as células fixadas foram submetidas à análise pelo microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

**Espectro de Absorção:** O espectro de absorvância foi realizado em um Espectrofotômetro UV/visível – Varian – mod. CARY50, sendo a leitura realizada em cubetas de quartzo. A Pc-iso foi lida numa concentração de 0,269mg/mL e a Pc-BSA foi lida numa concentração 4mg/mL.

## Resultados

**Microscopia de Fluorescência:** A análise foi feita comparando-se os fotossensibilizantes Pc-iso e Pc-BSA. Podemos observar o aparecimento de vacúolos para as Pc-BSA a partir de 1h de

incubação. Porém para Pc-iso não se observou a presença desses vacúolos em nenhum dos períodos de incubação acima citados (Figuras 1, 2, 3 e 4).

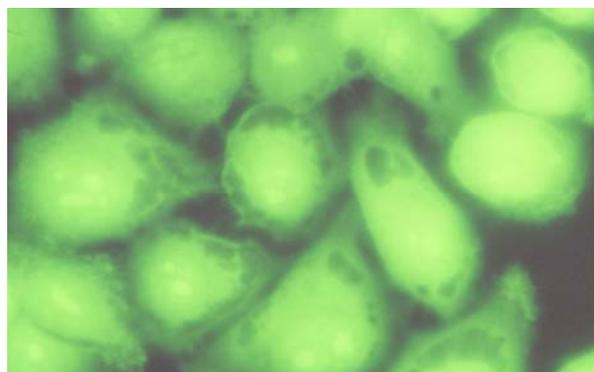


Figura 1. Células HeLa ( $5 \times 10^5$  céls/mL) incubadas com Pc-BSA por 1h em MEM completo.

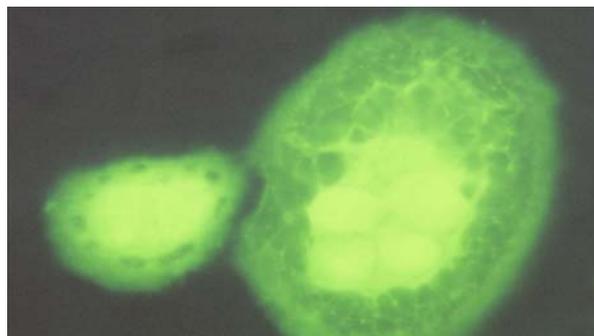


Figura 2. Células HeLa ( $5 \times 10^5$  céls/mL) incubadas com Pc-BSA por 6hs em MEM completo.

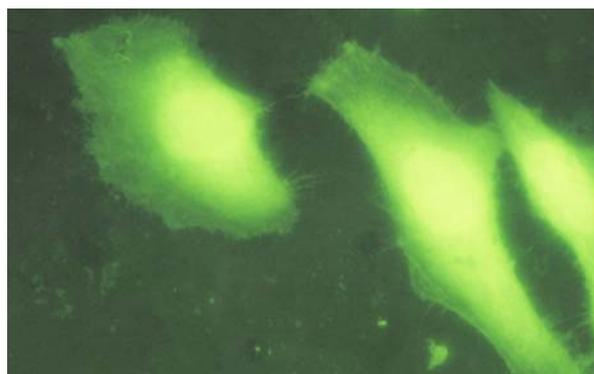


Figura 3. Células HeLa ( $5 \times 10^5$  céls/mL) incubadas com Pc-iso por 1h em MEM completo.

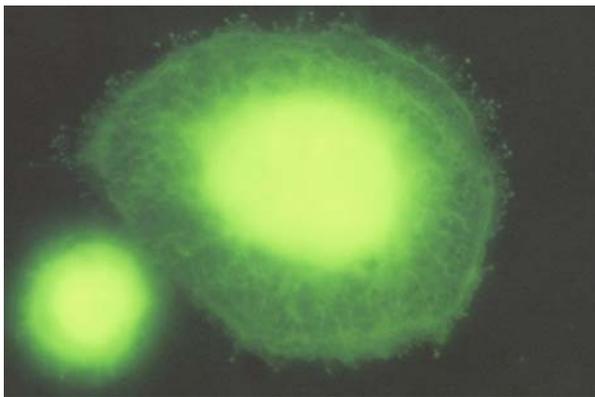


Figura 4. Células HeLa ( $5 \times 10^5$  céls/mL) incubadas com Pc-BSA por 6hs em MEM completo.

**Espectro de absorção:** O espectro mostra a absorção dos fotossensibilizantes e solventes usados nos experimentos de localização celular. No espectro podemos observar um sinal mais intenso da Pc-iso do que a Pc-BSA, na região de 700nm. A Pc-BSA apresenta um espectro formado por dois sinais (ombro) característico de ftalocianinas em solução muito polar. (Figura 5)

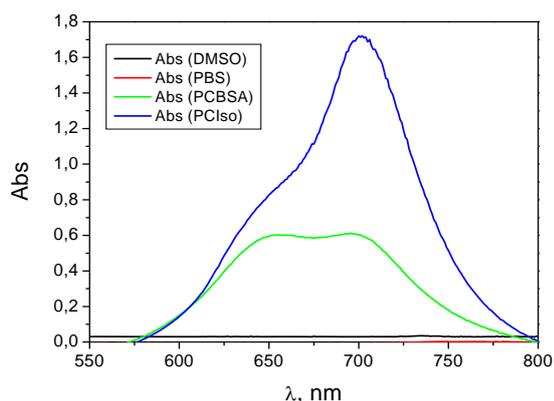


Fig.5: Espectro de absorção da Pc-BSA em PBS e da Pc-iso em DMSO.

## Discussão

Ftalocianina de segunda geração tem sido estudada na tentativa de melhorar a seletividade dos fotossensibilizantes.

A estratégia é baseada na habilidade natural que a albumina apresenta em atravessar a membrana celular e atingir alvos periféricos de organelas, tais como: mitocôndria, R.E e núcleo celular (VAZQUEZ et al., 2007).

A absorção dos fotossensibilizantes foi analisada através de microscopia de fluorescência e espectro de absorção.

A internalização dos fotossensibilizantes foram analisadas verificando no caso da Pc-BSA o aparecimento de vacúolos, ocorrendo provavelmente uma endocitose mediada pela

interação da proteína com receptores de membrana (HUANG et al., 2006). Com a Pc-iso não observamos, até o momento, a presença de vacúolos nas células HeLa.

Para os resultados do espectro de absorção foi possível analisar a faixa de absorção da Pc-BSA entre 650-710 nm enquanto que sua precursora apresenta pico máximo de 700 nm. O comprimento de onda não definido da Pc-BSA sugere uma possível agregação das moléculas quando em solução aquosa.

## Conclusão

Tudo indica que a Pc-BSA apresentou melhor absorção do que a Pc-iso, devido ao aparecimento de vacúolos observados a partir de 1h de incubação permanecendo iguais nos demais períodos (resultados não mostrados).

Devido ao aparecimento de um pico entre as faixas de 650-710 nm, Pc-BSA, acreditamos que isso se deva ao fato de possíveis agregações que essas moléculas podem apresentar quando diluídas em soluções aquosas.

## Agradecimentos

A Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

A Univap pelo seu apoio financeiro e incentivo.

## Referências

- BRASSEUR, N.; LANGLOIS, R.; LA MADELEINE, C.; OUELLET, R.; VAN LIER, J. E. Receptor-Mediated Targeting of Phtalocyanines to Macrophages Via Covalent Coupling to Native or Maleylated Bovine Serum Albumin. **Photochemistry and Photobiology**. V.69, n.3, p. 345-352, 1999
- HUANG, J.; LO, P; CHEN, Y.; LAI, J. C.; FONG, W. Preparation and in vitro photodynamic activity of novel silicon(IV) phthalocyanines conjugates to serum albumins. **Journal of Inorganic biochemistry**. V. 100, p. 946-951, 2006.
- LANGMACK, K.; MEHTA, R.; TWYMAN, P.; NORRIS, P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates- theory and practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. V. 60. p. 37-43, 2001).
- SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E.; ALLEN, C.M. Target photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. **Advanced DRUG DELIVERY reviews**. V. 56, p.53-76, 2004.

- SUTTON, J. M.; CLARKE, O. J.; FERNANDEZ, N.; BOYLE, R. W. Porphyrin, Chlorin. And Bacterochlorin Isothiocyanates: Useful Reagents for the Synthesis of Photoactive Bioconjugates. **Bioconjugate Chemistry**. V.13, p.249-263, 2002.

- VAZQUEZ, M. S.; ORTIZ, J.; NESTEROVA, I. V.; LÁZARO F. F.; SANTOS, A. S.; SOPER, S. A.; VICENTE, G. H. Synthesis and Properties of Cell-Targeted Zn(II)- Phthalocyanine- Peptide Conjugates. **Bioconjugate Chemistry**. V.18, P 410-420, 2007.