

LOCALIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DA ZINCO FTALOCIANINA OCTA-BROMADA EM CULTURA DE CÉLULAS CHO-K1

Aline Helena Araujo Machado^{1,2}, Bianca Ferreira Perrin Tamietti², Marcelo Miguel Martins Pelisson², Cristina Pacheco Soares², Milton Beltrame Júnior², Newton Soares da Silva^{2,*}.

¹Curso de Graduação em Engenharia Biomédica. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, 12244-000- São José dos Campos – SP. R. Raul Ramos de Araujo, 42 – Santana, 12211-760 – São José dos Campos, SP. e-mail¹: alineharaujo@aol.com

²Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D, Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, 12444-000 - São José dos Campos – SP. e-mail²: nsoares@univap.br

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Cultura de células, Fotossensibilizantes, Ftalocianina
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Resumo- Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade viável de tratamento para uma variedade de tumores, bem como para selecionadas doenças não-oncológicas. Diversas organelas celulares podem ser postuladas como alvos para TFD com diferentes fotossensibilizantes. A Zinco Ftalocianina Octa-bromada (ZnPcBr₈) utilizada neste estudo foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica (IP&D/Univap). As células CHO-K1 foram plaqueadas de maneira padrão e incubadas com a Zinco Ftalocianina Octa-bromada por 1 hora nas concentrações de 0.25, 0.5, 1, 5 e 10 µM. Após este período foram realizadas as análises (Microscopia de Fluorescência e Citotoxicidade através da Técnica MTT). Através dos resultados obtidos pode-se concluir que a ZnPcBr₈ está localizada em vesículas intracelulares, algumas vesículas abaixo da membrana plasmática e outras ao redor do núcleo, como demonstra as micrografias obtidas pela técnica de Microscopia de Fluorescência, e que, de acordo com o Teste de Citotoxicidade a concentração tolerável da concentração da ZnPcBr₈ relacionada a viabilidade celular das células CHO-K1 está em torno de 0.25 a 0.5 µM.

Introdução

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade viável de tratamento para uma variedade de tumores, bem como para selecionadas doenças não-oncológicas [1]. O procedimento requer a exposição de células ou tecidos para uma droga fotossensibilizante seguida pela irradiação com luz visível de um apropriado comprimento de onda, usualmente na região vermelha ou infravermelha próxima e compatível com o espectro de absorção da droga [2, 3, 4].

Um fotossensibilizante é usualmente definido como uma substância que induz sensibilidade luminosa para processos químicos e físicos, geralmente insensíveis a luz [5]. Eles absorvem a energia luminosa e induzem a produção de espécies reativas de oxigênio na natureza tumoral, gerando uma cascata de eventos que mata a célula tumoral [6]. Novos fotossensibilizantes de segunda geração estão sendo testadas atualmente [7], entre eles, os mais promissores são as Ftalocianinas [8]. Estes fotossensibilizantes formam uma vasta classe de componentes com alto coeficiente de excitação na região vermelha

do espectro (630 – 750 nm), ativados em energias de cerca de 100 J/cm² [9], mostrando excelentes propriedades de localização tumoral e alta eficiência fotossensibilizante [10,11], com penetração ótima de luz no tecido [8, 10].

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 [10,12]. Como a maioria dos agentes fotossensibilizantes são fluorescentes, a localização da droga pode ser determinada através da microscopia de fluorescência [12].

O objetivo do seguinte trabalho é avaliar qual a concentração ideal da ZnPcBr₈ para utilização em TFD, bem como designar qual a localização subcelular deste novo fotossensibilizante em cultura de células CHO-K1.

Materiais e Métodos

Fotossensibilizante: ZnPcBr₈ foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica – IP&D/UNIVAP (gentilmente cedida

pelo Dr. Milton Beltrame Júnior). A solução estoque foi diluída para uma concentração final de 1mM em DMSO (Dimethyl Sulfoxide) estéril. Após esta diluição, o fotossensibilizante foi esterilizado por filtração através de filtro Millipore (0.22µm - Millipore, Bedford, MA, USA) e mantido no escuro à 4°C até sua utilização.

Cultura de Células: Foram utilizadas células epiteliais CHO-K1 (ATCC CCL-61, Rockville, MD), gentilmente cedida pela Dr. Técia Maria Ulisses de Carvalho (UFRJ – Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Estas células foram cultivadas como de rotina em garrafas de cultura de 25cm² (Nunc) com Meio Ham-F12 (Gibco-BRL-USA) suplementadas com 10% FBS, penicilina (100U/ml), estreptomicina (100mM/ml) e fungizona (0.25µg/ml) por 24 horas à 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Espectro de Absorbância: ZnPcBr₈ foi preparada a uma concentração de 10µM a partir da solução estoque de 1mM, e o espectro de absorbância foi lida em um Espectrofotômetro (UV-VIS Varian Cary 50), sendo a leitura realizada em cubetas de quartzo tipo 111-QS 10mm (Hellma®, Sulamericana LTDA).

Citotoxicidade - Técnica MTT: As células foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 5x10⁴ células/ ml em cada poço de uma placa de 96 poços (Nunc, Denmark), com meio de cultura HAM-F12 suplementadas com 10% de SFB e deixadas "over-night" para adesão a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após este período as células foram lavadas com PBS e incubadas com ZnPcBr₈ nas seguintes concentrações 0.25, 0.50, 1.0, 5.0 e 10.0µM por 60 minutos em estufa de CO₂. Após incubação, o meio contendo a ftalocianina foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Em seguida adicionou-se o MTT (3-[[4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide]), na concentração de 0,5mg/ml em meio de cultura e as placas incubadas por um período de 90 minutos. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos através da adição de 100µl de DMSO e mantidos 30 minutos sob agitação. Após estes procedimentos foi efetuada a leitura das placas (Elisa Spectracount Packard, USA), utilizando filtro de 570nm.

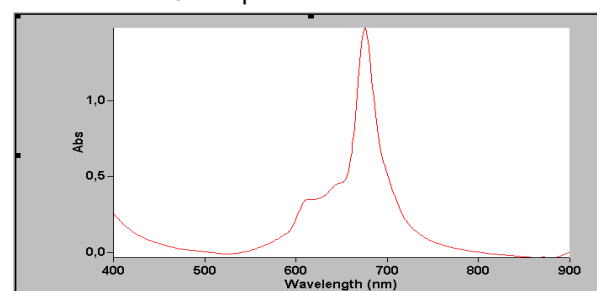
Microscopia de Fluorescência: As células foram plaqueadas à uma densidade de 5x10⁵ cells/ml em placas de 24 poços (Nunc, Denmark), contendo lamínulas estéreis, com o Meio Ham F-12 suplementado com 10% de SFB, e deixados "over-night" para adesão à 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. No dia seguinte, as células foram incubadas com ZnPcBr₈ diluído em DMSO em concentrações de 0.25, 0.5, 1, 5 e 10µM e incubadas em condições de crescimento por 1 hora. Após o período de incubação as células foram cuidadosamente lavadas com PBS, fixadas por 10 minutos com 4% de paraformaldeído, 0,1%

de Triton X-100 em tampão PHEM. Retirou-se as lamínulas da placa, lavou-as com tampão PHEM e então montadas em lâminas com n-propil galato. Todos os procedimentos foram realizados no escuro. As células foram visualizadas usando um Microscópio Leica DMLB.

Resultados

Espectro de Absorbância: O espectro de absorbância da ZnPcBr₈ demonstra que a absorção máxima está localizada na faixa de 676nm do espectro, como demonstra a figura 1. Figura 1: Espectro de absorção da ZnPcBr₈.

Microscopia de Fluorescência: A fluorescência da ZnPcBr₈ apareceram em vesículas



intracelulares, algumas vesículas abaixo da membrana plasmática e outras ao redor do núcleo quando as células foram incubadas por 1 hora com a ftalocianina nas concentrações 1µM, 5µM e 10µM (fig. 2, 3 e 4). Porém quando utilizamos concentrações menores, como 0.25µM e 0.5µM, a visualização da localização celular da ftalocianina foi quase imperceptível (fig. 5 e 6).



Figura 2: Células CHO-K1 incubadas com a ZnPcBr₈ na concentração 1µM (1h). 1000x



Figura 3: Células CHO-K1 incubadas com a ZnPcBr₈ na concentração 5µM (1h). 1000x

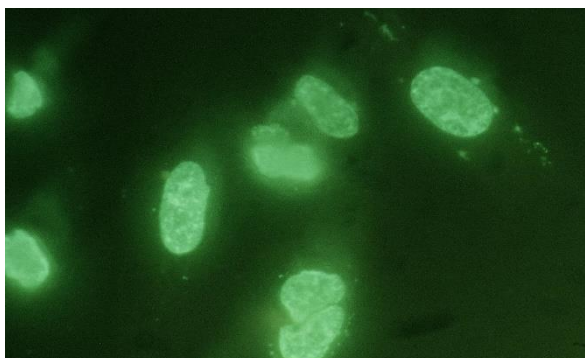


Figura 4: Células CHO-K1 incubadas com a ZnPcBr₈ na concentração 10µM (1h). 1000x

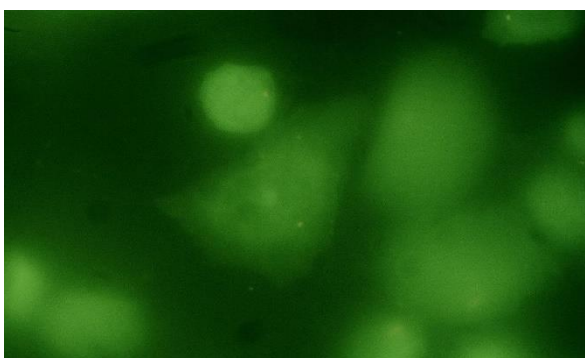


Figura 5: Células CHO-K1 incubadas com a ZnPcBr₈ na concentração 0.25µM (1h). 1000x



Figura 6: Células CHO-K1 incubadas com a ZnPcBr₈ na concentração 0.5 µM (1h). 1000x

Citotoxicidade: O gráfico 1 demonstra que a concentração viável para um possível tratamento fotodinâmico em cultura de células CHO-K1 está localizado na faixa de 0,25 à 0,5µM, onde pode-se observar que há viabilidade de 70 a 85%.

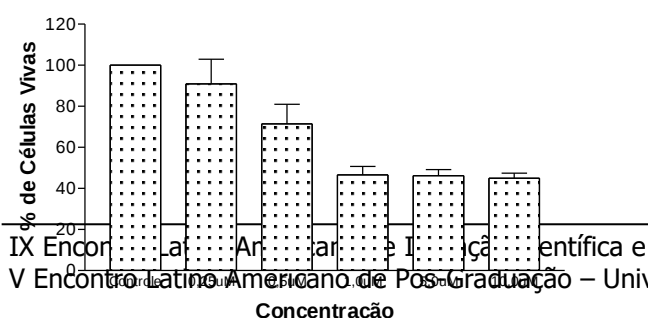


Gráfico 1: Citotoxicidade da ZnPcBr₈ em cultura de células CHO-K1 com 1 hora de incubação.

Discussão

Diversos novos fotossensibilizantes vem sendo criados, como descreveu Macdonald et. al (2001) [13]. Baseando-se nesta situação, nós estamos estudando a ZnPcBr₈ recentemente desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica, UNIVAP.

O espectro de absorção da ZnPcBr₈ demonstra que o pico máximo está localizado na faixa de 676nm (fig. 1). Este comprimento de onda está de acordo com outras Ftalocianinas que possuem seu coeficiente de excitação na região vermelha do espectro (630 – 750nm), demonstrando excelentes propriedades de localização tumoral e alta eficiência fotossensibilizante, como descreveu Ferreira et al. 2004 [10].

Os resultados da Microscopia de Fluorescência demonstram que a ZnPcBr₈, uma ftalocianina hidrofílica, localiza-se em vesículas intracelulares, algumas vesículas abaixo da membrana plasmática e outras ao redor do núcleo, quando analisadas após 1 hora de incubação. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Pazos et al. 2003 [14], o qual relatou que a AlPcS₄ um fotossensibilizante solúvel em água, como a ZnPcBr₈, é endocitada pela célula e portanto localiza-se em endossomos e lisossomos.

A partir da análise da localização do dano celular, realizou-se o teste de citotoxicidade para avaliar uma possível concentração da ftalocianina para uso em TFD, a qual deve ser o menos tóxica possível.

De acordo com os resultados do MTT, a concentração cuja ftalocianina possui respostas toleráveis de aceitação de viabilidade celular em cultura de células CHO-K1 encontra-se em torno de 0.25 a 0.5µM.

Trabalhos futuros serão necessários para avaliar se nestas concentrações ocorrerá o efeito fotodinâmico desejável na TFD, possibilitando então a utilização deste novo agente fotossensibilizante, bem como avaliar se em diferentes culturas ocorre o mesmo efeito ocasionado pela ftalocianina em células CHO-K1.

Conclusão

A ZnPcBr₈ está localizada em vesículas intracelulares, algumas vesículas abaixo da membrana plasmática e outras ao redor do núcleo,

quando analisadas após 1 hora de incubação em cultura de células CHO-K1.

A concentração tolerável de aceitação da concentração da ZnPcBr₈ relacionada a viabilidade celular das células CHO-K1 está localizada em torno de 0.25 a 0.5 µM.

Agradecimentos: CNPq, FAPESP e Univap.

Referências

- [1] 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**. P. 7495-7500, 2001.
- [2] Oleinick, N.L; Morris, R.L; Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **J. Photochem. Photobiol.Sci.** V.1, p.1-21, 2002.
- [3] Brancalion, L; Moseley, H. Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy. **Lasers in Medical Science**. V.17, p.173-186, 2002.
- [4] Piette, J; Volanti, C; Vantieghem, A; Matroule, J.Y; Habraken, Y; Agostinis, P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. **Biochemical Pharmacology**. V.66, p.1651-1659, 2003.
- [5] Sibata, C.H; Colussi, V.C; Oleinick, N.L; Kinsella, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V.33, p.869-880, 2000.
- [6] Kinsella, T.J; Colussi, V.C; Oleinick, N.L; Sibata, C.H. Photodynamic therapy in oncology. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. V.2, p.917-927, 2001.
- [7] 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. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. V.78, p.203-213, 2005.
- [8] Tedesco, A.C; Nunes, S.M.T; Sguilla, F.S. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V.37, p.273-284, 2004.
- [9] Allison, R.R; Downie, G.H; Cuenca, R; Hu, X.H; Childs, C.J.H; Sibata, C.H. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. V.1, p.27-42, 2004.
- [10] 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 ALPcS₄. **Lasers in Medical Science**. V.18, p.207-212, 2004.
- [11] Ceburkov, O; Gollnick, H. Photodynamic therapy in dermatology. **European Journal of Dermatology**. V.10, n.7, p.568-576, 2000.
- [12] Dougherty, T.J; Gomer, C.J; Henderson, B.W; Jori, G; Kessel, D; Korbely, M; Moan, J; Peng, Q. Review: Photodynamic Therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. V.90, p.889-905, 1998.
- [13] Macdonald, I.J; Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. V.5, p. 105-129, 2001.
- [14] Pazos, M.C; Pacheco-Soares, C; Silva, N.S; DaMatta, R.A; Pacheco, M.T.T. Ultrastructural effects of two Phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. **Biocell**. V.27, p. 301-309, 2003.