

SÍNTESIS Y LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE UNA TETRAFENILPORFIRINA LIPOFÍLICA EN ELECTROCITOS DE PSAMMOBATIS EXTENTA

Santiago J.⁽¹⁾ jsantiago@ipen.gob.pe; Vivas P.⁽²⁾; Prado M.⁽³⁾ inprado@criba.edu.ar

(1) Dirección General de Promoción y Desarrollo Tecnológico-IPEN / Lima, Perú

(2) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela S/N, Lima 1, Perú

(3) Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Universidad Nacional del Sur / Argentina

RESUMEN

Se describe la síntesis y localización intracelular de un derivado de tetrafenilporfirina lipofílica en electrocitos de *Psammobatis extenta* (Rajidae). La localización intracelular se estudió observando la fluorescencia roja presentada por este derivado de porfirina. Este compuesto presentó gran afinidad por los nervios electromotores y la membrana de los núcleos de electrocitos. Ambas estructuras exhibieron fuerte fluorescencia, mientras que la mitocondria mostró una débil fluorescencia. Adicionalmente, el microanálisis de rayos X sugiere una migración de iones catiónicos y cloruro.

1 CONTENIDO

Introducción

La terapia fotodinámica del cáncer (PDT) consiste en inocular una sustancia, fotosensibilizador, y luego de su acumulación selectiva en células cancerosas se irradia de manera muy focalizada con luz de longitud de onda apropiada para generar oxígeno molecular singulete, una especie altamente reactiva que reacciona con muchas biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.¹ Estas biomoléculas son químicamente modificadas y, por tanto, no pueden realizar sus funciones causando la muerte de la célula. Las ventajas de este método, comparada con otras modalidades de tratamiento de cáncer, son su baja toxicidad y su capacidad para destruir tumores selectivamente. El efecto secundario más notorio es la fotosensibilización residual de la piel por varias semanas. Sin embargo, la aplicación de la PDT es restringida debido a la limitada penetración de la luz en los tejidos. De otro lado, la fluorescencia que exhiben ciertos fotosensibilizadores permite la detección de tumores.²

Una de las áreas de mayor investigación es la búsqueda de nuevos fotosensibilizadores que sean más eficientes, selectivos y de baja toxicidad. El grado de lipofilicidad de los fotosensibilizadores determina su localización y el tipo de daño celular;^{3,4,5} en general un fotosensibilizador lipofílico se acumula en la membrana de la célula y sus organelas.⁶ De otro lado, los fotosensibilizadores hidrofílicos, al igual que estados agregados, ingresan a la célula por pinocitosis y son localizados generalmente en lisosomas y endosomas.⁷ Hay muchos fotosensibilizadores, por lo general derivados de porfirinas o de ftalocianinas, bajo estudio clínico y pueden ser clasificados como lipofílicos o hidrofílicos.⁸ Sin embargo hay pocos ejemplos de macrociclos neutros con largas cadenas alifáticas estudiadas para la PDT. Se sabe que la eficiencia y selectividad hacia el tumor se incrementa ligeramente conforme aumenta la longitud de los grupos alifáticos unidos al macrociclo de ftalocianina.^{9,10}

La *Psammobatis extenta* pertenece a la familia de las Rajidae, uno de los tres grupos de peces de descarga eléctrica débil. Se escogió los electrocitos para este estudio porque son células grandes con muy pocas organelas, esto facilita el estudio de la localización intracelular del fotosensibilizador.

Los electrocitos son células altamente polarizadas, multinucleares y de forma semicircular (Fig. 1). Presentan una cara cóncava que recibe inervaciones (IF) de las neuronas electromotoras de la espina dorsal. La otra cara, convexa, no presenta inervaciones (NIF) y muestra un sistema de cavernas.¹¹ Los núcleos están localizados en la región posterior del citoplasma.¹¹

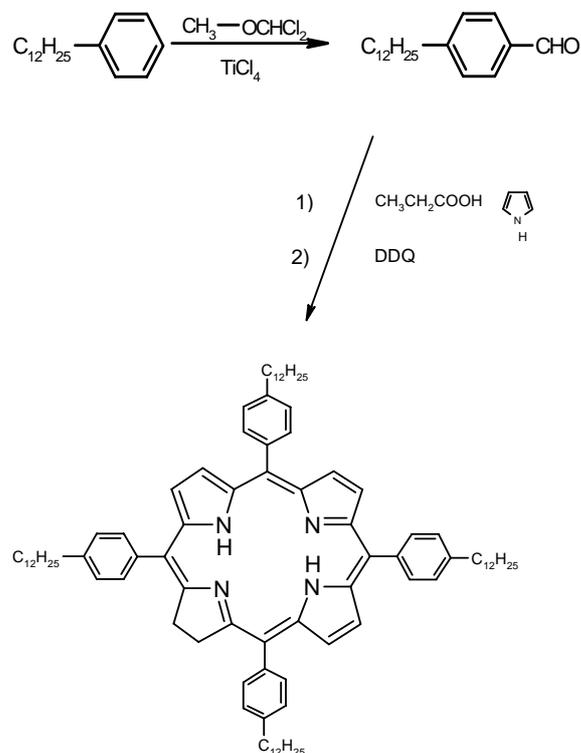
En este trabajo describimos la síntesis y la localización intracelular de 5,10,15,20-tetrakis(4-*n*-dodecilfenil)-porfirina (TPP), 1, composición elemental y cambios

morfológicos en electrocitos de *Psammobatis extenta*.

2 PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del fotosensibilizador

El derivado de TPP se sintetizó según el siguiente esquema:^{12,13}



La pureza de este compuesto fue controlada por $^1\text{H-RMN}$, IR, UV-Visible:

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ : -2.75(s,2H), 0.88(t,12H), 1.31-1.58(m,72H), 1.90(q, 8H), 2.93(t, 8H), 7.53(d, 8H), 8.10(d, 8H), 8.85(s, 8H)

UV-Vis (benceno) λ_{max} (ϵ), 421nm (7.4×10^5), 517nm (2.7×10^4), 552nm (1.5×10^4), 594nm (7.9×10^3), 650nm (6.9×10^3)

IR (KBr) 2922, 2852, 1469, 967, 780, 734 cm^{-1}

Localización intracelular de TPP

Para estudiar la afinidad de **1** por las organelas de los electrocitos se hicieron cortes criostáticos de aproximadamente 10 μm del órgano eléctrico del *P. extenta*. Estos cortes fueron realizados a lo largo del eje anteroposterior y fueron incubados en una solución 1.2×10^{-5} M de **1** en una mezcla de xileno, EtOH y buffer imidazol. Después de la fijación, los cortes fueron lavados con PBS o buffer imidazol por 5 minutos. Luego fueron mezclados con Citifluor y observados con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros G y 580W.

Es necesario que en cumplimiento de las normas peruanas [3] y recomendaciones de la IAEA [4], la calibración dosimétrica para unidades teleterapia, de ^{60}Co , de rayos x y de electrones, deben realizarse una vez por año, como parte del programa de garantía de la calidad que debe implementarse en todo centro de radioterapia del Perú.

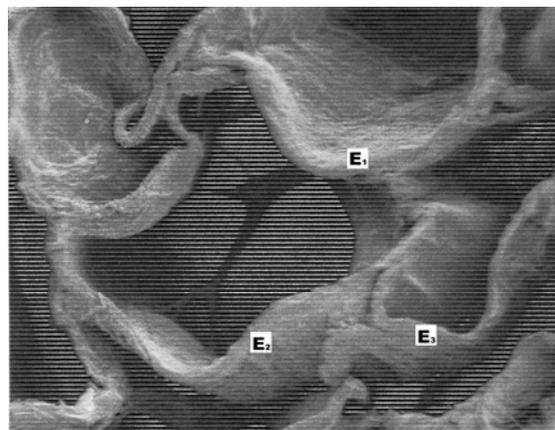


Figura 1. Micrografía SEM mostrando tres electrocitos (x100).

En la figura 2a se observa una fuerte fluorescencia en el núcleo (flecha blanca) y una débil en la mitocondria (triángulo). Si la incubación es realizada solo en cloroformo, la localización intracelular de **1** es la misma pero la micrografía muestra un mejor contraste (Fig. 2b), la flecha blanca indica las terminaciones nerviosas, la flecha negra indica los núcleos y el triángulo la mitocondria. Adicionalmente el fotosensibilizador muestra una afinidad por las terminaciones nerviosas (TN e IF).

Cambios morfológicos de los electrocitos

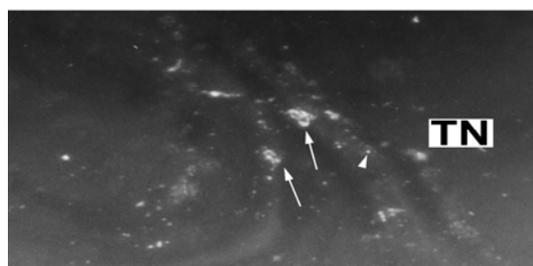


Figura 2. Micrografía de fluorescencia de electrocitos tratados con **1** en: a) xileno-EtOH-buffer imidazol y b) CHCl_3 (x100).

La figura 3a muestra una micrografía SEM de la cara no inervada de un electrocito antes del tratamiento con el derivado de TPP. Luego se procedió a la incubación de los tejidos en TPP disuelto en los sistemas a) xileno-EtOH-buffer imidazol 3.9×10^{-4} M y b)

CHCl_3 -EtOH-buffer imidazol $7,8 \times 10^{-5}$ M. La membrana celular empieza a hincharse rápidamente y la cara convexa pierde todas sus invaginaciones (Fig. 3b y 3c).

Composición elemental de los electrocitos

Para obtener información acerca de los cambios morfológicos se realizaron estudios de composición elemental por energía dispersiva de rayos X (EDAX) obteniéndose los espectros mostrados en la figura 4.

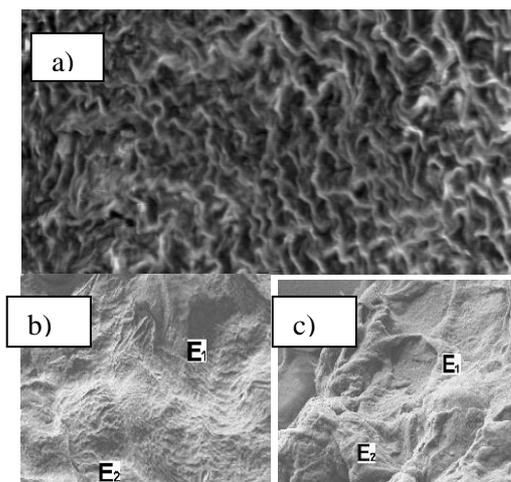


Figura 3. Micrografía electrónica de segmentos del órgano eléctrico: a) antes del tratamiento b) después del tratamiento con el derivado de TPP en CHCl_3 y c) xileno-EtOH-buffer imidazol.

Después del tratamiento del electrocito con el derivado de la TPP en los sistemas indicados, las muestras fueron concentradas y metalizadas con oro (200A), colocadas en un dispositivo (Pelco modelo 3) y orientadas para observarlas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL 35 equipado con EDAX un detector de Si(Li) de energía dispersiva. Para las muestras tratadas en CHCl_3 , el peso relativo semicuantitativo % (K) para el oxígeno e iones sodio y cloruro fueron: 39, 17 y 15, respectivamente. Comparado con los controles negativos el pico para el Na^+ es 5 veces mayor y para el oxígeno la variación no es significativa. También, el pico del Ca^{2+} es 2 veces mayor pero para el K^+ es 6 veces menor (Fig. 4a). La misma tendencia es observada cuando los electrocitos son tratados con el sistema xileno-EtOH-buffer imidazol (Fig. 4b).

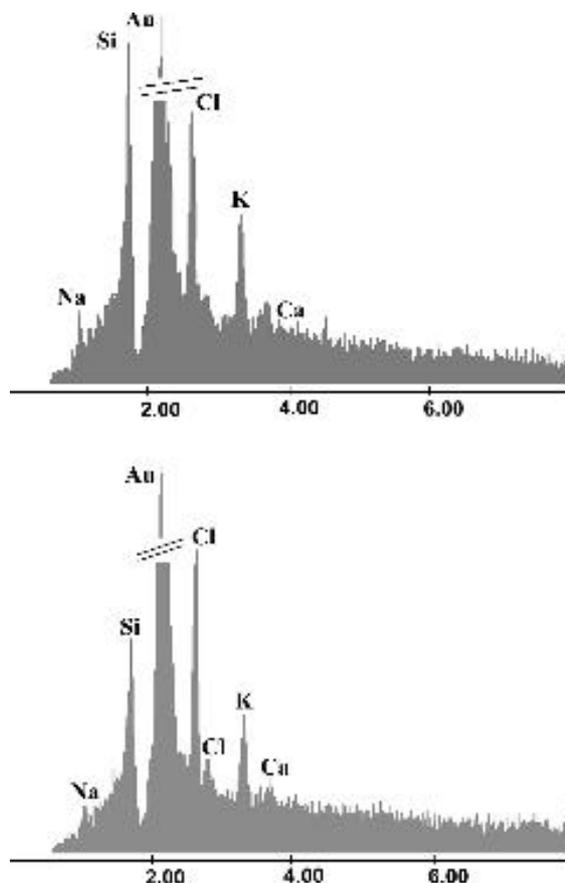


Figura 4. Espectro de energía dispersiva de segmentos del electrocito tratados con derivado de TPP en a) xileno-EtOH-buffer imidazol y b) cloroformo.

3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El derivado de porfirina utilizado tiene una gran afinidad por las terminaciones nerviosas y los núcleos. Esto se deduce por la intensa fluorescencia roja mostrada por estas regiones. Sin embargo, la afinidad por las mitocondrias es muy débil.

La afinidad de éste fotosensibilizador por las terminaciones nerviosas es explicada porque éstos tejidos son ricos en ácidos grasos. El núcleo muestra una fluorescencia de forma similar a la distribución semicircular de la cromatina de estas células (Fig. 2b), sugiriendo que el derivado de TPP interacciona con el ADN. En contraste, la mitocondria muestra una débil fluorescencia. Esta localización es inusual para un fotosensibilizador de similar polaridad, por ejemplo, una ftalocianina lipofílica se localiza en los lisosomas¹³

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDAX) muestra un incremento simultáneo en la concentración de Na^+ y Ca^{2+} y la disminución en la concentración de

K⁺ esto es una buena evidencia de la activación del canal catiónico con el derivado de porfirina. Sin embargo, el cambio más importante es la aparición de un nuevo pico correspondiente al anión cloruro (Fig. 4). El peso semicuantitativo % (K_a) para este elemento es 33% (sistema a) y 47% (sistema b), a pesar de la concentración de **1** en el sistema b) es 5 veces mayor. Estos resultados constituyen una sugestiva evidencia de la activación del canal de cloruro como consecuencia de la penetración del derivado de la TPP en los electrocitos. La masiva acumulación intracelular de Cl⁻ y especialmente la entrada de Na⁺ conlleva al hinchamiento celular y la consecuente necrosis de la célula.^{14,15} Hay que resaltar que la activación del canal de cloruro no es usual para peces de descarga eléctrica débil. Sin embargo, la activación de este canal ya fue puesto en evidencia en electrocitos de *Torpedo*, un pez de descarga eléctrica fuerte¹⁶

La entrada masiva de iones cloruro y salida de Na⁺ provoca la hinchazón de las células. Estas pierden todas sus invaginaciones, conllevando finalmente a la muerte de la célula por necrosis. Sin embargo, el hecho de que el fotosensibilizador también tenga afinidad por los núcleos y el ADN hacen pensar que también debería existir una contribución apoptótica a la muerte celular. La activación del canal de cloruro por éste derivado de TPP puede constituir una alternativa en el tratamiento de la fibrosis quística, la cual esta relacionada a una disfunción en el transporte del ión cloruro.¹⁷ En contraste, el incremento de la concentración de Ca²⁺ en electrocitos sugiere una participación de un mecanismo apoptótico.¹ Además de la interacción de **1** con el ADN, la bajísima concentración de la porfirina unida a la mitocondria puede contribuir a la muerte celular por mecanismo de apoptosis después de la excitación con luz.

4 CONCLUSIONES

El fotosensibilizador 5,10,15,20-*tetrakis*(4-*n*-dodecilfenil)porfirina presenta gran afinidad por las terminaciones nerviosas y los núcleos de los electrocitos, pero muy poca por las mitocondrias.

Los análisis de EDAX muestran una migración de iones como consecuencia de la localización del derivado de TPP en los electrocitos. Estos resultados constituyen

una fuerte evidencia de la activación de los canales de cloruro y catiónicos.

El fotosensibilizador usado en este trabajo tiene propiedades de cristal líquido.^{18,19} Sería muy interesante comparar estos resultados con otros fotosensibilizadores con estructura química similar pero sin propiedades mesomórficas.

Agradecimientos: Al Dr. M Ipohorski de la CNEA de Buenos Aires por permitir el uso de sus instalaciones, y al Dr. A V Sorrivias, del CRIBAB de Bahía Blanca por la obtención de las micrografías en el SEM-EDAX. Igualmente al Dr. F. Barrantes del INIBIB, Bahía Blanca, por sus comentarios críticos y acertados.

5 REFERENCIAS

- [1] Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002; 1: 1-21.
- [2] Moan J, Christensen T. Porphyrins as tumor localizing agents and their possible use in photochemotherapy of cancer. *Tumor Res.* 1980; 15: 1-10.
- [3] Reddi E, Ceccon M, Valduga G, Jori G, Bommer J, Elisei F, Latterini L, Mazzucato U. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol.* 2002; 75: 462-470.
- [4] Malik Z, Babushkin T, Sher S, Hanania J, Ladan H, Nitzan Y, Salzberg S. Collapse of K⁺ and ionic balance during photodynamic inactivation of leukemic cells, erythrocytes and *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biochem.* 1993; 25: 1399-1406.
- [5] Weizman E, Rothmann C, Greenbaum L, Shainberg A, Adamek M, Ehrenberg B, Malik Z. Mitochondrial localization and photodamage during photodynamic therapy with tetraphenylporphines. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2000; 59: 92-102.
- [6] Graham A, Li G, Chen Y, Morgan J, Oseroff A, Dougherty T, Pandey R. Structure-activity relationship of new octa-ethylporphyrin-based benzochlorins as photosensitizers for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 2003; 77: 561-566.
- [7] Berg K, Moan J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer.

- Photochem. Photobiol. 1997; 65: 403-409.
- [8] Schaffer M, Schaffer PM, Corti L, Gardiman M, Sotti G, Hofstetter A, Jori G, Duhmke E. Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2002; 66: 157-164.
- [9] Ometto C, Fabris C, Milanesi C, Jori G, Cook MJ, Russell DA. Tumour-localizing and -photosensitizing properties of a novel zinc(II)-octadecyl-phthalocyanine. Br. J. Cancer. 1996; 74: 1891-1899.
- [10] Fabris C, Ometto C, Milanesi C, Jori G, Cook MJ, Russell DA. Tumour-localizing and tumour-photosensitizing properties of Zinc(II)-octapentyl-phthalocyanine. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1997; 39: 279-284.
- [11] Prado Figueroa M, Vidal A, Barrantes FJ. Ultrastructure of *Psammobatis extenta* (Rajidae) electrocytes and cytochemical localization of acetylcholinesterase, acetylcholine receptor and F-actin. Biocell. 1995; 19: 113-123.
- [12] Vidal A, Prado Figueroa M, Eberwein ME, Kreda E, Barrantes FJ. Co-distribution of tropomyosin and α -actinin with actin in *Psammobatis extenta* electrocytes brings out their similarity with muscle fiber cytoplasm. Comp. Biochem. Physiol. 1997; 116A: 113-118.
- [13] Ball DJ, Mayhew S, Wood SR, Griffiths J, Vernon DI, Brown SB. A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of differing charge. Photochem. Photobiol. 1999; 69: 390-396.
- [14] Okada Y, Maeno E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. Comp. Biochem. Physiol. 2001; 130A: 377-383.
- [15] Barros LF, Hermosilla T, Castro J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. Comp. Biochem. Physiol. 2001; 130A: 401-409.
- [16] White M, Miller C. Probes of the conduction process of a voltage-gated Cl⁻ channel from Torpedo electroplax. J. Gen. Physiol. 1981; 78: 1-18.
- [17] Schwiebert EM, Cid-Soto L, Stafford D, Carter M, Blaisdell C, Zeitlin P, Guggino W, Cutting G. Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998; 95: 3879-3884.
- [18] Shimizu Y, Miya M, Nagata A, Ohta K, Matsumura A, Yamamoto I, Kusabayashi S. Mesomorphic phase transitions of 5,10,15,20-tetrakis(4-n-dodecylphenyl)-porphyrin. Chem. Letters. 1991; 25-28.
- [19] Shimizu Y, Miya M, Nagata A, Ohta K, Yamamoto I, Kusabayashi S. Mesomorphic phase transitions of tetraphenylporphyrins with four long aliphatic chains. Liq. Cryst. 1993; 14: 795-805.