

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

María Prado Figueroa<sup>a</sup>, Facundo Barrera<sup>a</sup>, Patricia Vivas<sup>b</sup> y Jullo Santiago<sup>\*b,c</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina <sup>b</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela s/n, Lima 1, Perú <sup>c</sup> Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú.

**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 los núcleos de los electrocitos. Ambas estructuras exhibieron fluorescencia intensa, mientras que la mitocondria mostró una fluorescencia débil. Adicionalmente, el microanálisis de rayos X sugiere una migración de iones catiónicos y cloruro.

**Palabras clave:** PDT, electrocitos, tetrafenilporfirina, canales iónicos

**Abstract:** We describe the synthesis of 5,10,15,20-tetrakis(4-n-dodecylphenyl) porphyrin and his intracellular localization in electrocytes of *Psammobatis extenta* (Rajidae). The localization was monitored by the observation of the red fluorescence exhibited by this porphyrin derivative. This compound shows big affinity for the electromotor nerves and the nuclear chromatin of electrocytes. Both structures exhibited intense fluorescence. Whereas, the mitochondria were slightly fluorescent. Additionally, the electron probe X-ray microanalysis suggests a migration of chloride and cationic ions.

**Key words:** PDT, electrocytes, tetraphenylporphyrin, ionics channels

### I. INTRODUCCIÓN

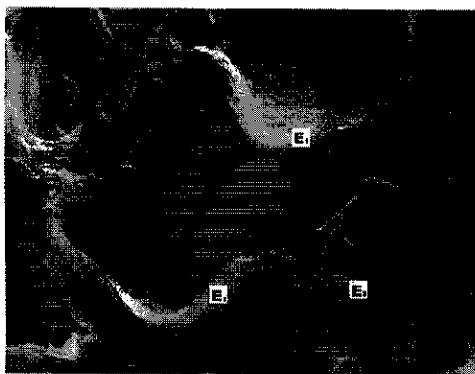
La terapia fotodinámica del cáncer (PDT) consiste en inocular una sustancia, fotosensibilizador, y luego de su acumulación selectiva en células cancerosas se irradia de manera muy focalizada con luz de longitud de onda apropiada para generar oxígeno molecular singlete, una especie altamente reactiva que reacciona con muchas biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos<sup>1</sup>. Estas biomoléculas son químicamente modificadas y, por tanto, no pueden realizar sus funciones causando la muerte de la célula. Las ventajas de este método, comparadas con otras modalidades de tratamiento de cáncer convencionales, 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<sup>2</sup>.

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<sup>3,4,5</sup> en general un fotosensibilizador lipofílico se acumula en la membrana plasmática de la célula y sus organelas<sup>6</sup>. De otro lado, los fotosensibilizadores hidrofílicos, al igual que estados agregados, ingresan a la célula por

pinocitosis y son localizados principalmente en lisosomas y endosomas<sup>7</sup>. Hay muchos fotosensibilizadores, por lo general derivados de porfirinas o de ftalocianinas, bajo estudio clínico y pueden ser clasificados como lipofílicos o hidrofílicos<sup>8</sup>. 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<sup>9,10</sup>.

*Psammobatis extenta* pertenece a la familia Rajidae, uno de los tres grupos de peces de descarga eléctrica débil. Se escogieron 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 (Véase Figura 1). Presentan una cara cóncava que recibe inervaciones (IF) de las neuronas electromotoras de la médula espinal. La otra cara, convexa, no presenta inervaciones (NIF) y muestra un sistema de cavernas<sup>11</sup>. Los núcleos están localizados en la región posterior del citoplasma<sup>11</sup>.



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

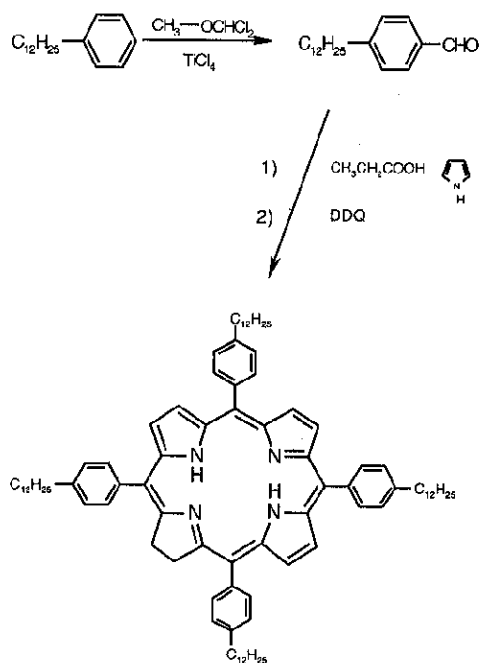
En este trabajo describimos la síntesis y la localización intracelular de 5,10,15,20-tetrakis(4-n-dodecilfenil)-porfirina (TPP), 1, composición elemental y cambios

morfológicos en electrocitos de *Psammobatis extenta*.

## II. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 2.1 Síntesis del fotosensibilizador

El derivado de TPP se sintetizó según el siguiente esquema<sup>12,13</sup>:



La pureza de este compuesto fue controlada por <sup>1</sup>H-RMN, IR, UV-visible:

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) 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<sub>max</sub> (ε), 421nm (7.4x10<sup>6</sup>), 517nm (2.7x10<sup>4</sup>), 552nm (1.5x10<sup>4</sup>), 594nm (7.9x10<sup>3</sup>), 650nm (6.9x10<sup>3</sup>)

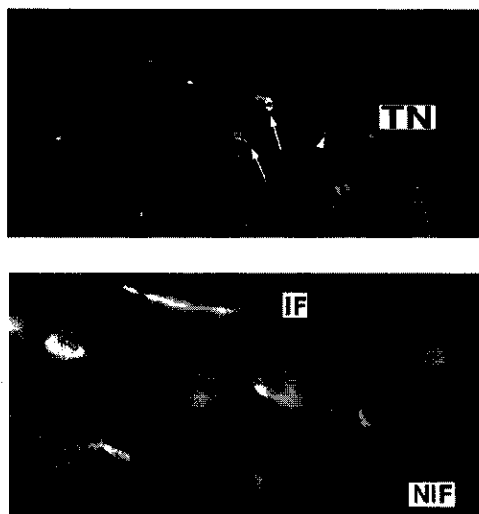
IR (KBr) 2922, 2852, 1469, 967, 780, 734 cm<sup>-1</sup>

### 2.2 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 antero posterior y fueron incubados en una solución  $1.2 \times 10^{-8}$  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 montados con Citifluor y observados con un microscopio de epifluorescencia equipados con filtros G y 580W.

En la Figura 2a se observa una fluorescencia intensa en los núcleos (flecha blanca) y de menor intensidad en las mitocondrias (triángulo). Si la incubación es realizada solo en cloroformo, la localización intracelular de 1 es la misma pero la micrografía muestra un mejor contraste (Figura 2b): las terminaciones nerviosas (flecha blanca), los núcleos (flecha negra) y las mitocondrias (triángulo). Adicionalmente, el fotosensibilizador muestra afinidad por las terminales nerviosas (TN e IF).

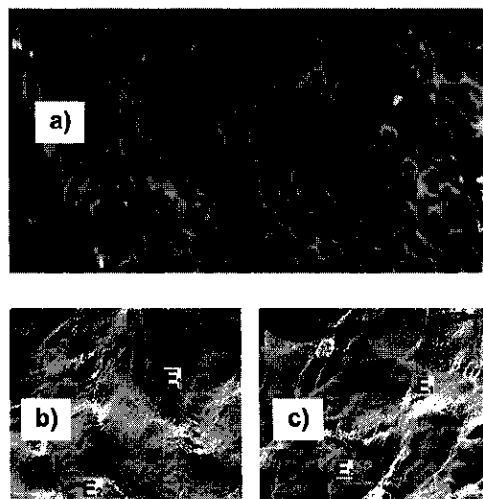


**Figura 2.** Micrografía de fluorescencia de electrocitos tratados con 1 en: a) xileno-EtOH-buffer imidazol y b)  $\text{CHCl}_3$  (x100)

### 2.3 Cambios morfológicos de los electrocitos

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

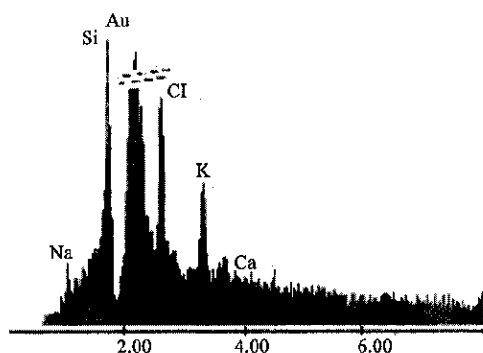
en TPP disuelto en los sistemas a) xileno-EtOH-buffer imidazol  $3.9 \times 10^{-4}$  M y b)  $\text{CHCl}_3$ -EtOH-buffer imidazol  $7.8 \times 10^{-5}$  M. El electrocito empieza a hincharse rápidamente y la cara convexa pierde sus invaginaciones (Figuras 3b y 3c).

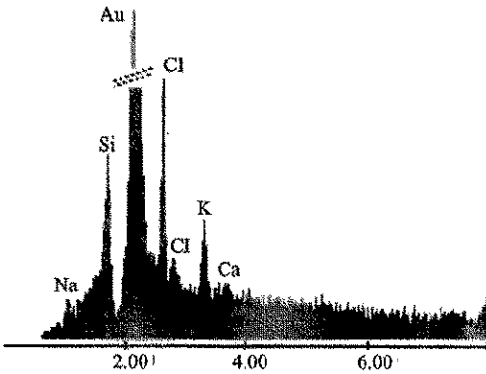


**Figura 3.** Micrografía electrónica de segmentos de órgano eléctrico: a) antes del tratamiento b) después del tratamiento con el derivado de TPP en  $\text{CHCl}_3$  y c) xileno-EtOH-buffer imidazol

### 2.4 Composición elemental de los electrocitos

Para obtener información acerca de los posibles cambios fisiológicos se realizaron estudios de la composición elemental con el microanálisis de la energía dispersiva de rayos X (EDAX) obteniéndose los espectros mostrados en la Figura 4.





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

Después del tratamiento del electrocito con el derivado de TPP (sistemas a y b), las muestras fueron metalizadas con oro (200Å) y orientadas para observarlas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL 35 equipado con EDAX un detector de Si(Li) de energía dispersiva. Comparado con los controles negativos y el espectro obtenido para el sistema a, el pico para el  $\text{Na}^+$  es 5 veces mayor, mientras que el pico del cloruro es nuevo. También, el pico del  $\text{Ca}^{2+}$  es 2 veces mayor, pero para el  $\text{K}^+$  es 6 veces menor (Figura 4a). La misma tendencia es observada cuando los electrocitos son tratados con el sistema xileno-EtOH-buffer imidazol (Figura 4b).

### III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El derivado de porfirina utilizado tiene una gran afinidad por las terminales 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 este fotosensibilizador por las terminales nerviosas es explicada porque estos tejidos son ricos en ácidos grasos. El núcleo muestra una fluorescencia de forma similar a la distribución semicircular de la cromatina de estas células (Figura 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 lisosomas<sup>13</sup>.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDAX) muestra un incremento simultáneo en la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y la disminución en la concentración de  $\text{K}^+$ , 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 (Figura 4). El peso semicuantitativo % ( $K\alpha$ ) 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<sup>-</sup> y especialmente la entrada de  $\text{Na}^+$  conlleva al hinchamiento celular y la consecuente necrosis de la célula<sup>14,15</sup>. 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 fuerte<sup>16</sup>.

La entrada masiva de iones cloruro y  $\text{Na}^+$  provoca la hinchazón de las células. Éstas 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 la cromatina hace pensar que también debería existir una contribución apoptótica a la muerte celular.

La activación del canal de cloruro por este derivado de TPP puede constituir una alternativa en el tratamiento de la fibrosis quística, la cual está relacionada a una disfunción en el transporte del ion cloruro<sup>17</sup>. En contraste, el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en electrocitos sugiere una participación de un

mecanismo apoptótico<sup>1</sup>. 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.

#### IV. CONCLUSIONES

Este fotosensibilizador presenta gran afinidad por las terminales 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<sup>16,19</sup>. Sería muy interesante comparar estos resultados con otros fotosensibilizadores con estructura química similar, pero sin propiedades mesomórficas.

#### V. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. M. Ipohorski de la CNEA de Buenos Aires por permitir el uso del SEM-EDAX. Igualmente al Dr. Barrantes del INIBIB, Bahía Blanca, por sus comentarios críticos.

#### VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N.L. Oleinick, R.L. Morris and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1** (2002), pp. 1-21.
- [2] J. Moan y T. Christensen, "Porphyrins as tumor localizing agents and their possible use in photochemotherapy of cancer", *Tumor Res.*, **15** (1980), pp. 1-10.
- [3] E. Reddi, M. Ceccon, G. Valduga, G. Jori, J. Bommer, F. Elisei, L. Latterini y U. Mazzucato, "Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins", *Photochem. Photobiol.*, **75** (2002), pp. 462-470.
- [4] Z. Malik, T. Babushkin, S. Sher, J. Hanania, H. Ladan, Y. Nitzan y S. Salzberg, "Collapse of K<sup>+</sup> and ionic balance during photodynamic inactivation of leukemic cells, erythrocytes and *Staphylococcus aureus*", *Int. J. Biochem.*, **25** (1993), pp. 1399-1406.
- [5] E. Weizman, C. Rothmann, L. Greenbaum, A. Shainberg, M. Adamek, B. Ehrenberg y Z. Malik, "Mitochondrial localization and photodamage during photodynamic therapy with tetraphenylporphyrins", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **59** (2000), pp. 92-102.
- [6] A. Graham, G. Li, Y. Chen, J. Morgan, A. Oseroff, T. Dougherty and R. Pandey, "Structure-activity relationship of new octaethylporphyrin-based benzochlorins as photosensitizers for photodynamic therapy", *Photochem. Photobiol.*, **77** (2003), pp. 561-566.
- [7] K. Berg and J. Moan, "Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer", *Photochem. Photobiol.*, **65** (1997), pp. 403-409.
- [8] M. Schaffer, P.M. Schaffer, L. Corti, M. Gardiman, G. Sotti, A. Hofstetter, G. Jori y E. Duhmke, "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.*, **66** (2002), pp. 157-164.
- [9] C. Ometto, C. Fabris, C. Milanese, G. Jori, M.J. Cook and D.A. Russell, "Tumour-localizing and -photosensitizing properties of a novel zinc(II)-octadecylphthalocyanine", *Br. J. Cancer*, **74** (1996), pp. 1891-1899.
- [10] C. Fabris, C. Ometto, C. Milanese, G. Jori, M.J. Cook and D.A. Russell, "Tumour-localizing and tumour-photosensitizing properties of Zinc(II)-octapentylphthalocyanine", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **39** (1997), pp. 279-284.

- [11] M. Prado Figueroa, A. Vidal y F.J. Barrantes, "Ultrastructure of *Psammobatis extenta* (Rajidae) electrocytes and cytochemical localization of acetylcholinesterase, acetylcholine receptor and F-actin", *Biocell*, **19**, (1995), pp. 113-123.
- [12] A. Vidal, M. Prado Figueroa, M.E. Eberwein, E. Kreda y F.J. Barrantes, "Co-distribution of tropomyosin and  $\alpha$ -actinin with actin in *Psammobatis extenta* electrocytes brings out their similarity with muscle fiber cytoplasm", *Comp. Biochem. Physiol.* **116A** (1997), pp. 113-118.
- [13] D. J. Ball, S. Mayhew, S. R. Wood, J. Griffiths, D. I. Vernon y S. B. Brown, "A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of differing charge", *Photochem. Photobiol.*, **69** (1999), pp. 390-396.
- [14] Y. Okada and E. Maeno, "Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels", *Comp. Biochem. Physiol.*, **130A** (2001), pp. 377-383.
- [15] L.F. Barros, T. Hermosilla y J. Castro, "Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis", *Comp. Biochem. Physiol.*, **130A** (2001), pp. 401-409.
- [16] M. White and C. Miller, "Probes of the conduction process of a voltage-gated Cl-channel from *Torpedo* electroplax", *J. Gen. Physiol.*, **78**, 1981, pp. 1-18.
- [17] E.M. Schwiebert, L. Cid-Soto, D. Stafford, M. Carter, C. Blaisdell, P. Zeitlin, W. Guggino, and G. Cutting, "Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, (1998), pp. 3879-3884.
- [18] Y. Shimizu, M. Miya, A. Nagata, K. Ohta, A. Matsumura, I. Yamamoto y S. Kusabayashi, "Mesomorphic phase transitions of 5,10,15,20-tetrakis (4-n-dodecylphenyl) porphyrin", *Chem. Letters* (1991), pp. 25-28.
- [19] Y. Shimizu, M. Miya, A. Nagata, K. Ohta, I. Yamamoto y S. Kusabayashi, "Mesomorphic phase transitions of tetraphenylporphyrins with four long aliphatic chains", *Liq. Cryst.*, **14** (1993), pp. 795-805.