

Marcação de células tumorais com um derivado fluorescente de pigmentos de flores

Nathana Barbosa Lopes^{1,*} (PG), Emerson Soares Bernardes² (PQ), Bruno Martorelli Di Genova³ (PG) e Erick Leite Bastos¹ (PQ)

¹Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ²Centro de Pesquisa Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil. ³Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil; nathana@iq.usp.br

Palavras Chave: betalaínas, sondas fluorescentes, glioblastoma.

Introdução

Betalaínas são pigmentos naturais vacuolares encontrados em um número restrito de plantas e fungos. Alguns derivados são responsáveis pela fluorescência de flores de *M. jalapa* e *P. grandiflora*.¹ Estes pigmentos são capazes de atravessar membranas celulares e a betacumarina (**BtC**), um derivado semissintético desenvolvido pelo grupo, foi usado como marcador fluorescente de eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária em humanos.² A **BtC** possui um PI de 5.5 e é mais lipofílica do que betalaínas naturais. Além disso, devido à sua baixa citotoxicidade, **BtC** pode ser usada em experimentos com células vivas.² O diagnóstico de câncer depende de diferenças entre células saudáveis e tumorais. As linhagens celulares derivadas de glioblastoma humano U-87 e de carcinoma gástrico MKN-45 possuem pHi = 7.4, enquanto as células saudáveis correspondentes possuem pHi = 6.8 e 6.0 (pHe = 7.4).³⁻⁶ Há uma variação entre os componentes citosólicos e de membrana entre as células tumorais e saudáveis e, também, entre linhagens diferentes. Fatores como esses podem determinar a entrada e o acúmulo de sondas fluorescentes para marcação celular. Neste trabalho são apresentados os resultados obtidos no estudo da marcação de células U-87 e MKN-45 com **BtC**.

Resultados e Discussão

BtC foi semissintetizada e purificada, conforme descrito anteriormente,² e caracterizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas ($R_T = 5,5$ min, sílica C18, 15 x 4,6 cm (Phenomenex), 5 μ m; gradiente 5 – 95% B em 20 min, sendo A: água e B: 60% MeCN/água; fluxo = 1 mL min⁻¹; ESI(+)-MS, m/z [M+H]⁺ = 369). Foram realizados experimentos de microscopia de fluorescência nos quais células MKN-45 e U-87 foram lavadas com PBS pH = 7.4 e posteriormente incubadas com **BtC** em diferentes concentrações. Após 5 min. de incubação, as células foram lavadas novamente com PBS e as

imagens adquiridas por microscopia de fluorescência (Olympus, QColor3, Figura 1).

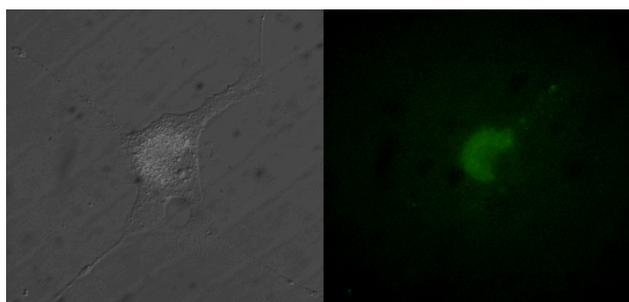


Figura 1. Imagens de microscopia de fluorescência de célula viva de glioblastoma após incubação com **BtC** (80 μ mol L⁻¹) por 5 min.; aumento de 1000 x. EX488/EM520, filtro FITC.

Apesar de possuir baixo rendimento quântico de fluorescência ($\phi_{FL} = 4.8 \times 10^{-3}$ em água)², observa-se que a sonda se acumula dentro da célula de glioblastoma de forma difusa, ao passo que não é observada emissão em células de câncer gástrico.

Neobetanina foi usada como controle e, apesar de possuir um rendimento quântico de fluorescência maior que **BtC** ($\phi_{FL} = 0.01$ em água), não foi possível observar a emissão de fluorescência em nenhuma das duas linhagens de célula estudadas.

Conclusões

A sonda fluorescente betalaínica **BtC** acumula na linhagem celular de glioblastoma U-87 enquanto que em células de tumor gástrico MKN-45 não é observada marcação.

Agradecimentos

À FAPESP (ELB 2011/23036-5), CNPq (ELB PP 304094/2013-7) e CAPES (NBL DD 33002010191P0). À Profa. Dra. Renata R. Tonelli pelo auxílio nas medidas de microscopia.

¹ Grandia-Herrero, F. *et al. Nature* **2005**, 437, 334.

² Goncalves, L. C. P. *et al. Plos One*. **2013**, 8, e53874.

³ Schule, W. R. *et al. Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1987**, 65, 978.

⁴ Schmier, J. B. *et al. J. Neurooncol.* **2008**, 89, 19.

⁵ Machen, T. E. *et al. Ann. Rev. Physiol.* **1987**, 49, 19.

⁶ Tomoda, A. *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 17573.