

Título em Português: Estudo da inativação Fotodinâmica em modelo alveolar Transwell

Título em Inglês: evaluation of photodynamic inactivation in a transwell alveolar model

Autor: Ana Júlia Barbosa Tomé

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Cristina Kurachi

Área de Pesquisa / SubÁrea: Biotecnologia

Agência Financiadora: USP - Programa Unificado de Bolsas

Estudo da inativação Fotodinâmica em modelo alveolar Transwell

Ana Júlia Barbosa Tomé

Dra. Giulia Kassab, Me. Maria Luiza Ferreira Vicente

Prof. Dra. Cristina Kurachi

Instituto de Física de São Carlos/ Universidade de São Paulo

anajuliabarbosatome@usp.br

Objetivos

Este trabalho visa analisar a interação do azul de metileno (AM), molécula sensível à luz, quando utilizado em um modelo de alvéolo *in vitro* e submetido à Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (TFDa).

Métodos e Procedimentos

Para simular a anatomia alveolar, montou-se uma cocultura de células de epitélio e endotélio pulmonar baseada no modelo de Hermanns, et al., ambas separadas por uma membrana de PET com poros de 0,4 μM . Ao primeiro dia de experimento (denominado dia zero) colocou-se $2 \cdot 10^5$ células de endotélio (EA. hy 926) coradas com um marcador fluorescente que emite uma cor alaranjada no inverso da membrana até que atingisse confluência. Assim que a confluência foi atingida, colocou-se $5 \cdot 10^4$ células de epitélio pulmonar (CCL- 185) em cada inserto. As células de epitélio também foram coradas, mas dessa vez, com um marcador que emite na cor verde. Assim que a confluência dessa segunda linhagem foi atingida, colocou-se uma solução a 1 μM do corticóide dexametasona, a fim de que este estimulasse a produção de junções ocludentes entre as células. Ao dia 7, retirou-se o meio de cultura da região superior do inserto, onde alojavam-se as células de epitélio, a fim de que estas ficassem em uma interface ar-líquida, levando-as a produção de surfactante

pulmonar. A partir do dia 10 o modelo estava apto para a realização de experimentos com microscopia confocal e de microbiologia. Para evidenciar os locais de maior fluorescência nas imagens de microscopia confocal, foram realizadas análises em Python.

Para a realização da TFDa, uma *Biotable*, que consiste em um conjunto de LED's centrado em 660nm foi utilizado, sendo que sua irradiância era de 50mW/cm² e a fluência entregue nos experimentos foi de 20J/cm².

Resultados

Primeiramente, realizou-se experimentos de cinética do AM utilizando o microscópio confocal de fluorescência do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos (LSM 780). Após testes preliminares, a concentração de 5 μM mostrou-se ser ideal para o imageamento e, a partir dessa, variou-se o tempo de incubação do fotossensibilizador entre 0, 2,5, 5, 10 e 20 minutos (Figura 1).

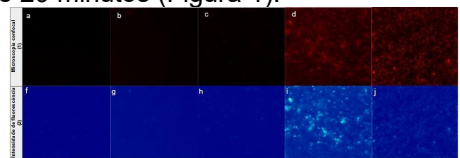
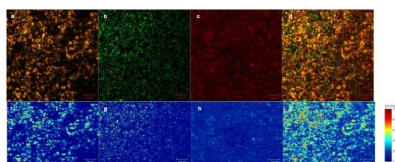


Figura 1: Cinética do azul de metileno utilizando microscopia confocal.

Analisando a imagem bruta e seu processamento utilizando Python, pôde-se perceber que, conforme o aumento do tempo de incubação a uma concentração constante,

maior a internalização do AM nas células. Em seguida, para verificar qual a linhagem celular havia melhor internalizado o AM, analisou-se a membrana em duas posições distintas: uma em que as células epiteliais estavam no plano focal (Figura. 2), e outra em que as células de endotélio estavam no plano focal (Figura. 3)

Figura 2: Plano focal das células de epitélio



A partir da análise das imagens da (Figura 2), percebe-se que o padrão de distribuição do AM assemelha-se mais à cultura de células epiteliais, em verde, do que às endoteliais, em laranja. Ao comparar às imagens realizadas no plano focal das células endoteliais (Figura 3), confirma-se que a concentração do fotossensibilizador é menor e, portanto é maior na linhagem que possui contato direto com o AM (células epiteliais).

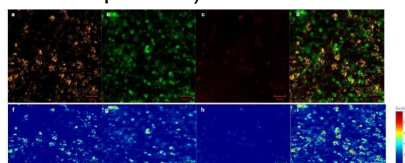


Figura 3: Plano focal das células de endotélio

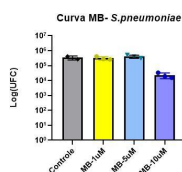


Figura 4: Inativação fotodinâmica de *S. pneumoniae* em função da concentração de azul de metileno.

Para investigar em que concentração o AM começaria a ter efeito fotodinâmico antimicrobiano, realizou-se uma curva de concentrações do AM para o microrganismo *S. pneumoniae* - o mais incidente em casos de pneumonia bacteriana - a uma concentração inicial de $5 \cdot 10^7$ UFC/mL. A partir desse ensaio foi possível verificar que a concentração de $10 \mu\text{M}$, com 20 minutos de incubação, foi necessária para reduzir 1,5log do

microrganismo testado. Por fim, foram feitas imagens utilizando um corante *LIVEDEAD* composto por brometo de etídio e laranja de acridina. Quando em contato com células, este corante deixará verde células vivas e vermelhas células que morreram por apoptose. Como o corante tingue as células de maneira não específica, a fim de identificar qual linhagem teve mais dano quando submetida à TFDa após 1 minuto de incubação com o AM, foram realizadas várias secções na membrana que foram desde a região mais inferior do inserto (mais próximo às células endoteliais) até as regiões mais superiores do inserto (referentes a regiões mais próximas às células de epitélio). Nas figuras 5 e 6, é possível ver o plano em que espera-se ser as células de endotélio. Conforme mais próximo às células de epitélio (Figuras 7,8 e 9), mais células em vermelho conseguem ser distinguidas, mostrando maior morte neste tipo celular.

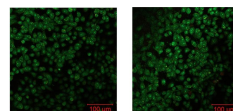
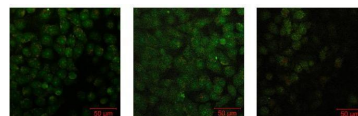


Figura 5 e 6: Ação do LIVEDEAD após TFDa



Figuras 7, 8 e 9: Ação do LIVEDEAD após TFDa

Conclusões

O azul de metileno mostrou-se tóxico para as células de epitélio pulmonar e pouco tóxico para as células endoteliais. Estudos futuros mostrarão a toxicidade desse fotossensibilizador em outras linhagens alveolares

Referências

HERMANNNS et al. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 6, p. 736–752, 1 jun. 2004.

Evaluation of Photodynamic Inactivation in a Transwell Alveolar Model

Ana Júlia Barbosa Tomé

Dra. Giulia Kassab, Me. Maria Luiza Ferreira Vicente

Prof. Dr. Cristina Kurachi

Physics Institute of São Carlos/ University of São Paulo

anajuliabarbosatome@usp.br

Objectives

This work aims to investigate the interaction of methylene blue, a molecule that is sensitive to light, when used in an *in vitro* model and

For the Photodynamic Therapy, the irradiation was made using a *Biotable*, which consists of a submitted to Photodynamic Therapy. group of LED's with wavelength centered at 660nm, irradiance of 50mW/cm², and fluence of 20J/cm².

Materials and Methods

To mimic the alveolar anatomy, a coculture of endothelial and lung epithelial cell lines is cultured based on Hermanns, et al. model. For this, a PET insert with a 4µm pore size is used. On the first day of the experiment (denominated day zero), endothelial cells (EA. hy 926) marked with a fluorophore emitting an orange color are cultured in the bottom region of the membrane, until confluence. Then, an epithelial cell line (CCL-185), marked with a fluorophore that emits a green color was cultured on the upper region of the insert and, when confluence was reached, a solution of 1µM of dexamethasone was placed in contact with the epithelial cells. On day 7, the media of the upper region of the insert was removed, forming an air-liquid interface, allowing epithelial cells to produce lung surfactant.

On day 10, the model was ready to perform confocal microscopy and microbiology experiments. Finally, to highlight fluorescence points in the images, analysis using Python were performed.

Results

Initially, kinetic experiments using methylene blue were performed using the Confocal Microscope of the Optics Group of the Physics Institute of São Carlos (LSM 780). After some preliminary tests, a 5µM concentration showed to be ideal for imaging and images were captured maintaining the concentration in 5uM and varying the time of incubation between 0, 1, 2.5, 5, 10 and 20 minutes.

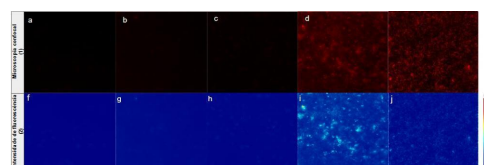


Figure 1: Kinetics of methylene blue using confocal microscopy

Analyzing the raw image and the processed one using Python, it can be noted that, as the time of incubation increases, the internalization of methylene blue in the cells is better. After that, to verify which of the cell lineages internalized the photosensitizer more, the membrane was imaged in two different

positions: one in which the epithelial (Figure 2) cells were in the focal plane and another in which the endothelial cells were in the focal plane (Figure 3).

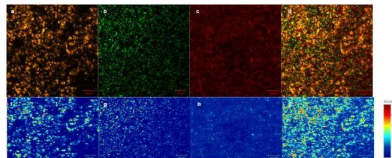


Figure 2: Focal plane of epithelial cells

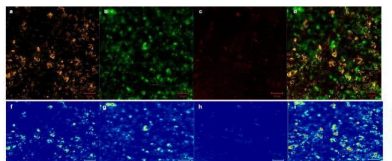


Figure 3: Focal plane of endothelial cells

From the images of (Figure 2), it can be verified that the pattern of distribution of methylene blue resembles epithelial (green) cells more than endothelial. (orange), which agrees with the expected, since methylene blue is placed in the upper region of the insert, where are the epithelial cells. When comparing the concentration of MB in the focal plane of the endothelial cells, it can be seen that methylene blue is less present than in the other case, supporting that the photosensitizer is accumulated in the epithelial cells.

Another study was the application of Antimicrobial Photodynamic Therapy on *S. pneumoniae*- the main microorganism in bacterial pneumonia- with an initial concentration of 5.10^7 UFC/mL. In this experiment, different concentration (1, 5 and 10uM) was tested and the time of incubation was fixed to be 20 minutes. With these parameters, the concentration of 10 μ M showed to reduce 1,5 log of the microorganism tested.

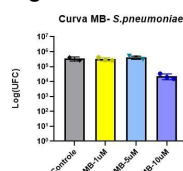


Figure 4: Photodynamic inactivation on *Streptococcus pneumoniae*.

Finally, the last analysis made was the LIVEDEAD assay, which consists of a dye that colors green live cells and red cells that died via apoptosis. As this dye colors cells in a non-specific way, with the aim of identifying each lineage that had more damage when submitted to Photodynamic Therapy, different sections were made from the bottom region of the insert to the top of it. In Figures 5 and 6 it is possible to see the plane which is expected to be the endothelial cells.

From the LIVEDEAD coloring, it can be concluded that there is more damage to the epithelial cells than to the endothelial cells. This can be explained due to the direct contact of the epithelial cells with methylene blue.

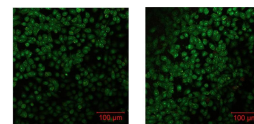


Figure 5 and 6: LIVEDEAD application before aPDT

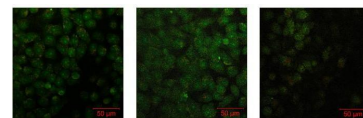


Figure 7,8 and 9: LIVEDEAD application before aPDT

Conclusions

Methylene Blue is shown to be more toxic to lung epithelial cells than to endothelial cells. Future studies will evaluate quantitatively the toxicity of the investigated aPDT protocol on different cell lines of the alveoli.

References

HERMANNNS et al. Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 6, p. 736–752, 1 jun. 2004.